

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento DAFNAE

Corso di laurea in Scienze e tecnologie viticole ed enologiche

Caratterizzazione chimica e funzionale di un estratto di
polisaccaridi da vinaccioli

Relatore
Dott. Simone Vincenzi

Laureando
Andrea Gragnaniello

Matricola n. 1224120

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



Ai miei genitori Massimo e Antonella

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 POLIFENOLI.....	7
1.2 SOSTANZE AZOTATE NEI VINACCIOLI.....	7
1.3 POLISACCARIDI NEI VINACCIOLI.....	8
1.4 SOSTANZE MINERALI.....	10
1.5 POLISACCARIDI NEL VINO.....	11
2. SCOPO	12
3. MATERIALI E METODI.....	12
3.1 Determinazione del contenuto proteico	
3.2 Analisi tannini con butanolo acido	
3.3 Analisi polifenoli quantitativa	
3.4 Determinazione polisaccaridi	
3.5 Determinazione zuccheri monomerici	
3.6 Determinazione distribuzione peso molecolare	
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	15
4.1 Caratterizzazione dei polisaccaridi	
4.2 Caratterizzazione dei polifenoli	
4.3 Caratterizzazione proteine	
5. CONCLUSIONI.....	21
6. BIBLIOGRAFIA.....	22



INTRODUZIONE

I vinaccioli o semi dell'uva, sono in numero da 1 a 4 e sono localizzati nell'endocarpo, la parte più interna dell'acino. Rappresentano dallo 0 al 6% del peso dell'acino e sono ricchi di diverse sostanze quali glucidi (35% in media), sostanze azotate (circa 6%), sostanze minerali (circa 4%).

I vinaccioli sono una fonte importante di composti fenolici nella vinificazione in rosso, infatti, essi contengono dal 20 al 55% dei polifenoli totali dell'acino in funzione della varietà (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018).

POLIFENOLI

I polifenoli possono essere classificati in due categorie : i flavonoidi (essenzialmente proantocianidine o tannini condensati, antociani, flavonoli) ed i non flavonoidi (acidi fenolici e stilbeni). I tannini condensati sono i polifenoli maggiormente presenti nei vinaccioli, sono polimeri costituiti da flavanoli monomeri che sono la catechina, l'epicatechina, l'epicatechina gallato e l'epigallocatechina. I tannini dei vinaccioli sono caratterizzati da una presenza di epicatechina gallato superiore al 20% nella loro composizione e da una dimensione media (o grado di polimerizzazione) inferiore a 10 unità (Prieur *et al.*, 1994).

I polifenoli, in particolare i tannini, hanno la proprietà di associarsi alle proteine e ai polisaccaridi, per dare combinazioni stabili. I due principali legami sono le interazioni idrofobiche e i legami idrogeno. È stato descritto un modello di interazioni fra tannini e proteine che resta ancora attuale. Se si è in presenza di piccole quantità di proteine, i polifenoli si dispongono in monostrato alla loro superficie diminuendone così il carattere idrofilo. Per effetto di questa interazione, le proteine man mano si agglomerano e finiscono per precipitare (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018).

Quando la concentrazione in proteine aumenta, i composti fenolici fungono da "leganti", instaurando dei ponti fra le diverse molecole. Le concentrazioni relative in tannini e proteine giocano così un ruolo importante nella formazione dei complessi tannini-proteine e nella loro precipitazione. I tannini condensati sono importanti nel vino rosso perché reagiscono con gli antociani portando a stabilizzazione del colore, determinano il livello di astringenza, reagiscono con numerosi prodotti di ossidazione eliminandoli (antiossidanti).

Le proprietà più ricercate di queste molecole sono le proprietà antiossidanti e salutistiche.

Un esempio sono le procianidine oligomeriche; l'estratto di semi d'uva contiene un'abbondanza di procianidine monomeriche, dimeriche e trimeriche denominate "procianidine oligomeriche" (Preethi Ravindranathan *et al.*,2018). (Preethi Ravindranathan *et al.*,2018) hanno messo in luce le proprietà antitumorali e altri effetti benefici sulla salute dell'uomo da parte di queste molecole.

SOSTANZE AZOTATE NEI VINACCIOLI

Vari studi sulla composizione proteica dei semi d'uva (Gianazza *et al.*,1989; Zhou *et al.*,2010) e in base alla estrazione sequenziale delle proteine (Osborne,1924), le proteine più presenti nei vinaccioli sono albumine (29,6%) e globuline (30,8%), mentre le proteine insolubili costituiscono il 35% delle proteine totali. Le albumine sono proteine solubili in acqua, costituite essenzialmente da enzimi e altre proteine. Le globuline sono invece delle proteine solubili in soluzione salina e nel caso dei vinaccioli costituiscono la maggior parte delle proteine di riserva. Quelle dei vinaccioli sono proteine esameriche costituite da monomeri, che sono composti da una subunità acida e da una subunità basica legate da un unico legame disolfuro (Bojòrquez-Velazquez *et al.*,2016). È stata dimostrata l'influenza positiva delle globuline sul colore del vino con una progressiva diminuzione dei valori di luminosità. Questa capacità di modulare le caratteristiche cromatiche del vino è significativamente correlato alla loro concentrazione (Francisco Chamizo-Gonzalez *et al.*,2022).

POLISACCARIDI NEI VINACCIOLI

I vinaccioli contengono diverse componenti, tra cui lipidi, proteine, polifenoli e polisaccaridi. I polisaccaridi sono sicuramente la componente meno studiata di questa matrice, e spesso anzi sono considerati un ostacolo per l'estrazione di componenti più "nobili" come i polifenoli. In un articolo, ad esempio, i vinaccioli sono stati trattati con una miscela di enzimi (pectinasi, tannasi, ecc.) proprio con lo scopo di degradare le pareti cellulari e aumentare la resa di estrazione dei composti fenolici (Chamorro *et al.*,2012). Allo stesso tempo l'elevata presenza di tannini rende difficoltosa l'estrazione dei polisaccaridi, andando a influenzare sia la resa che la purezza. L'estrazione in acqua calda è la tecnica più diffusa per semplicità e basso costo, anche se sono state applicate anche altre tecnologie come l'estrazione in condizioni alcaline (Teng *et al.*,2021), l'estrazione assistita da enzimi (Ticar *et al.*,2015) e l'estrazione con solventi eutettici (Xueying *et*

al.,2023). I polisaccaridi dei vinaccioli a seconda del metodo di estrazione, possono avere una distribuzione di peso molecolare compresa tra 58,8 e 72kDa (Xueying *et al.*,2023).

Type of GSPs	Average molecular weight (kDa)
GSP-D	60.238
GSP-T	71.994
GSP-H	58.800

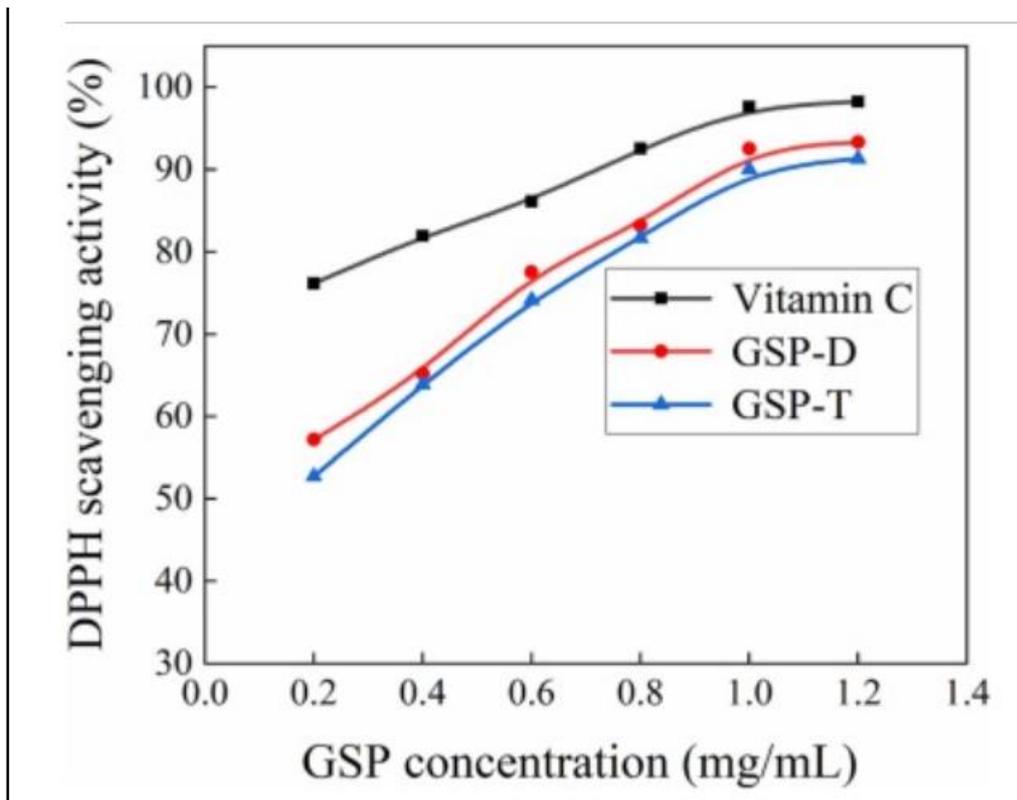
GSP(Grape seed polysaccharides) estratti con DES(D), t-butanolo (T) e acqua calda(H). Da (Xueying *et al.*,2023).

Anche la loro composizione varia in base al protocollo di estrazione, nel caso specifico dell'acqua calda che è il metodo più diffuso, si può osservare una prevalenza di galattosio e glucosio, ma anche una buona presenza di arabinosio e mannosio.

Monosaccharide compositions	Percentage (%) (GSP-D)	Percentage (%) (GSP-T)	Percentage (%) (GSP-H)
Mannose	20.987	21.128	14.950
Ribose	0.482	0.434	0.644
Rhamnose	1.778	2.800	2.504
Glucuronic acid	7.075	10.713	8.787
Galacturonic acid	0.274	0.267	1.600
Glucose	35.622	13.723	23.716
Galactose	16.638	29.923	30.408
Xylose	1.588	1.827	3.109
Arabinose	15.124	18.931	13.871
Fucose	0.413	0.253	0.412

Composizione media dei polisaccaridi di vinaccioli estratti con diversi protocolli : DES (D), T-butanolo (T) e acqua calda (H). Da (Xueying *et al.*,2023).

Per altri polisaccaridi estratti da vegetali (Chai *et al.*, 2018) o da funghi (Giavasis *et al.*, 2014) sono state dimostrate proprietà salutistiche, tra cui antitumorali, antinvecchiamento, antivirali, ipoglicemiche, ipolipidemiche e antiossidanti. Una parte di queste proprietà potrebbe essere dovuta anche alla co-presenza di composti fenolici. Anche per i polisaccaridi estratti dai vinaccioli è stata dimostrata una capacità antiossidante, comparabile con quella della vitamina C (Xueying *et al.*, 2023).



Le funzioni antiossidanti di questi polisaccaridi sono fondamentali perché si legano ai radicali liberi; studi precedenti hanno dimostrato come una maggiore quantità di mannosio e ramnosio nei polisaccaridi migliori questa capacità di legarsi ai radicali liberi, mentre maggiori quantità di galattosio, xilosio e arabinosio possono ridurre questa capacità (Ferreira, Passos, Madureira, Vilanova, Coimbra, 2015; Lin *et al.*, 2019). I polisaccaridi contribuiscono anche a livello enologico.

SOSTANZE MINERALI

Nei vinaccioli sono presenti sostanze minerali quali fosforo, potassio, calcio, magnesio, ferro, zinco, manganese, rame e sodio (Al Juhaimi, Fahad *et al.*, 2017). I cationi svolgono un ruolo importante in enologia, infatti alcuni di essi devono essere tenuti sotto controllo perché sono coinvolti nella formazione di precipitati (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018). Esempi possono essere il potassio, il calcio, il ferro trivalente e il rame che possono precipitare rispettivamente sotto forma di bitartrato, tartrato, fosfato e solfuro.

Il contenuto di magnesio nei vini è variabile, i suoi sali sono tutti solubili e non diminuiscono durante la fermentazione e la conservazione. Per i vini spumanti, i cationi alcalino-terrosi, in particolare il magnesio, potrebbero avere influenza sulle proprietà di spuma (Maujean *et al.*, 1988). Il calcio, essendo un catione con sali generalmente poco solubili, ha nei vini tenori dell'ordine di alcune decine di milligrammi per litro. Poiché è uno ione bivalente, la sua influenza sulla flocculazione e precipitazione dei colloidi è più potente rispetto al potassio (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018). Il sodio è presente in quantità limitata nel vino, con una concentrazione tipica compresa tra 10 e 40 mg/L. Tuttavia, tale concentrazione può aumentare se nel vino sono stati aggiunti bisolfito di sodio o se è stato trattato con bentoniti non sufficientemente purificate (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018).

Il manganese si trova in tutti i vini in quantità limitata, generalmente da 1 a 3 mg/L. Tuttavia, durante la macerazione e la fermentazione in rosso, si verifica un aumento del manganese, poiché i vinaccioli contengono tre volte più manganese rispetto alla buccia e trenta volte in più rispetto alla polpa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018).

Il ferro e il rame, sebbene presenti in basse quantità, svolgono un ruolo particolare nell'instabilità del vino, in quanto sono responsabili della formazione della casse ferrica e della rameica. L'eccesso di rame viene eliminato durante la fermentazione sotto forma di solfuri che sono fra i sali meno solubili e che vengono rimossi insieme ai lieviti e alle fecce che possiedono anche la proprietà di assorbire il rame (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018).

Infine, lo zinco è presente naturalmente nei mosti e vini in piccole tracce, tramite contaminazioni a livello di vigneto. Il contenuto in zinco generalmente non va oltre ai 4 mg/L, subisce un aumento grazie alla macerazione prolungata del mosto con le parti solide dell'uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2018). L'OIV ha stabilito un limite di 5 mg/L al tenore di zinco nel vino.

POLISACCARIDI NEL VINO

I polisaccaridi sono polimeri complessi di zuccheri che appartengono alla grande famiglia dei carboidrati, questi ultimi in enologia sono di estrema importanza perché intervengono praticamente in tutti i fenomeni molecolari che portano dall'uva al vino.

La presenza dei polisaccaridi nel vino è dovuta a due fattori : la solubilizzazione delle sostanze pectiche delle pareti cellulari dell'uva ; e il rilascio da parte dei microrganismi (lieviti, funghi, batteri). I polisaccaridi che derivano dall'uva sono principalmente costituiti da pectine.

Le pectine sono costituite quasi esclusivamente da catene di acido galatturonico parzialmente esterificate con metanolo, esse sono assenti nei mosti in quanto sono idrolizzate dall'azione degli enzimi pectolitici naturalmente presenti nelle uve, ma soprattutto per effetto degli enzimi di origine fungina che ormai vengono utilizzati comunemente per accelerare i processi di chiarifica.

Le pectine si dividono in pectine acide e neutre. Le prime sono formate da lunghe catene di acido galatturonico mentre le seconde sono prive di acido galatturonico. Nello specifico le pectine acide sono formate da omogalatturonani interrotti da strutture di ramnogalatturonani, nelle quali le unità di ramnosio si alternano a unità di acido galatturonico e tra le quali si inseriscono anche catene di arabinosio e galattosio. Le pectine neutre sono poco ramificate e non contengono acido galatturonico e sono costituite da arabinogalatturonani e ramnogalatturonani (Nicola Roma *et al.*,2021). Questi ultimi sono solubili nel mosto e possono essere liberi o legati a peptidi. Vidal *et al.*, (2003) hanno dimostrato che i principali polisaccaridi presenti nel vino sono arabinogalattani (42%), ramnogalatturonani (23%) derivanti dall'uva, e mannoproteine rilasciate dal lievito durante la fermentazione (35%). Sia le pectine acide sia quelle neutre hanno effetti importanti sul vino, ovvero la capacità di combinarsi con i polifenoli donando minor astringenza e la capacità di colmare i filtri. Inoltre, queste molecole hanno anche un effetto protettore contro le casse proteica dei vini bianchi (Waters *et al.*,1994; Pellerin *et al.*,1994).

Per quanto riguarda i polisaccaridi dei microrganismi, essi derivano dalle pareti cellulari di lieviti oppure da funghi filamentosi (*Botrytis cinerea*). Le pareti di *Botrytis* contengono soprattutto β -(1,3) glucani, ovvero polimeri del glucosio che passano nel mosto e nel vino grazie alla loro elevata solubilità , e grazie alla presenza dell'etanolo formano precipitati filamentosi che provocano gravi problemi al momento dei collaggi o delle filtrazioni.

I polisaccaridi provenienti dalle pareti dei lieviti , vengono liberati grazie all'autolisi parietale che porta alla liberazione di mannoproteine (Charpentier *et al.*,1986).

Le mannoproteine sono macromolecole costituite da catene di mannosio legate a corti residui proteici; rappresentano il 30-40% della parete cellulare del lievito (Nicola Roma *et al.*,2021).

Queste sostanze vengono rilasciate durante la fermentazione (Llauberes *et al.*,1987) e anche durante l'affinamento sulle fecce grazie all'autolisi (Feuillat *et al.*,1989). Il lievito ha la parete composta da β -glucani e da mannoproteine, i primi formano uno strato subito dopo la membrana (dividendosi in fibroso e amorfo) mentre le mannoproteine sono lo strato più esterno.

Queste molecole svolgono un ruolo diretto sull'astringenza, derivante dalla loro combinazione con i composti fenolici dell'uva (Ribéreau-Gayon *et al.*,2018). Danno maggiore stabilità nei confronti delle precipitazioni tartariche in quanto agiscono sulla prima fase della precipitazione, quando si formano i nuclei di cristallizzazione e danno maggior stabilità nei confronti delle precipitazioni proteiche (Gonçalves *et al.*,2002). Essendo composte da una parte proteica e una zuccherina, queste sostanze possono interagire anche con i composti aromatici e quindi potenzialmente modificare le proprietà sensoriali del vino (Lubbers *et al.*,1994; Lavigne e Dubourdieu,1996; Dufour e Bayonove,1999). Inoltre, migliorano la qualità del perlage, adsorbono ed allontanano i tiori maleodoranti, hanno un'influenza positiva sulla "corposità" del vino.

I polisaccaridi dei lieviti intervengono anche nei problemi di filtrazione (Wurcherpfenning *et al.*,1984); l'effetto colmatante di questi colloidali si manifesta essenzialmente sui vini giovani.

SCOPO

Lo scopo di questa tesi è quello di caratterizzare dal punto di vista chimico un estratto sperimentale di polisaccaridi estratti da vinaccioli. L'estratto è stato fornito da un'azienda di prodotti enologici, e l'obiettivo è quello di verificare se questo estratto possa avere delle caratteristiche idonee all'utilizzo come coadiuvante enologico.

MATERIALI E METODI

Determinazione del contenuto proteico

La determinazione del contenuto proteico è stata eseguita secondo il principio del Kjeldahl. 100 mg di polvere sono stati pesati e messi in un pallone da idrolisi con 4 mL di H₂SO₄. Il campione è stato quindi riscaldato a 440°C e fatto bollire per 4 minuti nel mineralizzatore (Digesdahl, Hach Company, Ames, Iowa, Stati Uniti); terminata la carbonizzazione sono stati aggiunti 16 mL di H₂O₂ e fatti bollire per 1 minuto, o fino a che la soluzione non risulta completamente limpida. Il campione è stato lasciato raffreddare ed è stato diluito a un volume finale di 100 mL con H₂O demineralizzata.

Per la retta di taratura ($R^2=0,9998$) è stata utilizzata una soluzione 250 mg/L di solfato d'ammonio da cui sono state ottenute 5 diluizioni.

Per la quantificazione dell'azoto totale è stato usato il reattivo di Nessler. Le soluzioni di analisi sono state preparate come segue:

50 µL NaOH 6M + 100 µL campione o solfato d'ammonio + 1,1 mL H₂O + 50 µL reattivo Nessler.

Dopo aver atteso 5 minuti per lo sviluppo della reazione, sono state fatte le letture di assorbanza allo spettrofotometro a 425 nm.

I valori vengono così utilizzati:

$$\frac{mg}{L} N = (A_{425} \times m) + q$$

Dove:

m pendenza retta di taratura proteine

q intercetta retta di taratura proteine.

I milligrammi/litro di azoto si moltiplicano per la quantità di campione

$$\mu g_N = \frac{mg}{L} N \times 100$$

Dove:

µg_N= microgrammi di azoto totale

Il valore di azoto totale è convertito nella concentrazione in mg/g di proteine totali moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di conversione Kjeldahl 6,25

$$\frac{mg}{g}^p = \frac{\mu g/1000}{mg_c/1000} \times 6,25$$

Dove:

mg_c = milligrammi di campione

Analisi tannini con butanolo acido

È stato utilizzato il metodo di (Bathe-Smith 1975). Il campione è stato opportunamente diluito con acqua distillata, quindi sono stati prelevati 2 mL di campione e posti in una provetta (A); a questi sono stati aggiunti 6 mL della miscela di reazione contenente butanolo acidificato (500 mL HCL 37% + 500 mL n-butanolo + 150 mg di $Fe_2(SO_4)_3$). Dopo aver omogeneizzato il tutto, metà di questa miscela è stata travasata in una provetta dotata di tappo a vite e guarnizione in teflon (B). Le provette B sono state poste in acqua a 100°C per 30 min mentre le altre (A) per lo stesso tempo sono state poste al buio. Trascorso il tempo necessario, le provette A sono state fatte raffreddare per 10 minuti.

Successivamente si è proceduto con la lettura spettrofotometrica di entrambe le provette (A e B) a 550 nm in cuvette dal cammino ottico di 10 mm, usando l'acqua come bianco. La differenza di assorbanza tra A e B, rapportata alla curva di taratura preparata con tannini purificati di vinaccioli in dosi da 6.25 a 100 mg/L ha permesso di calcolare la concentrazione in tannini.

Analisi polifenoli quantitativa

L'analisi della concentrazione fenolica è stata eseguita sulla base della procedura sviluppata da Singleton e Rossi (1965). La reazione è stata eseguita direttamente in micropiastre ELISA mettendo nei singoli pozzetti 20 μ l di campione, opportunamente diluito in acqua, e 100 μ l di reagente di Folin-Ciocalteu diluito 1/10 con acqua. Dopo aver aggiunto 80 μ l di una soluzione 7,5% p/v di $NaCO_3$ è seguita un'incubazione a 40°C per 30 minuti. Si è proceduto quindi con la lettura a 725 nm tramite lettore di piastre Microplate Reader LT-4000 equipaggiato con software Manta. La

retta di taratura è stata preparata mediante diluizioni seriali di acido gallico da 0.2 a 0.0125 mg/ml.

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.

Determinazione zuccheri monomerici

Per determinare l'eventuale presenza di zuccheri semplici il campione è stato opportunamente diluito in acqua e poi sottoposto ad analisi enzimatica con analizzatore enzimatico Qubio di R-Biopharm utilizzando un kit enzimatico glucosio-fruttosio (Steroglass).

Determinazione distribuzione peso molecolare

L'estratto opportunamente diluito è stato caricato su una colonna Acquagel PL-OH montato su un HPLC Waters dotato di rilevatore rifrattometrico. La separazione è avvenuta in condizioni isocratiche, la determinazione del peso molecolare è avvenuta grazie all'iniezione di standard di peso molecolare noto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

CARATTERIZZAZIONE DEI POLISACCARIDI

Tramite i risultati ottenuti in laboratorio, si è potuto formulare una caratterizzazione sia quantitativa che qualitativa.

In un primo momento è stata valutata la solubilità del prodotto risospingendolo in acqua deionizzata o in etanolo 15% (per simulare quello che potrebbe essere il contenuto alcolico di un vino). In entrambi i casi il prodotto è risultato completamente solubile, per cui tutte le analisi successive sono state condotte con l'estratto risospeso in acqua. Una prima analisi è stata eseguita per calcolare il contenuto totale di polisaccaridi con il metodo di Dubois (Dubois *et al.*,1956) che prevede una depolimerizzazione acida di tutti i composti polisaccaridici e determinazione colorimetrica dei monomeri liberati. Dopo aver preparato una soluzione a 10mg/ml è stata determinata la quantità di carboidrati sull'estratto (Grafico 1).

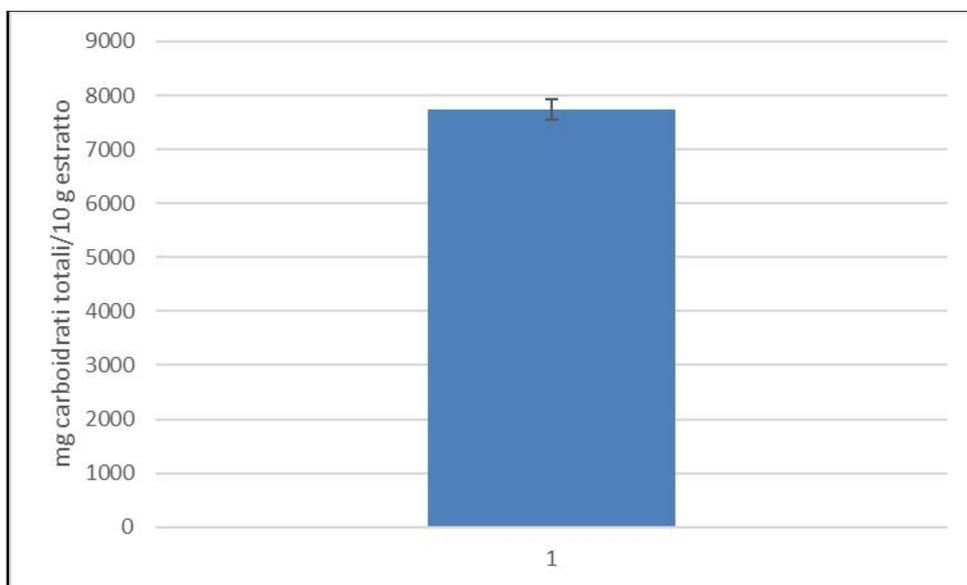


Grafico 1. Contenuto di carboidrati totali nell'estratto di vinaccioli.

Il risultato permette di dimostrare che l'estratto è effettivamente costituito in prevalenza da carboidrati, con un contenuto pari al 77% del peso totale.

Una successiva analisi è stata eseguita sempre con lo stesso metodo di quantificazione, ma separando i polisaccaridi veri e propri dai composti a basso PM mediante precipitazione con etanolo all'80% (Grafico 2).

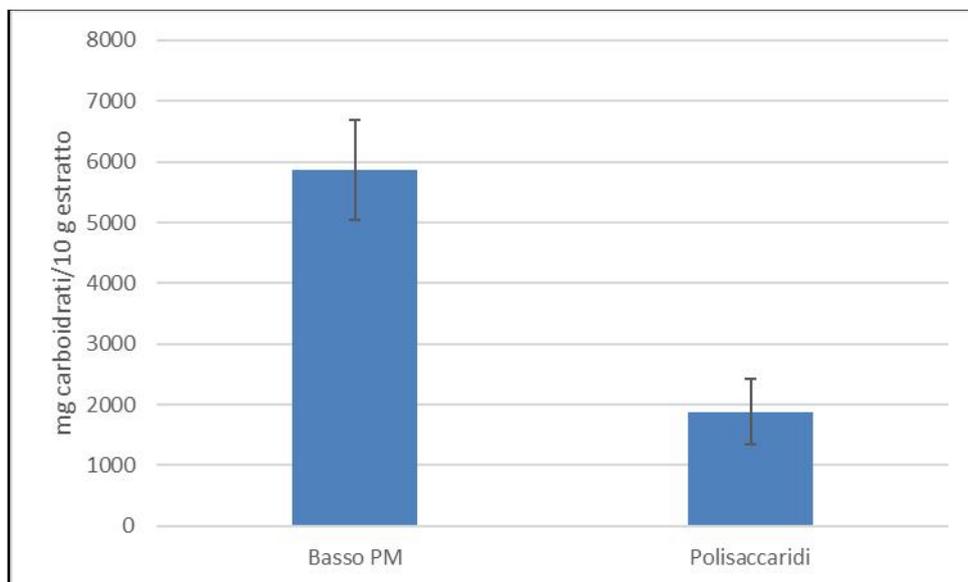


Grafico 2. Contenuto di carboidrati nell'estratto di vinaccioli separati in frazione a basso PM e in frazione polisaccaridica mediante precipitazione con etanolo 80%.

Questa seconda analisi ha messo in evidenza come in realtà gran parte dei carboidrati presenti nell'estratto sia costituita da una frazione a basso peso molecolare, che non può essere definita polisaccaridica. I polisaccaridi effettivi sono circa 19% del peso totale dell'estratto, ciò significa che solo il 24% dei carboidrati totali presenti nell'estratto sono effettivamente polisaccaridi.

Una ulteriore analisi di tipo più qualitativo è stata eseguita mediante HPLC usando una colonna di size exclusion che permette di separare le molecole in base al loro peso molecolare (Figura 1).

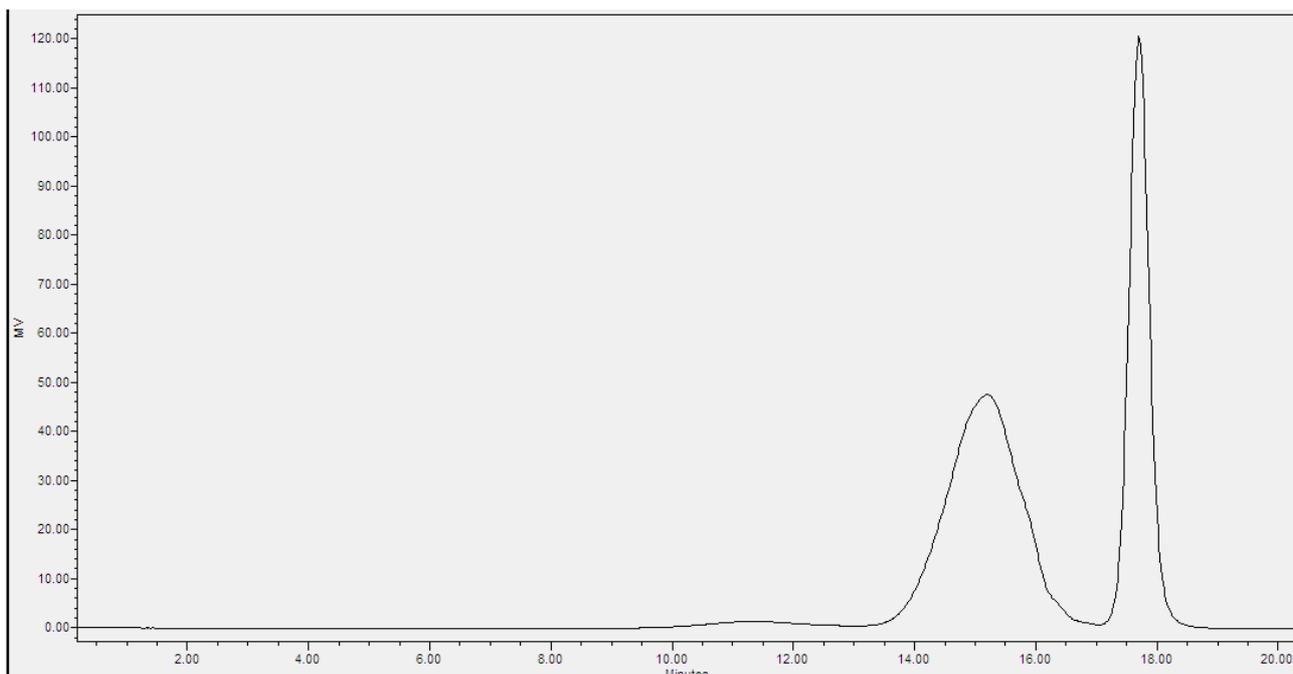


Figura 1. Profilo HPLC con colonna Acquagel dell'estratto di vinaccioli.

Dal profilo cromatografico è evidente che l'estratto è composto prevalentemente da carboidrati che distribuiscono in 3 classi di peso molecolare.

Mediante calibrazione con standard di polisaccaridi a peso molecolare noto, è stato possibile determinare la massa delle singole classi di composti (Tabella 1).

Il picco più piccolo (retention time 17.7 minuti) che costituisce il 40.4% dell'area totale ha un PM calcolato di 244 Da, che con la dovuta approssimazione potrebbe corrispondere a un monosaccaride (glucosio=180 Da).

RT	Peso molecolare	%
11,4	132086,0	1,99
15,18	3026,0	57,61
17,7	244,1	40,4

--	--	--

Tabella 1. Distribuzione di PM dei carboidrati nell'estratto di vinaccioli.

Il secondo picco è evidentemente costituito da una frazione oligosaccaridica, che potrebbe corrispondere a polimeri costituiti da 15-20 unità monomeriche.

Infine, il picco meno abbondante (2% dell'area totale) è l'unico che può essere effettivamente definito polimero, con un peso molecolare di oltre 130 kDa.

Le distribuzioni percentuali non corrispondono a quelle determinate con il metodo di Dubois, perché la risposta al rifrattometro non è sempre proporzionale al contenuto totale di zuccheri, inoltre bisogna considerare che nella frazione a PM intermedio, che costituisce oltre il 50% dell'area totale, potrebbero essere presenti delle frazioni solubili in etanolo 80% (che verrebbero considerate a basso PM) e delle altre insolubili (che verrebbero invece considerate appartenenti alla classe dei polisaccaridi).

In ogni caso, anche questo tipo di analisi conferma che l'estratto è costituito da polisaccaridi solo in minima parte.

CARATTERIZZAZIONE DEI POLIFENOLI

Dall'analisi dei polisaccaridi è emerso che l'estratto è costituito per il 77% da carboidrati. Si è voluto indagare sulla natura del restante 23% del peso totale dell'estratto. Considerato il colore abbastanza marcato dell'estratto e il fatto che i vinaccioli sono notoriamente ricchi di polifenoli, è stata applicata una determinazione dei polifenoli totali (Singleton e Rossi, 1965) sull'estratto risospeso in acqua (Grafico 3).

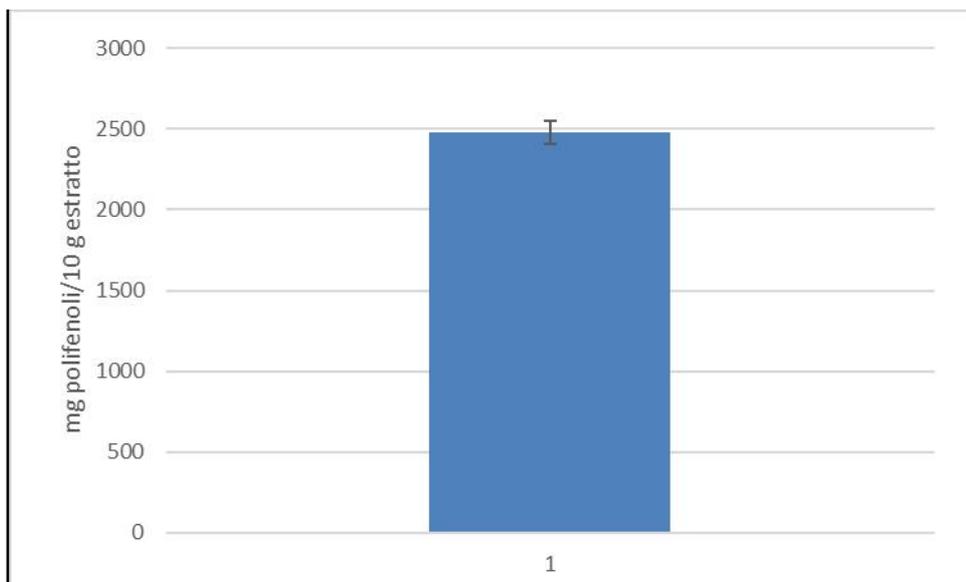


Grafico 3. Contenuto di polifenoli nell'estratto di vinaccioli

I risultati hanno fatto emergere che praticamente il resto dell'estratto è costituito da polifenoli, che risultano essere quasi il 25% del peso totale.

I composti fenolici presenti nell'estratto potrebbero avere degli effetti organolettici importanti quando aggiunti al vino, per cui diventa importante determinarne la natura. Considerata la composizione naturale dei vinaccioli, ricchi di OPC (Oligomeric Proanthocyanidin), si può supporre che questi composti possano essere dei tannini condensati. Una loro aggiunta al vino potrebbe avere degli effetti positivi (contribuendo alla stabilizzazione del colore mediante interazione antociani – tannini), ma anche degli effetti negativi contribuendo eccessivamente all'astringenza.

Per verificarlo è stata applicata l'analisi del butanolo acido, che mediante depolimerizzazione in ambiente acido dei tannini condensati, permette una loro quantificazione allo spettrofotometro (Grafico 4).

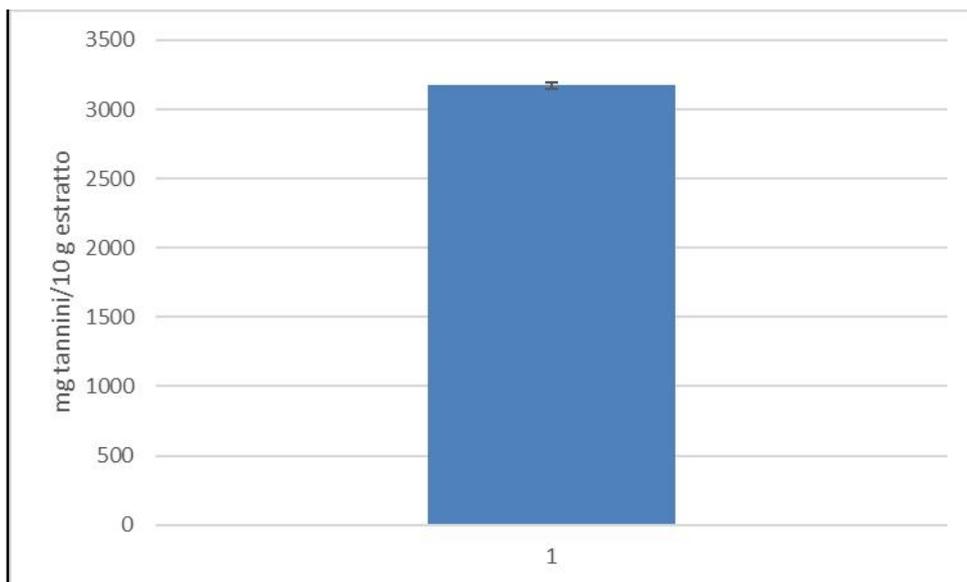


Grafico 4. Contenuto di tannini condensati nell'estratto.

L'analisi ha mostrato, come atteso, la presenza di tannini condensati. Il contenuto è apparentemente più alto rispetto al contenuto totale di polifenoli (31% contro 25%), ma questo potrebbe essere un artefatto dovuto all'interferenza dell'elevato contenuto di polisaccaridi presenti nell'estratto. Infatti, la reazione avviene a 100°C e a quella temperatura gli zuccheri monomerici presenti nell'estratto potrebbero caramellizzare andando ad interferire nella determinazione spettrofotometrica dei tannini stessi. (P.Schofield *et al.*, 2001) hanno riscontrato diverse problematiche nell'analisi del butanolo acido, come la scelta di standard appropriati oppure la presenza di tannini condensati insolubili nei comuni solventi.

In ogni caso è evidente che praticamente gran parte (se non tutti) i polifenoli presenti nell'estratto sono costituiti da tannini condensati.

CARATTERIZZAZIONE PROTEINE

Infine, un'altra classe di macromolecole potrebbe essere presente nell'estratto, ed è quella delle proteine. Come riportato nell'introduzione, i vinaccioli contengono mediamente 10% di proteina, per cui un'estrazione di questa materia prima potrebbe portarsi dietro una quota di proteine.

L'analisi in questo caso è stata eseguita con il metodo Kjeldahl, ed è risultato che l'estratto contiene solo 1.09% di proteina.

CONCLUSIONI

Un nuovo estratto di polisaccaridi di vinaccioli (probabilmente un by-product della lavorazione dei vinaccioli per estrarne i polifenoli) è stato proposto per l'utilizzo come coadiuvante per il trattamento dei mosti e dei vini.

La caratterizzazione della frazione polisaccaridica ha messo in evidenza come l'estratto sia in effetti costituito in prevalenza da carboidrati (77%), ma che solo 24% di questi sono effettivamente polisaccaridi. Questo da una parte determina una minore efficacia del prodotto, in quanto la quantità effettiva di polisaccaridi è inferiore a quanto atteso, ma dall'altra causa anche un rischio di rifermentazione, in quanto con il prodotto andremo ad introdurre nel vino degli zuccheri monomerici potenzialmente fermentescibili, con una riduzione della stabilità microbiologica del prodotto.

Inoltre, l'analisi dei polifenoli ha mostrato che l'estratto è costituito per circa $\frac{1}{4}$ da tannini, che vanno tenuti in considerazione nell'utilizzo del prodotto: se da una parte è vero che i tannini condensati possono partecipare alla stabilizzazione del colore nei vini rossi, dall'altra un loro eccesso potrebbe causare delle interferenze organolettiche, soprattutto se il prodotto venisse applicato a dei vini bianchi.

In definitiva, l'estratto nella sua attuale formulazione non corrisponde alle caratteristiche richieste da un coadiuvante enologico, ma degli ulteriori passaggi di purificazione potrebbero portare all'ottenimento di un prodotto più puro e con potenzialità enologiche superiori.

BIBLIOGRAFIA

Works Cited

- Al Juhaimi, F., et al. "Bioactive Properties, Fatty Acid Composition and Mineral Contents of Grape Seed and Oils." *South African Journal of Enology & Viticulture*, vol. 38, no. 2, Oct. 2017, <https://doi.org/10.21548/38-1-1042>. Accessed 7 Nov. 2023.
- Bate-Smith, E.C. "Phytochemistry of Proanthocyanidins." *Phytochemistry*, vol. 14, no. 4, Apr. 1975, pp. 1107–1113, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85197-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85197-1).
- Chai, Zhifang, et al. *Preparation, Characterization, Antioxidant Activity and Protective Effect against Cellular Oxidative Stress of Polysaccharide from Cynanchum Auriculatum Royle Ex Wight*. Vol. 119, 1 Nov. 2018, pp. 1068–1076, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.024>. Accessed 18 May 2023.
- Chamizo González, Francisco, et al. "Estudio de La Interacción de La Globulina 11S de Semilla de Uva Con Compuestos Fenólicos Mediante Colorimetría Diferencial." *Upcommons.upc.edu*, Universitat Politècnica de Catalunya, 1 July 2022, <hdl.handle.net/2117/373264>. Accessed 7 Nov. 2023.
- Chamorro, S., et al. "Changes in Polyphenol and Polysaccharide Content of Grape Seed Extract and Grape Pomace after Enzymatic Treatment." *Food Chemistry*, vol. 133, no. 2, July 2012, pp. 308–314, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.031>. Accessed 7 Sept. 2019.
- Charpentier, C., et al. "Alteration of Cell Wall Structure in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Bayanus* during Autolysis." *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 5, Aug. 1986, pp. 405–413, <https://doi.org/10.1007/bf00294598>. Accessed 8 Mar. 2020.
- Chen, Xueying, et al. "Extraction and Purification of Grape Seed Polysaccharides Using PH-Switchable Deep Eutectic Solvents-Based Three-Phase Partitioning." *Food Chemistry*, vol. 412, June 2023, p. 135557, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135557>. Accessed 3 Feb. 2023.
- DuBois, Michel., et al. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, Mar. 1956, pp. 350–356.

- Dufour, Claire, and Claude L. Bayonove. "Influence of Wine Structurally Different Polysaccharides on the Volatility of Aroma Substances in a Model System." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 2, 5 Jan. 1999, pp. 671–677, <https://doi.org/10.1021/jf9801062>. Accessed 4 Dec. 2022.
- Esaú Bojórquez-Velázquez, et al. *Purification and Biochemical Characterization of 11S Globulin from Chan (Hyptis Suaveolens L. Poit) Seeds*. Vol. 192, 1 Feb. 2016, pp. 203–211, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.099>. Accessed 31 May 2023.
- Ferreira, Sónia S., et al. "Structure–Function Relationships of Immunostimulatory Polysaccharides: A Review." *Carbohydrate Polymers*, vol. 132, Nov. 2015, pp. 378–396, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.079>.
- Feuillat, M., et al. *Der Ausbau von Weißweinen Der Region Bm·gund Auf Dem Hefetrub II. Die Veränderungen Der Makrnmoleküle: Polysaccharide Und Proteine*. 1989.
- Gianazza, Elisabetta, et al. "Characterization of the Major Proteins from Vitis Vinifera Seeds." *Plant Science*, vol. 62, no. 1, Jan. 1989, pp. 73–81, [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90191-x](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90191-x). Accessed 14 Mar. 2022.
- Giavasis, Ioannis. "Bioactive Fungal Polysaccharides as Potential Functional Ingredients in Food and Nutraceuticals." *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 26, Apr. 2014, pp. 162–173, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>.
- Gonçalves, Fernando, et al. "Characterization of White Wine Mannoproteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, Oct. 2002, pp. 6097–6101, <https://doi.org/10.1021/jf0202741>.
- Lin, Yuyang, et al. "Microwave-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction of Diverse Polysaccharides from Lentinus Edodes: Process Optimization, Structure Characterization and Antioxidant Activity." *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 136, Sept. 2019, pp. 305–315, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.064>. Accessed 3 Oct. 2022.
- Llaubères, Rose-Marie, et al. "Exocellular Polysaccharides From Saccharomyces in Wine." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 41, no. 3, 1987, pp. 277–286, <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740410310>. Accessed 2 Feb. 2021.

- Lubbers, Samuel, et al. "Influence of Yeast Walls on the Behavior of Aroma Compounds in a Model Wine." *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 45, no. 1, 1 Jan. 1994, pp. 29–33, <https://doi.org/10.5344/ajev.1994.45.1.29>. Accessed 8 Nov. 2023.
- Maujean, A, et al. *Bull. OIV*. 1988, pp. 683–684.
- Pascal Ribéreau-Gayon, et al. *Trattato Di Enologia*1. 2018.
- Pellerin', P, et al. "EFFET de POLYSACCHARIDES SUR LA FORMATION de TROUBLE PROTÉIQUE DANS UN VIN BLANC." *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, vol. 28, 1994, pp. 213–225. Accessed 7 Nov. 2023.
- Preethi Ravindranathan, et al. "Mechanistic Insights into Anticancer Properties of Oligomeric Proanthocyanidins from Grape Seeds in Colorectal Cancer." *Carcinogenesis*, vol. 39, no. 6, 19 Apr. 2018, pp. 767–777, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy034>. Accessed 17 Oct. 2023.
- Prieur, Corinne, et al. "Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds." *Phytochemistry*, vol. 36, no. 3, June 1994, pp. 781–784, [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)89817-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)89817-9). Accessed 7 Nov. 2020.
- Roma, Nicola. "Studio Dell'interazione Tra Polisaccaridi E Bentonite." *Thesis.unipd.it*, 2021, <hdl.handle.net/20.500.12608/32358>. Accessed 7 Nov. 2023.
- Schofield, P, et al. "Analysis of Condensed Tannins: A Review." *Animal Feed Science and Technology*, vol. 91, no. 1-2, May 2001, pp. 21–40, [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(01)00228-0).
- Singleton, V. L., and Joseph A. Rossi. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, no. 3, 1965, pp. 144–158, <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
- Teng, Cong, et al. "Structural Characterization and Antioxidant Activity of Alkali-Extracted Polysaccharides from Quinoa." *Food Hydrocolloids*, vol. 113, 1 Apr. 2021, pp. 106392–106392, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106392>. Accessed 30 Aug. 2023.
- Ticar, Bernadeth F, et al. "Enzyme-Assisted Extraction of Anticoagulant Polysaccharide from *Liparis Tessellatus* Eggs." *International Journal of Biological Macromolecules*,

vol. 74, 1 Mar. 2015, pp. 601–607, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.002>. Accessed 7 Nov. 2023.

Valérie Lavigne-Cruège, and Denis Dubourdieu. “Demonstration and Interpretation of the Yeast Lee Ability to Adsorb Certain Volatile Thiols Contained in Wine.” *OENO One*, vol. 30, no. 4, 31 Dec. 1996, pp. 201–201, <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1996.30.4.1096>. Accessed 8 Nov. 2023.

Vidal, Stéphane, et al. “The Polysaccharides of Red Wine: Total Fractionation and Characterization.” *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, no. 4, Dec. 2003, pp. 439–447, [https://doi.org/10.1016/s0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/s0144-8617(03)00152-8). Accessed 21 Aug. 2022.

Waters, Elizabeth J., et al. “A Saccharomyces Mannoprotein That Protects Wine from Protein Haze.” *Carbohydrate Polymers*, vol. 23, no. 3, Jan. 1994, pp. 185–191, [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90101-5). Accessed 8 Mar. 2020.

Wucherpennig, Karl, et al. “Ber Den Einflu Der von Der Hefe Abgegebenen Substanzen Auf Die Filtrierbarkeit Des Weines.” *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, vol. 179, no. 2, 1 Aug. 1984, pp. 119–124, <https://doi.org/10.1007/bf01043262>. Accessed 8 Nov. 2023.

Zhou, Ting, et al. “Purification and Characterization of a New 11S Globulin-like Protein from Grape (*Vitis Vinifera* L.) Seeds.” *European Food Research and Technology*, vol. 230, no. 5, 6 Jan. 2010, pp. 693–699, <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1211-0>. Accessed 22 Mar. 2023.