

1222·2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie viticole ed enologiche

TITOLO

Studio dell'interazione tra polisaccaridi e bentonite

Study of the interaction between polysaccharides and bentonite

Relatore:

Prof. Simone Vincenzi

Laureando Nicola Roma

Matricola n. 1192544

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



## Sommario

1.Riassunto .....	4
2.Abstract .....	5
3.La bentonite .....	6
3.1 La struttura della bentonite .....	7
3.2 Tipi di bentonite .....	9
3.3 Proteine e la deproteinizzazione nel vino .....	12
3.4 L'interazione tra bentonite e proteine .....	14
3.5 Test di stabilità proteica .....	15
3.6 Aspetti negativi uso della bentonite .....	17
3.7 I Polisaccaridi .....	18
3.8 Le mannoproteine .....	19
4.Scopo: Possibile interazione tra polisaccaridi e bentonite .....	20
5. Materiali e metodi .....	21
5.1.1 Bentoniti .....	21
5.1.2 Altri reagenti .....	21
5.2.1 Preparazione vino modello .....	23
5.2.2 Determinazione Polisaccaridi .....	23
5.2.3 Determinazione Proteine .....	24
6. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	25
6.1 TEST CON BENTONITE PERFORMA .....	26
6.1.1 Effetto della bentonite sulle proteine .....	26
6.1.2 Effetto della bentonite sui polisaccaridi .....	28
6.1.3 Effetto dei polisaccaridi sull'interazione bentonite-proteine .....	30
6.2 TEST CON BENTONITE PENTAGEL .....	32
6.2.1 Effetto della bentonite sulle proteine .....	32
6.2.2 Effetto della bentonite sui polisaccaridi .....	34
6.2.3 Effetto dei polisaccaridi sull'interazione bentonite-proteine .....	35
7.Conclusioni .....	36
8.Bibliografia .....	37

## ***1.Riassunto***

La bentonite è uno dei principali e più utilizzati coadiuvanti nel settore enologico, noto per la sua azione chiarificante e stabilizzante nel vino. Tale capacità è dovuta alla capacità di legare e far precipitare diverse sostanze in sospensione nel vino. La bentonite risulta essere uno dei principali prodotti con cui si evitano i problemi dovuti alla casse proteica cioè la formazione di precipitati e intorbidimenti in bottiglia a causa delle proteine. La sua finalità e funzionalità non sono in discussione ma la conoscenza sull'interazione con le altre sostanze come i polisaccaridi è poco nota. In questa tesi sono state preparate delle soluzioni modello, sulle quali è stato verificato l'effetto della bentonite nei confronti della componente polisaccaridica e proteica. Tra le sostanze di origine polisaccaridica sono stati testati polisaccaridi del mosto e mannoproteine, costituenti della parete cellulare che vengono rilasciate in seguito alla morte e all'autolisi del lievito. I polisaccaridi in generale hanno un effetto positivo sulla qualità del vino; infatti, il contatto in fase post fermentativa permette un ottimo arricchimento di mannoproteine con riscontri importanti sulle qualità organolettiche del vino finito. L'eventuale interazione tra bentonite e polisaccaridi, perciò, potrebbe portare, insieme alla stabilizzazione proteica, anche una riduzione di queste molecole con una conseguente perdita organolettica nel prodotto finito.

In questo caso studio si è riscontrato che l'effetto di chiarifica della bentonite nei confronti dei polisaccaridi è molto limitato, ma può essere influenzato da variabili come la composizione del vino.

## ***2.Abstract***

Bentonite is one of the main and most used adjuvants in the wine sector, known for its clarifying and stabilizing action in wine. This ability is due to its affinity for proteins and other suspended substances in the wine. Bentonite appears to be one of the main products to decrease the formation of precipitates and cloudiness in the bottle due to proteins. Its purpose and functionality are not in question but the knowledge on the interaction with other substances such as polysaccharides is little known. In this thesis model wines were prepared, verifying the effect of bentonite on the polysaccharide and protein component. Among the substances of polysaccharide origin, grape polysaccharides and mannoproteins were tested. Mannoproteins are constituents of the cell wall that are released following the death and autolysis of the yeast. In general polysaccharides show positive effect on wine quality, in fact the contact in the post-fermentation phase allows an excellent enrichment of these substances with improvement of the organoleptic qualities of the finished wine. The possible interaction between bentonite and polysaccharides, therefore, would lead to a reduction of these substances in the wine, resulting in a quality loss in the finished product.

In this thesis it was found that the clarification effect of bentonite on polysaccharides is very limited, but it can be influenced by variables such as the composition of the wine.

### ***3.La bentonite***

La bentonite prende il nome da Fort Benton (Montana, Stati Uniti), luogo dove è stata rinvenuta per la prima volta ed è un tipo di argilla naturale composta principalmente da montmorillonite, perciò, a tutti gli effetti è un fillosilicato. Tale minerale argilloso è appartenente alla categoria dei prodotti enologici inorganici, viene soprattutto sfruttato per dare limpidezza e stabilità ai vini, soprattutto quelli bianchi, requisito fondamentale che ne assicura l'accettabilità commerciale e ne influenza la qualità (Langourieux S., Crouzet J.C., 1997). La bentonite, che non presenta limiti di legge, è il coadiuvante maggiormente utilizzato per la stabilizzazione proteica nel vino (Waters et al., 2005). Nel settore enologico, la sua diffusione risale agli anni '50 quando sostituì il caolino nel trattamento contro gli intorbidamenti causati dalle proteine nei vini bianchi (Ribéreau-Gayon et al., 2017). Si trova in commercio in diverse forme, difatti la distinzione principale è quella tra bentonite naturale (sodica, calcica) o attivata (con sodio, potassio...). Sebbene vengano ancora utilizzate bentoniti di origine naturale, sono al giorno d'oggi maggiormente richieste quelle attivate con acido solforico o sali alcalini, che permettono di "caricare" la bentonite con determinati ioni  $H^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  (Ribereau-Gayon et al., 2017). Il risultato di tale lavorazione porta all'origine delle cosiddette bentoniti acide, sodiche o calciche attivate.

Per quanto riguarda le buone pratiche di utilizzo della bentonite è necessario innanzitutto svolgere una idratazione abbastanza lunga per favorire il rigonfiamento e la separazione ottimale delle lamelle. L'assorbimento di acqua e successivo rigonfiamento è una delle proprietà principali della bentonite, differenziandosi a seconda della tipologia di bentonite (Pala, 2018). Ciò nonostante, troviamo anche sul mercato bentoniti molto fini (minori dimensioni dei granuli comportano comunque una maggiore superficie e una maggior velocità di idratazione) o bentoniti con idratazione rapida. Generalmente viene consigliato d'idratare la bentonite con un rapporto 1:10-1:20 con acqua, ma mai direttamente con il vino. Per quanto riguarda le tempistiche, l'idratazione deve essere fatta con largo anticipo ma è anche importante avere una buona omogenizzazione. Questo porta alla formazione

della tipica pasta gelatinosa di color grigiastro. L'azione che svolge la bentonite a contatto con la soluzione vinosa avviene già dopo 30 secondi (Blade e Boulton, 1988). Le motivazioni che portano a mantenere per un tempo più prolungato la bentonite all'interno dei vasi vinari con il vino sono il favorire un'azione più omogenea possibile nella massa e facilitare la sedimentazione di tale minerale argilloso se non si dispone di una centrifuga per accelerare il processo di separazione.

### ***3.1 La struttura della bentonite***

Dal punto di vista strutturale la bentonite viene definita come un silicato idrato d'alluminio, composta essenzialmente da montmorillonite con una struttura semplificata ( $\text{Al}_2\text{O}_3, 4\text{SiO}_2, n\text{H}_2\text{O}$ ) (Ribéreau-Gayon et al., 1977). Essa contiene una serie di diversi cationi scambiabili come magnesio, calcio e sodio che ne influenzano in modo rilevante le proprietà chimico-fisiche. La concentrazione di tali elementi varia in base all'area di provenienza della bentonite, difatti le bentoniti tedesche e africane contengono soprattutto calcio mentre quelle statunitensi sono ricche di sodio. Come già detto, le bentoniti sodiche sono in assoluto quelle più utilizzate e quelle che meglio si prestano alle lavorazioni in cantina.

Uno dei principali costituenti della bentonite risulta essere per l'appunto montmorillonite, un minerale argilloso trimorfico facente parte nel gruppo delle smectiti. La struttura della montmorillonite a fogli distanziati dà delle eccellenti proprietà colloidali, tra cui forte capacità di rigonfiamento in mezzo acquoso, grande superficie di adsorbimento ed elevata carica negativa (Maujean et al., 1993). La sua proprietà fondamentale è quella di rigonfiarsi in presenza d'acqua fino a raddoppiare il volume originario dando luogo a un gel reversibile (Cappelli et al., 2014) (effetto tixotropico). I fogli sono impilati in maniera più o meno ordinata. Ciascuno di loro è costituito da due file di tetraedri, tra loro concatenati, che portano alla sommità degli atomi di ossigeno con al centro un atomo di silicio. Tra queste due file si trova una serie di strutture ottaedriche, legate tra di loro attraverso atomi di ossigeno o gruppi

ossidrilici, e l'alternanza tra le file tetraedriche-ottaedriche-tetraedriche, crea la struttura trimorfica, tipica delle bentoniti. Nella parte centrale tre ottaedri su quattro contengono ioni alluminio e magnesio. Poiché le file centrali contengono, in posizione centrale ioni, all'inizio si forma una differenza di carica con la fila costituita da ottaedri. Si determina così la comparsa in una carica negativa sulla superficie interfogliare che consente di mantenere i fogli separati tra di loro ad una certa distanza Interfogliare, che varia a seconda dell'origine della bentonite ed è misurabile per diffrazione a raggi X.

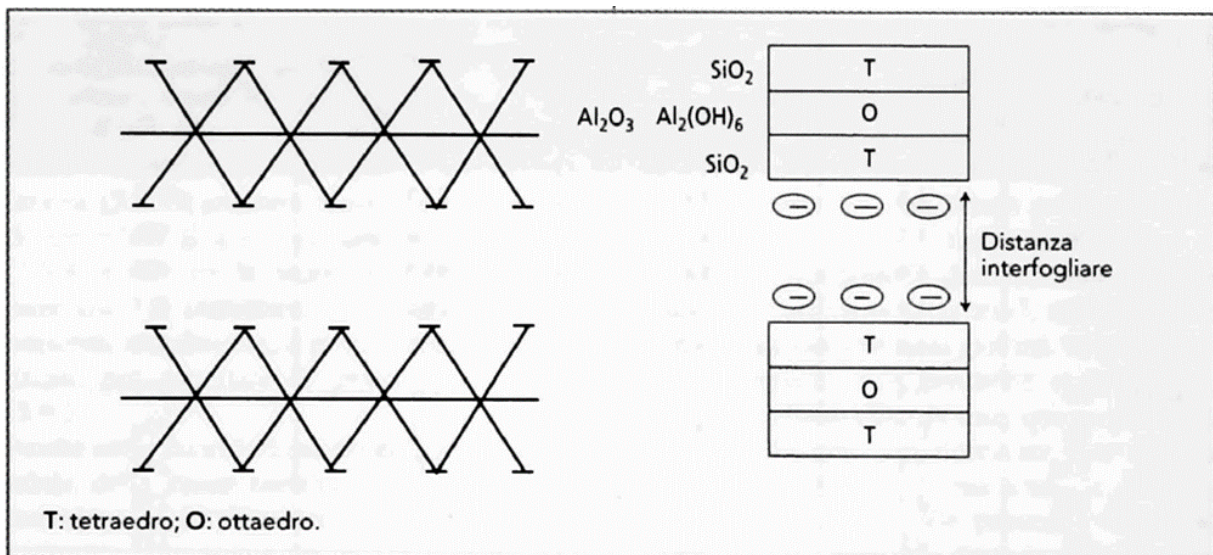


Figura 1 illustrazione della struttura della bentonite tratta dal trattato di enologia vol.2 (Riberau-Gayon 2017)



### 3.2 Tipi di bentonite

Non tutte le bentoniti al mondo sono idonee alle pratiche enologiche. Per poter essere bentoniti ad uso enologico devono rispettare determinati parametri riportati nel Codex enologico internazionale. Quest'ultimo è un insieme di definizioni e parametri che distinguono e ammettono l'uso i diversi prodotti enologici e viticoli. Tale Codex viene rilasciato dall'OIV, ovvero l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino. Nella fattispecie le bentoniti non devono apportare o cambiare l'odore del vino, devono essere facilmente disponibili nel mosto e nel vino ed efficaci nell'adsorbimento delle proteine. Il pH della bentonite calciche deve essere tra il 6,5-8,5, per le bentoniti attivate tra l'8,5-10, per le sodiche in una forbice tra il 4,7-10. infine, non presenta limiti d'utilizzo (Codex Enologico Internazionale 2022)

Caratteristiche	Limiti e caratteristiche
Odore	Assenza di odori indesiderati, come quello di muffa o altri, che possano cambiare le caratteristiche sensoriali del vino
pH misurato su 5g di prodotto in 100 ml di acqua distillata.	Bentoniti: calciche: pH 6,5 - 8,5 - sodiche: pH 4,7 - 10,0 - attivate: pH 8,5 - 10,0
Perdita peso durante essiccazione	Compresa tra il 5% al 15% del peso iniziale
Contenuto in montmorillonite	almeno 80 %
Presenza di silicio libero	Silicio cristallino < 3% (quarzo e cristobalite) - particelle < 10 micron devono essere meno del 10%, il contenuto di cristalli di silicio respirabili deve essere sotto lo 0,3 %
Piombo*	< 5 mg/Kg
Mercurio*	< 1 mg/Kg
Arsenico *	< 2 mg/Kg
Ferro*	< 600 mg/Kg
Alluminio *	< 2,5 g/Kg
Calcio e magnesio*	100 meq per 100 g
Sodio*	bentoniti di sodio e calcio 10 g/Kg - bentoniti attivate 35 g/Kg
Presenza di particelle grossolane*	8 g su 100 g
Deacidificazione della soluzione test*	max 2,5 eq/Kg
Tasso di rigonfiamento*	non ci sono dei limiti indicati, test descrittivo
Assorbimento delle proteine*	50% delle proteine in soluzione test con una dose di 0,4 g/l
Superficie di assorbimento*	min 300 mg/100 g
Spot test*	Negativo (assenza di rilascio del colorante blu di metilene)

**Figura 3** Tabella che riassume i diversi valori soglia delle sostanze ammesse nelle bentoniti ad uso enologico (Pala 2018)

Le distinzioni da un certo punto di vista vengono valutate sicuramente dalla capacità di rigonfiamento, dalla superficie di adsorbimento, dal potere deproteinizzante e illimpidente. Inoltre, importante è il fatto di valutare la capacità di disacidificazione e il fattore della compattazione del sedimento. Il volume specifico di rigonfiamento, indicato talvolta come indice di rigonfiamento, esprime il rapporto tra il volume di 5 g di bentonite in polvere e quello occupato da 5 g di bentonite lasciata per 24 ore in 100 mL di acqua

(Ribéreau-Gayon et al., 2017). Le bentoniti sodiche si rigonfiano maggiormente rispetto alle bentoniti calciche, ancor più se idratate con acqua del rubinetto piuttosto che in acqua distillata. Ciò avviene perché nel primo caso, cationi di dimensioni maggiore come  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , vanno a sostituire lo ione  $Na^+$  (Maujean, 1993).

La superficie di adsorbimento specifico viene misurata mediante l'impiego di blu di metilene, molecola di dimensioni ridotte, e della formula:

$$S(m^2/g) = 20,93V(mL)/P(g)$$

dove V è il volume della soluzione di blu di metilene 20 g/L impiegata per ottenere un'aureola blu chiara intorno al deposito della goccia di sospensione su carta da filtro senza ceneri e che contiene un peso secco P della bentonite da provare (Ribéreau-Gayon et al., 2017). I risultati hanno un'elevata variabilità, da 20 a 650  $m^2/g$  (Maujean, 1993). Per la determinazione della capacità di adsorbimento delle proteine si fa riferimento ad uno standard costituito da albumina di siero bovino (BSA). Le bentoniti sodiche hanno una maggiore capacità deproteinizzante rispetto alle bentoniti calciche (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

Bentoniti	Rapporto $Na^+/Ca^{2+}$	Volume specifico di rigonfiamento ( $mg/g$ )		Proteine adsorbite dalla bentonite ( $mg$ BSA/g)	
		Acqua distillata	Acqua		
Sodiche	B1	1,8	13,8	87,5	571
	B6	1,5	13,0	92,0	571
	B2	1,4	13,0	45,5	408
	B3	1,4	12,0	26,5	417
	B7	1,4	4,5	9,0	379
Calciche	B8	0,5	10,0	7,0	271
	B5	0,3	4,0	4,0	300
	B10	0,3	5,0	5,0	242
	B11	0,2	5,0	4,0	258
	B4	0,1	3,6	2,5	129
	B12	0,04	2,5	3,5	333

Figura 4: Influenza del tipo di ione fissato sul volume specifico di rigonfiamento delle bentoniti (Maujean, 1993)

Come detto in precedenza, le bentoniti utilizzate in enologia sono sostanzialmente bentoniti ottenute da composti impuri che di rado vengono utilizzati allo stato grezzo, ma che più spesso vengono modificati mediante trattamenti di attivazione con acido solforico o sali alcalini (Ribéreau-Gayon et al., 2017). Questo permette di variare il rapporto tra gli ioni presenti, in particolare  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , al fine di ottenere le proprietà fisico-chimiche desiderate (Catarino et al., 2008). Inoltre, i trattamenti consentono di ottenere bentoniti ricche di diversi ioni ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e di distinguerle in bentoniti sodiche, calciche e acide.

Quelle acide e calciche si disperdono facilmente e in fase di sospensione precipitano rapidamente, lasciando il liquido torbido e l'assorbimento risulta essere limitato. Differenti sono le modalità di rigonfiamento per le bentonite sodica e quella calcica, la prima ricca del catione sodio ( $\text{Na}^+$ ) permette l'ingresso di acqua in profondità tra le lamelle, mentre la calcica ricca del catione calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) si idrata sempre con lo stesso principio ma in minore quantità, vista la carica positiva che non permette l'ingresso in profondità delle molecole di acqua tra le lamelle (Pala, 2018).

Nel caso di quelle sodiche, che sono quelle più richieste in enologia, la distanza dei fogli è maggiore (100 Å) rispetto quelli delle bentoniti calciche (10 Å). Questa peculiarità permette un maggiore rigonfiamento nel vino ed una superiore capacità da assorbimento, formando delle sospensioni stabili.

Ricordiamo che la capacità della bentonite è quella di legarsi alle diverse sostanze cariche positivamente (es. proteine), creare dei flocculi e in seguito formare uno strato di sedimenti di consistenza fioccosa che permetterà d'illimpidire la massa di vino.

### ***3.3 Proteine e la deproteinizzazione nel vino***

Le proteine sono macromolecole biologiche costituite da aminoacidi uniti tra di loro, costituendo perciò delle catene polipeptidiche. Tali catene sono frutto della presenza di legami amminici tra gli aminoacidi. Nel contesto viticolo ed enologico, l'uva contiene basse concentrazioni di proteine. Le più rappresentate vengono sintetizzate a partire dall'invasatura e si accumulano nella bacca durante la maturazione seguendo l'accumulo degli zuccheri (Tattersall et al., 1997). Queste proteine includono le chitinasi e le thaumatin-like proteins (TLP) che fanno parte di un gruppo di proteine detto Pathogenesis Related Proteins, definite tali perché coinvolte nel meccanismo di difesa da patogeni fungini. Nei diversi tessuti di *V. vinifera* sono presenti diverse forme di chitinasi, ma la più alta attività enzimatica si trova nella bacca (Derckel et al., 1996). Queste proteine sono coinvolte nei meccanismi di difesa della pianta dagli attacchi dei patogeni fungini, essendo in grado di idrolizzare la chitina, un componente strutturale della parete cellulare del fungo. In effetti alcuni autori hanno osservato un aumento nell'espressione delle PR-proteins (in particolare chitinasi, TLP e beta glucanasi) in uve infettate da patogeni con corrispondente aumento della instabilità proteica del vino (Girbau et al., 2004).

Le frazioni proteiche del vino e la loro quantità dipendono da alcuni fattori come il vitigno, le condizioni climatiche, il tipo di suolo, gli ambienti di crescita nel vigneto, la maturità e il processo di vinificazione (Pashova et al., 2004) (Sauvage et al., 2010).

In letteratura vengono riportati dati che vanno da 1 mg fino a un 1000 mg/litro di proteine nel vino. I metodi analitici utilizzati per l'ottenimento delle concentrazioni delle proteine certamente influiscono sull'esito dei risultati. Più realisticamente si potrebbe dire che i livelli di proteine che sono presenti normalmente nei vini sono tra 10 e 250 mg/L (Vincenzi et al., 2011), e assieme ai polisaccaridi e polifenoli rappresentano una delle macromolecole più presenti nel vino. Le proteine del vino presentano un peso molecolare tra i 16 e i 100 kDa. Quelle che causano l'instabilità nei vini sono paradossalmente le più piccole riscontrabili in un range tra i 16 e 30 kDa (Celotti et al., 2005). Le proteine presentano la caratteristica di variare la propria carica, negativa o

positiva, in funzione del pH. Nel contesto enologico sono presenti prevalentemente proteine con punto isoelettrico compreso tra il 4,1 e 5,8. Di conseguenza, considerando il pH acido del vino che tipicamente oscilla da 2,9 a 3,8, le proteine sono sempre dotate di una carica netta positiva (Hsu e Heatherbell, 1987). Le proteine che passano dall'uva al vino e che possono poi determinarne l'instabilità sono, paradossalmente, quelle più stabili al processo di vinificazione (Curioni e Vincenzi, 2011). Le proteine che hanno le caratteristiche per sopravvivere alla vinificazione sono le PR-proteins, che per loro natura hanno una resistenza intrinseca alla proteolisi e alla denaturazione (Waters et al., 1992). Uno studio ulteriore ha confermato che le chitinasi sono le componenti proteiche maggiormente coinvolte nel fenomeno della torbidità proteica, soprattutto in presenza di solfato (Marangon et al., 2011). L'abbassamento del pH, la presenza di alcol e di attività proteolitiche sono tutti fattori che causano fenomeni di denaturazione e degradazione delle proteine che hanno come conseguenza il fatto che si produce una "selezione" per cui solo quelle più resistenti rimangono nel vino dopo fermentazione (Curioni e Vincenzi, 2011). Se il sistema rimane inalterato, le proteine permangono in soluzione stabile, però se almeno un fattore di instabilità interviene, il vino si intorbida. Dopo la fermentazione rimangono prevalentemente le proteine che sono passate indenni durante la vinificazione, mentre gli amminoacidi sono poco rappresentati in quanto utilizzati dai lieviti (Celotti et al., 2005). Ciò permette alla bentonite poi di svolgere il suo lavoro di rimozione, dato dalla sua carica negativa.

### ***3.4 L'interazione tra bentonite e proteine***

Com'è noto uno dei principali trattamenti che si svolge in cantina è quello della stabilità proteica, che si applica per evitare che si formino le tipiche velature nelle bottiglie di vino. Tale stabilità si raggiunge con il trattamento con bentonite in quanto essa è in grado di interagire con le sostanze proteiche facendole precipitare e permettendo d'illimpidire il vino.

L'interazione tra bentonite e proteine nasce dal fatto che la prima è una molecola carica negativamente mentre la seconda è una molecola carica positivamente. L'interazione elettrostatica permette la formazione di flocculi che precipiteranno sul fondo del vaso vinario. Sebbene questo tipo di trattamento abbia una funzione più o meno immediata, all'interno delle aziende vinicole, la massa di vino che viene fatta stabilizzare in questa maniera viene lasciata riposare per più di 10-15 giorni e/o in funzione della cinetica di sedimentazione.

Si ricorda che le capacità d'assorbimento della bentonite risulta essere indipendente dalla temperatura, ma varia con il tipo di proteine, pH e la concentrazione di etanolo. Maggiore è la quantità delle proteine o maggiore è il pH e minore sarà l'impatto sulla capacità della bentonite, mentre maggiore sarà la quantità di etanolo, maggiore sarà l'attività di tale argilla in fase di stabilizzazione proteica (Blade e Boulton 1988).

L'utilizzo di bentonite però non è una pratica priva di rischi. A dosaggi eccessivi, infatti, il suo utilizzo porta ad una "semplificazione" del profilo del vino. Difatti viene utilizzata per il trattamento dell'instabilità proteica ma in eccesso ne altera le proprietà sensoriali, come verrà spiegato in seguito.

### ***3.5 Test di stabilità proteica***

La scelta della bentonite è uno degli aspetti alla base di una stabilizzazione proteica di precisione, ma sicuramente non il più importante. Il punto chiave, infatti, è rappresentato dall'individuazione della metodica analitica in grado di determinare con la massima precisione possibile l'instabilità proteica del campione

Quando viene preso in esame un vino da stabilizzare con la bentonite non vi è mai un quantitativo preciso da adoperare. La soluzione è quella di svolgere delle prove empiriche aumentando i dosaggi del prodotto fino a quando si ottiene il risultato desiderato. Nel vino, che ricordiamo non è altro che una soluzione tampone, le variabili sono molteplici: tenore alcolico, contenuto di proteine, pH, presenza di colloidali protettori, etc.

Considerando queste variabili sarà necessario svolgere un test di stabilità proteica previa chiarifica e successiva filtrazione o centrifugazione del vino da stabilizzare. Per quanto riguarda i test di stabilità ce ne sono molti, basati su metodi diversi per indurre la precipitazione delle proteine instabili. I principali e più conosciuti test sono riportati in seguito:

-TCA TEST (Berg and Akiyoshi, 1961): 1 mL di reagente (Acido tricloroacetico 55%) + 10 mL di vino, 2 minuti a 100°C, raffreddare e misurare la torbidità (< 19 NTU = stabile). Questo test tende a sovrastimare il dosaggio di bentonite necessario.

-BENTOTEST (Jacob, 1962): proteine denaturate e precipitate con aggiunta di acido fosfomolibdico (kit). La precipitazione è proporzionale al contenuto in proteine del vino. Anche questo test sovrastima, in quanto considera come instabili tutte le proteine, comprese quelle che in realtà possono svolgere funzione protettiva (come le mannoproteine).

-HEAT TEST (Pocock and Rankine, 1973): 80°C per 6h e una notte in frigo. NTU prima e dopo il trattamento (< 2 NTU = stabile). Pur utilizzando temperature estreme, è considerato tra i test migliori, perché non prevede aggiunte di sostanze precipitanti al vino (simulando quindi quello che avviene nella realtà).

-PROTOCHECK (EVER): reazione delle proteine potenzialmente instabili presenti nel vino con una miscela di coadiuvanti anionici stabilizzati.

-PROTEOTEST (Vason): reazione delle proteine instabili con una miscela standardizzata di tannini a freddo

-VINEO (Biorad): basato sulla rilevazione immunologica delle proteine instabili del vino

Ovviamente questi test non danno quasi mai gli stessi valori in quanto alcuni sovrastimano il rischio di casse proteica portando all'utilizzo di dosi bentonite di quantità superiori a quelle richieste. Il test che viene più impiegato è che viene considerato come il più affidabile e sicuramente l'“Heat Test”.



### ***3.6 Aspetti negativi uso della bentonite***

Dal punto di vista legislativo, a differenza di molti altri prodotti enologici, la bentonite non ha un limite di legge nella pratica enologica però non è specifica solo per le proteine, ma rimuove anche altre specie cariche o aggregati. Di conseguenza, aggiunte elevate possono indurre una riduzione nelle proprietà organolettiche dei vini deprimendone il quadro dei composti aromatici (Dordoni et al., 2008). Inoltre, dosaggi eccessivi di bentonite possono incidere sulla shelf-life del vino promuovendo processi ossidativi responsabili dell'invecchiamento precoce o influenzando negativamente il profilo sensoriale dei vini bianchi, in particolare rimuovendo gli esteri di fermentazione con un effetto proporzionale alla lunghezza della catena carboniosa (Vincenzi et al., 2015).

Sui vini rossi la bentonite provoca la rimozione di una parte del colore in quanto capace di fissare lo ione flavilio, carico positivamente.

La perdita in volume in seguito ai travasi provoca una perdita costosa di vino nelle fecce (Miller et al., 1985; Puidgeu et al., 1996) che può variare dal 3% fino a superare il 10% a seconda della tipologia e della quantità di bentonite utilizzata (Kinley e Obradovic, 2012)

Comunque, la letteratura più o meno conviene sul fatto che dosi sopra i 50 g/hL siano molto depauperanti sia nei confronti dei vini rossi che dei vini bianchi, che subiscono un effetto negativo sui componenti benefici per le proprietà sensoriali come colore e aroma (Gonzalez-Neves, Favre e Gil, 2014; Jaeckels et al., 2015)

### ***3.7 I Polisaccaridi***

Con questo termine si intendono in generale i polimeri che hanno un grado di polimerizzazione superiore alle 20 unità di monosaccaridi. Nei vini rappresentano una quota di macromolecole molto rilevanti rispetto ai tannini o alle proteine. I polisaccaridi sono determinanti nel vino in quanto concorrono a livello organolettico influenzando soprattutto corposità, persistenza degli aromi, diminuzione dell'astringenza e dell'amaro e stabilizzazione della schiuma. Sono importanti per il loro comportamento colloidale dovuto alle loro dimensioni, che influenzano la decantazione nei mosti, la torbidità e le precipitazioni nei vini. Sono noti in fase di filtrazione per colmatore i filtri.

I polisaccaridi di interesse enologico hanno origine dalle pareti cellulari dell'uva (provengono dalla polpa e dalla buccia dell'acino), da cui si liberano le sostanze pectiche e vengono chiamati polisaccaridi di origine vegetale. Inoltre, vi sono polisaccaridi esogeni di origine microbica, derivati dalle pareti dei lieviti, batteri e funghi.

I polisaccaridi di origine vegetale vengono distinti anche in pectine acide e pectine neutre. Le prime sono formate da lunghe catene di acido galatturonico mentre le seconde sono prive di acido galatturonico.

Nello specifico i polisaccaridi acidi sono formati 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. I polisaccaridi neutri sono poco ramificati e non contengono acido galatturonico e sono costituiti da arabinogalatturonani e ramnogalatturonani. Quest'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 le mannoproteine rilasciate dal lievito durante la fermentazione (35%).

### ***3.8 Le mannoproteine***

Come già detto, i polisaccaridi nel vino non sono solo di origine vegetale bensì esistono polisaccaridi derivanti da microrganismi come i lieviti, batteri e funghi: tra questi quelli più importanti sono le mannoproteine.

Le mannoproteine sono macromolecole costituite da catene di mannosio legate a corti residui proteici; rappresentano il 30-40% della parete cellulare del lievito. Queste sostanze vengono liberate già durante la fermentazione (Llauberes et al., 1987) e poi durante l'affinamento sulle fecce come risultato dell'autolisi (Feuillat et al., 1989). La membrana del lievito è composta da  $\beta$ -glucani e da mannoproteine, i primi formano uno strato subito dopo la membrana (diviso in fibroso ed amorfo) mentre le mannoproteine sono lo strato più esterno. Esse costituiscono dal 25 al 50% della parete cellulare. La quantità di polisaccaridi ceduti dal lievito dipende dal ceppo, dalle condizioni di fermentazione (Rosi et al 1998), dalle condizioni di conservazione, ed è tanto più elevata quanto più alta è la temperatura, l'agitazione del mezzo e il tempo di conservazione sulla biomassa.

Le mannoproteine svolgono molte azioni favorevoli in campo enologico. Per esempio, danno maggiore stabilità nei confronti delle precipitazioni tartariche in quanto le mannoproteine 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). Dal punto di vista sensoriale il fatto che le mannoproteine sono costituite da una parte proteica e una zuccherina (rispettivamente una parte idrofila e una parte idrofoba) fa sì che esse possono interagire 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, si legano ai polifenoli dando minore astringenza, migliorano la qualità del perlage, adsorbono ed allontanano i tioli maleodoranti, hanno una influenza positiva sulla "corposità" del vino. Il loro rilascio può anche stimolare la crescita dei batteri lattici e quindi favorire il tempestivo completamento della fermentazione malolattica (Guilloux-Benatier et al., 1995).

#### ***4.Scopo: Possibile interazione tra polisaccaridi e bentonite***

Le mannoproteine, come descritto in precedenza, sono costituite da una parte zuccherina e una parte proteica. Non è ancora stato dimostrato in modo chiaro se la bentonite, di cui è risaputa la forte interazione con le proteine, possa interagire anche con le mannoproteine presenti nel vino.

Oltre ad una interazione di tipo diretto, potrebbe essere anche ipotizzata una interazione indiretta, mediata dalla presenza di proteine. Come è stato detto, infatti, i polisaccaridi del vino possono interagire con le proteine, modificando la loro capacità di aggregazione (Schmidt et al., 2009; Waters, Pellerin e Brillouet, 1994), e di conseguenza l'azione della bentonite potrebbe rimuovere quelle mannoproteine legate alle proteine instabili.

Allo stesso tempo, questa interazione delle mannoproteine con le proteine instabili, responsabile dell'effetto colloide-protettore, potrebbe impedire o limitare l'interazione delle proteine stesse con la bentonite, riducendo l'efficienza dei trattamenti di stabilizzazione.

Uno studio più approfondito del legame tra bentonite e polisaccaridi potrebbe permettere di applicare in maniera più razionale ed efficace i trattamenti di chiarifica.

## ***5. Materiali e metodi***

### ***5.1.1 Bentoniti***

Nei test condotti in laboratorio sono state utilizzate diverse formulazioni di bentonite:

-Performa: commercializzata da OenoFrance, si tratta di una bentonite sodica attivata con una superficie adsorbimento di 500-800 m/g In funzione del mezzo in sospensione. Ha una elevata affinità con le proteine comprese quelle a basso peso molecolare.

-Pentagel: commercializzata da Perdomini-IOC, si tratta di una bentonite sodica attivata. La superficie di Pentagel è dotata di carica netta negativa, questo la rende particolarmente reattiva nei confronti di sostanze di carica opposta, quali le proteine, che vengono adsorbite

Tutte le bentoniti sono state preparate 1:20 in acqua.

### ***5.1.2 Altri reagenti***

#### ***Proteine (PT)***

Le proteine sono state purificate da un mosto di Manzoni bianco precedentemente trattato con 10 g/L di carbone e 30 g/L di PVPP. Dopo decantazione e filtrazione, il mosto limpido e incolore è stato portato a pH 3.0 ed è stato caricato su una colonna di SP-Sepharose Fast Flow equilibrata in tampone 10 mM pH 3.0. A pH 3.0 le proteine sono tutte cariche positivamente e si legano alla colonna. Dopo aver lavato esaustivamente la colonna con il tampone a 10 mM (tutto quello che non si è legato, chiamato flow through, è stato conservato per analisi successive), le proteine sono state staccate con lo stesso tampone a cui è stato aggiunto NaCl 1M. La frazione è stata dializzata e liofilizzata.

### *Polisaccaridi di mosto (PM)*

Per essere sicuri di avere polisaccaridi esenti da mannoproteine, si è partiti da un mosto Sauvignon, precedentemente trattato con 10 g/L di carbone e 30 g/L di PVPP. Dopo decantazione e filtrazione, il mosto limpido e incolore è stato portato a pH 3.0 ed è stato caricato su una colonna di SP-Sepharose Fast Flow equilibrata in tampone 10 mM pH 3.0. Siccome la colonna è uno scambiatore cationico, ha legato tutte le proteine, cariche positivamente a pH 3.0, mentre nel flow through sono rimasti i polisaccaridi. Questa porzione liquida è stata quindi concentrata con Amicon (3.5 kDa), dializzata e liofilizzata.

### *Mannoproteine*

La frazione di flow through ottenuta dalla separazione del vino Manzoni bianco su colonna S-Sepharose è stata concentrata con Amicon, dializzata e liofilizzata. Siccome contiene polisaccaridi che derivano sia dal lievito che dall'uva, la polvere è stata risospesa in buffer Tris 20mM pH 7.4 (contenente 0.5M NaCl + 0.1mM di calcio cloruro, magnesio cloruro e manganese cloruro) e separata su colonna di Con A (Concanavalina A) per ottenere due frazioni: la frazione trattenuta dalla colonna (che contiene mannosio ed è costituita quindi da mannoproteine, **MP**) e il flow through (**FT**) che contiene tutto il resto.

Una volta caricata la frazione sulla colonna, quello che passa senza legarsi è stato considerato come Flow through, mentre la frazione legata è stata eluita separatamente mediante aggiunta al buffer di metil-mannopiranoside 0.5M.

Le frazioni ottenute sono state nuovamente dializzate e liofilizzate.

### ***5.2.1 Preparazione vino modello***

Per semplificare il sistema e poter meglio valutare l'interazione tra le componenti di interesse, le reazioni sono state condotte in una soluzione di vino modello (5 g/L acido tartarico, 12% etanolo, pH 3.2).

Nel vino modello sono state preparate delle soluzioni delle diverse molecole purificate (singolarmente o in combinazione) e su queste è stato eseguito un trattamento con bentonite a diversi dosaggi.

Dopo il trattamento con bentonite (24h a temperatura ambiente) i campioni sono stati filtrati e sottoposti alle successive analisi.

### ***5.2.2 Determinazione Polisaccaridi***

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

A tutti i campioni (200 µl) sono stati addizionati 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.

### ***5.2.3 Determinazione Proteine***

Le analisi delle proteine sono state eseguite anche in questo caso con test colorimetrico con acido bicinconinico e lettura con lettore di piastre Labtech It 4000 Plate Reader.

La reazione è avvenuta direttamente in una piastra in polistirene da 96 pozzetti.

Nei singoli pozzetti sono stati inseriti 25 $\mu$ L dei campioni in esame e in aggiunta 200  $\mu$ l di reattivo costituito da 50 parti di reagente a e 1 reagente di tipo B (BCA Kit, Pierce), preparato precedentemente. Dopo incubazione a 37°C per 30 minuti, è stata effettuata la lettura a 550 nm.

La retta di taratura è stata realizzata mediante diluizioni seriali di BSA (Bovine Serum Albumine) in acqua in un range da 0,062 a 1 mg/mL.



## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella fase iniziale sono stati caratterizzati i campioni di macromolecole da utilizzare per le prove di chiarifica. Le diverse frazioni purificate sono state risospese a 10 mg/mL e analizzate sia per il contenuto di polisaccaridi che di proteine.

Come si può osservare dalla Figura 5, i polisaccaridi del mosto (PM) effettivamente sono costituiti prevalentemente da polisaccaridi e contengono solo tracce di proteine (<6%).

Le proteine del mosto (PT) invece risultano molto ben purificate, e di fatto contengono polisaccaridi solo in tracce (0.2%).

Le mannoproteine recuperate dal vino sono costituite prevalentemente da polisaccaridi ma contengono anche 13.7% di proteine, in perfetto accordo con i dati di letteratura (Escot, Feuillat, Dulau & Charpentier, 2001; Vidal et al., 2003; Domizio et al., 2014).

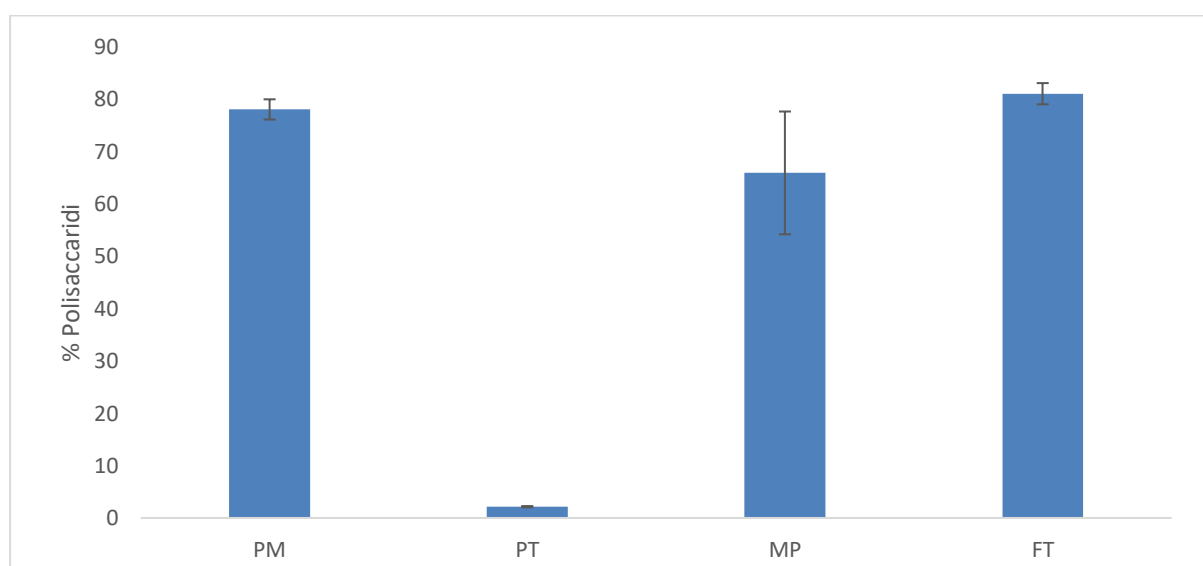
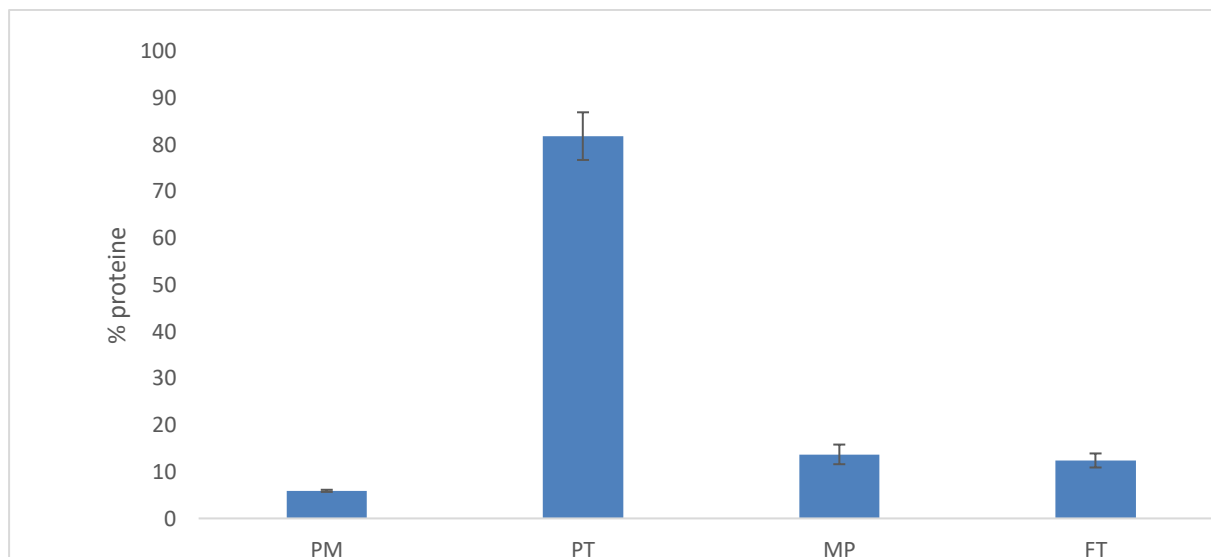


Figura 5. Contenuto percentuale di polisaccaridi nelle frazioni



**Figura 6. Contenuto percentuale di proteina nelle frazioni**

Il FT, costituito dalla frazione di polisaccaridi del vino non legati dalla Concanavalina A e che quindi dovrebbe contenere prevalentemente i polisaccaridi residui dell'uva, in effetti ha una composizione simile a PM.

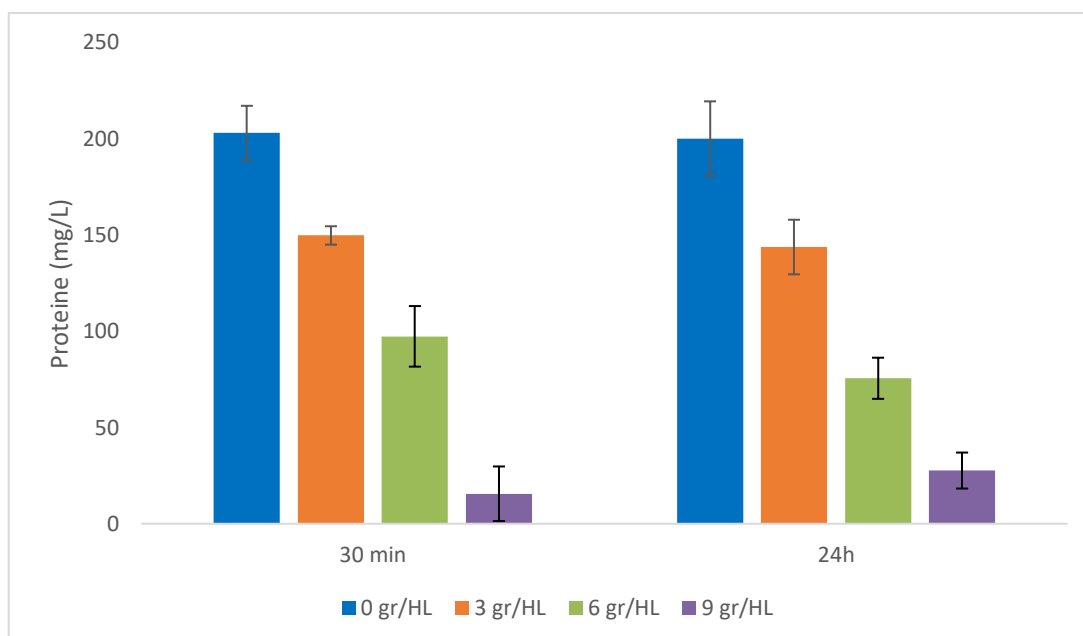
## **6.1 TEST CON BENTONITE PERFORMA**

In un primo test è stata eseguita una prova con bentonite Performa, un bentonite sodica di tipo farmaceutico.

### **6.1.1 Effetto della bentonite sulle proteine**

In una prima serie di prove, è stata preparata una soluzione di proteine a 200 mg/L (corrispondente ad un valore che si potrebbe riscontrare in un vino mediamente instabile) che è stata trattata con dosi crescenti di una bentonite farmaceutica (Performa, Oenofrance). Dopo il trattamento è stata eseguita la quantificazione delle proteine residue.

È stata eseguita la prova sia dopo solo 30 minuti di contatto con bentonite sia dopo 24 ore. I dati rilevati (Figura 7) confermano le informazioni presenti in letteratura, ovvero, che il tempo d'azione della bentonite è molto rapido, infatti i dati misurati a 30 minuti e a 24 ore sono molto simili. Si è osservato anche un effetto costante di rimozione all'aumentare della dose di bentonite.



**Figura 7. Contenuto di proteine nel vino modello dopo trattamento con bentonite a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 30 minuti e dopo 24 ore.**

In queste condizioni 9 g/hL di bentonite sono stati sufficienti per abbattere quasi completamente la quantità iniziale di proteine. Normalmente in vino reale per eliminare una tale quantità di proteine sono necessarie dosi più elevate di bentonite, ma evidentemente in soluzione modello non essendo presenti altre sostanze che possono competere con le cariche negative della bentonite, l'efficacia della bentonite è amplificata.

Lo stesso test di trattamento con bentonite è stato eseguito anche sulle frazioni costituite prevalentemente da polisaccaridi (PM, MP e FT), ma considerata la bassa concentrazione aggiunta inizialmente nel vino modello (sempre 200 mg/L) e il basso contenuto di proteine di queste frazioni (vedi Grafico 6), l'analisi di proteine ha dato risultati molto bassi e non ha permesso di osservare un effetto di rimozione da parte della bentonite.

### 6.1.2 Effetto della bentonite sui polisaccaridi

Sugli stessi campioni trattati con bentonite è stato misurato anche il contenuto di polisaccaridi, che potrebbe essere usato come parametro per verificare la presenza di una interazione delle diverse frazioni polisaccaridiche (PM, MP e FT) con il coadiuvante. Anche la frazione costituita prevalentemente da proteine ha comunque dato un leggero segnale.

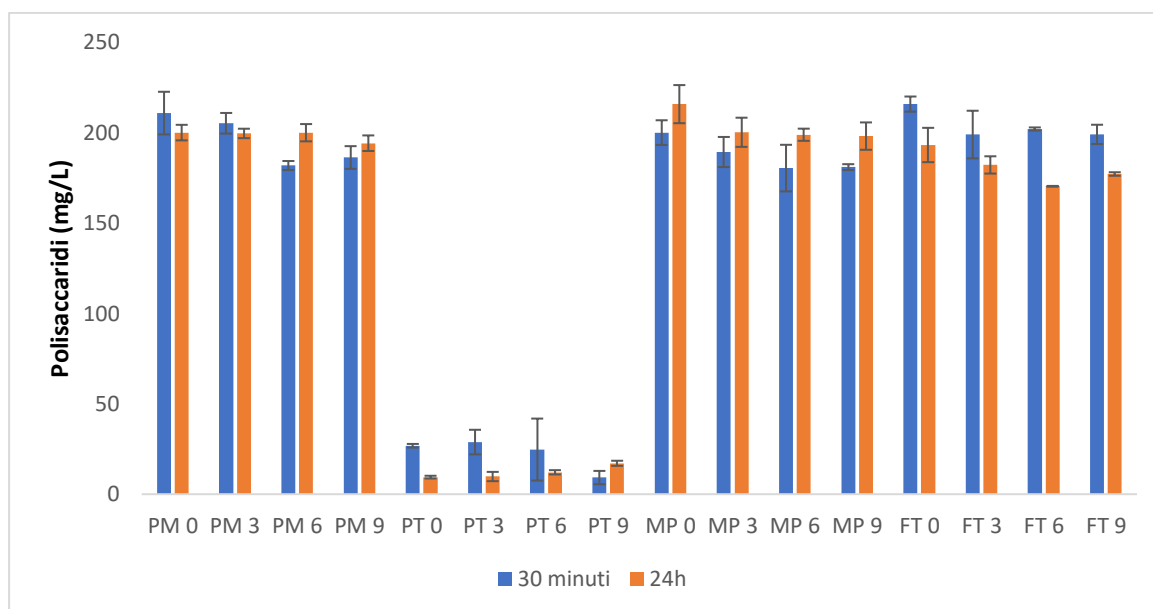
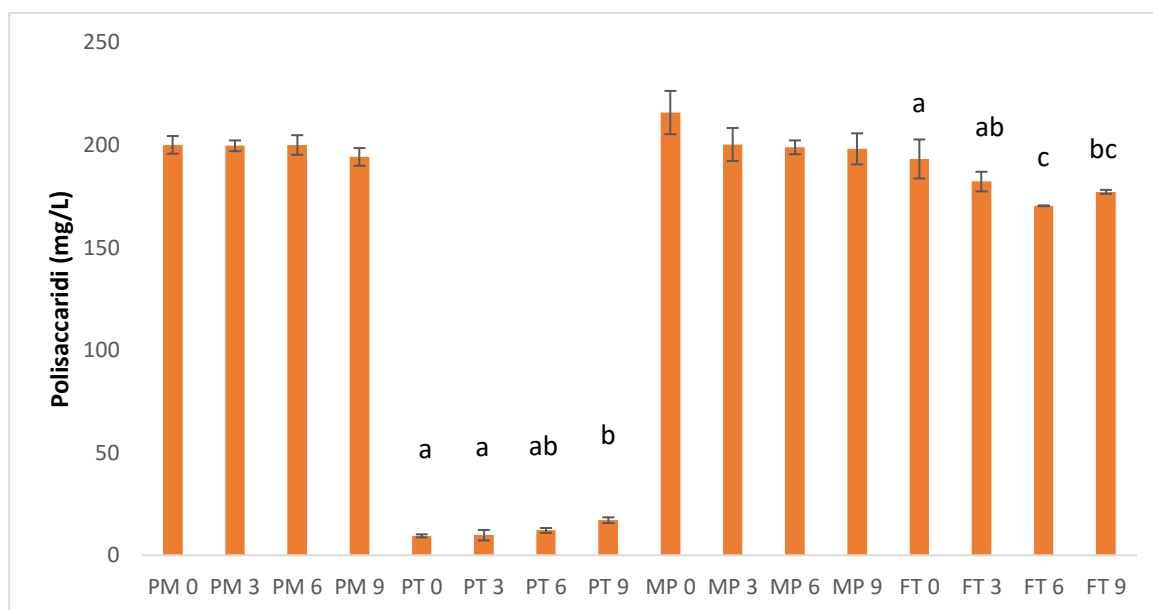


Figura 8. Contenuto di polisaccaridi nel vino modello dopo trattamento con bentonite a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 30 minuti e dopo 24 ore.

Il confronto tra il trattamento a 30 minuti e quello a 24 ore ha confermato anche per i polisaccaridi una assenza di differenza tra i due tempi.

Per meglio comprendere l'effetto del trattamento, le analisi sono state focalizzate da ora in avanti solo sul trattamento a 24 ore, che è quello più simile a ciò che avviene normalmente in cantina.



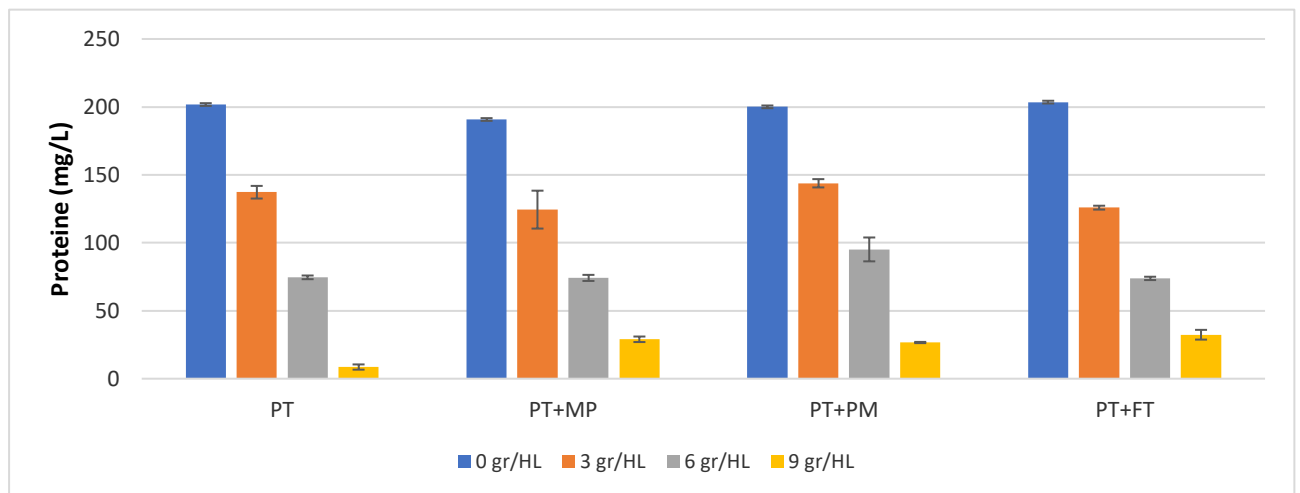
**Figura 9. Contenuto di polisaccaridi nel vino modello dopo trattamento con bentonite a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 24 ore. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).**

Come si può vedere dal Grafico 9, l'analisi statistica ha dimostrato che né i polisaccaridi del mosto né le mannoproteine hanno evidenziato una interazione diretta con la bentonite. La frazione delle proteine (PT) ha addirittura mostrato un aumento significativo dei polisaccaridi all'aumentare della dose di bentonite, ma si tratta comunque di valori bassi. Solo la frazione FT ha evidenziato una riduzione all'aumentare del dosaggio di bentonite, che si è stabilizzata tra 6 e 9 g/hL di bentonite. Questo comportamento potrebbe essere dovuto alla presenza di una piccola frazione di polisaccaridi (o di glicoproteine) in grado di interagire con la bentonite, che risulta completamente rimossa già ad un dosaggio di 6 g/hL.

### 6.1.3 Effetto dei polisaccaridi sull'interazione bentonite-proteine

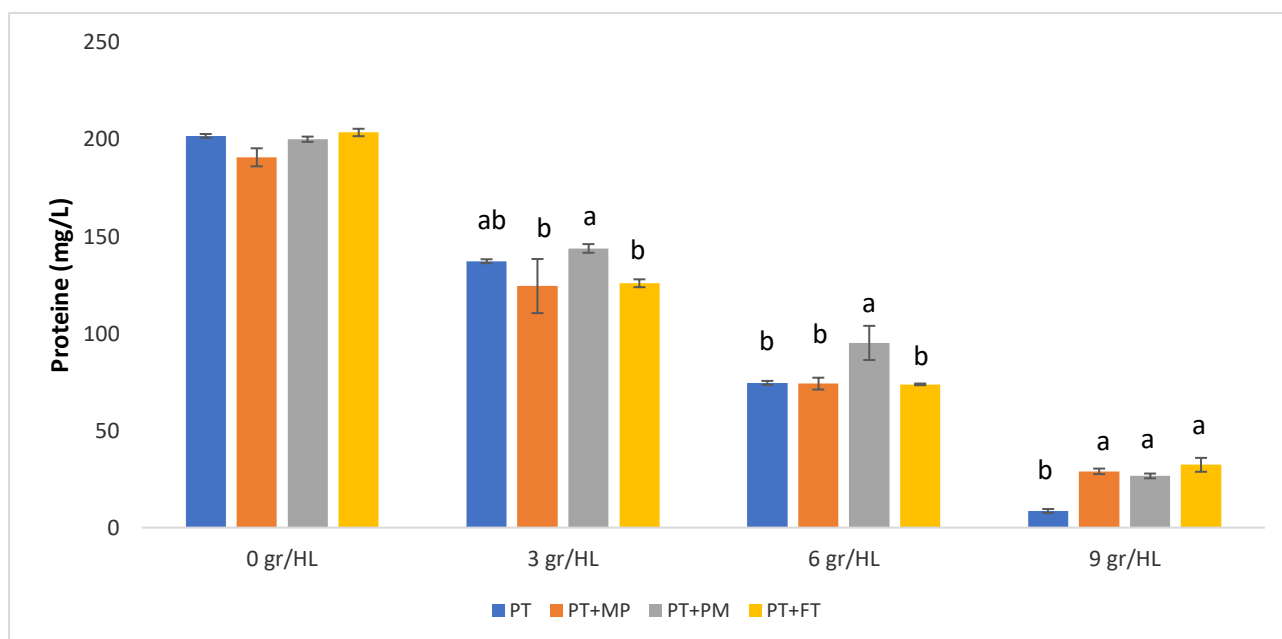
Una volta stabilito il tipo di interazione che le singole frazioni hanno con la bentonite, si è deciso di preparare sempre in soluzione modello una miscela di proteine (PT) a 200 mg/L mescolata con ciascuna delle frazioni di polisaccaridi individuate (PM, MP, FT).

Queste miscele sono poi state trattate con le stesse dosi di bentonite individuate precedentemente e le analisi sono state condotte dopo 24 ore di trattamento.



**Figura 10.** Contenuto di proteine nel vino modello con aggiunta di proteine del mosto (PT) e polisaccaridi (MP, MP, FT) dopo trattamento con bentonite a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 24 ore.

In tutti i casi la bentonite ha dimostrato di rimuovere in maniera efficace le proteine. Per meglio osservare l'eventuale effetto dei polisaccaridi, è stato fatto graficamente il confronto delle soluzioni a parità di dosaggio di bentonite.



**Figura 11.** Contenuto di proteine nel vino modello con aggiunta di proteine del mosto (PT) e polisaccaridi (MP, MP, FT) dopo trattamento con bentonite a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 24 ore. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).

Come si può osservare dalla Figura 11, al dosaggio di 3 g/hl non ci sono differenze significative tra le proteine da sole o in presenza di polisaccaridi, mentre già a 6 g/hL si inizia a vedere un effetto. In particolare, a questo dosaggio la presenza di mannoproteine riduce l'effetto della bentonite sulle proteine, causando la presenza nel vino di un residuo proteico del 27% più alto rispetto al trattamento in presenza di sole proteine. Al dosaggio di bentonite più alto, tutte le frazioni di polisaccaridi hanno mostrato un effetto "antagonista" alla bentonite, causando la permanenza nel vino finito di valori di proteine da 3 a 4 volte superiori rispetto alle proteine da sole. In questo caso, trattandosi di una soluzione di vino modello, un heat test per valutare l'instabilità proteica non darebbe risultati. È vero che le mannoproteine, essendo esse stesse dei colloidali protettori, potrebbero avere un effetto protettivo nei confronti della precipitazione proteica, ma si può ipotizzare che in presenza di mannoproteine sarebbe necessario un trattamento con un dosaggio superiore di bentonite per raggiungere la stabilità.

## 6.2 TEST CON BENTONITE PENTAGEL

Per valutare la replicabilità dei risultati, è stata fatta una seconda serie di esperimenti utilizzando un'altra bentonite sodica attivata, la bentonite granulare Pentagel.

### 6.2.1 Effetto della bentonite sulle proteine

In una prima fase, come per la bentonite Performa, è stato eseguito un test a dosi crescenti di bentonite sulla soluzione a 200 mg/L di proteine PT. La dose necessaria per la stabilizzazione della stessa quantità di proteine è risultata superiore rispetto alla bentonite Performa, come atteso considerando che le bentoniti farmaceutiche sono note per avere un'efficienza deproteinizzante più elevata rispetto alle bentoniti granulari. Per i test successivi si è deciso di coprire tutto il range, con dosi di 8, 16 e 24 g/hL di bentonite.

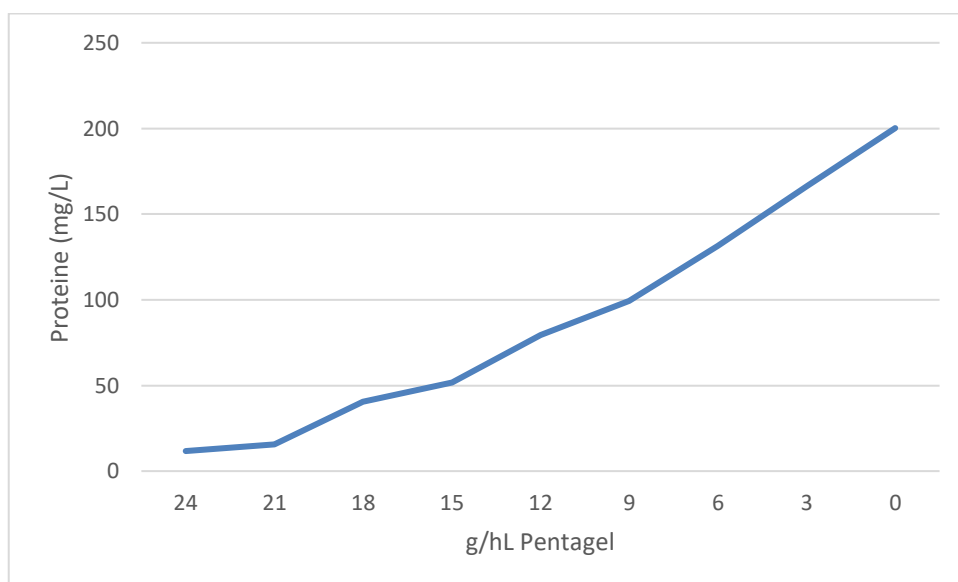
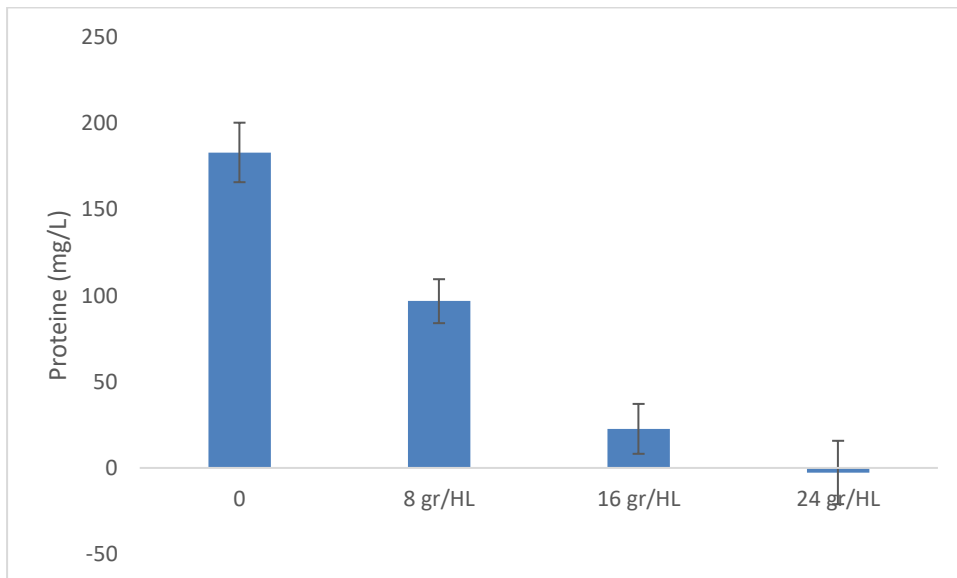


Figura 12. Effetto deproteinizzante di dosi crescenti di bentonite Pentagel su soluzione a 200 mg/L di proteine (PT) in vino modello.



Con questi dosaggi si è poi ottenuto su sole proteine in vino modello il seguente grafico.



**Figura 13. Effetto deproteinizzante di dosi crescenti di bentonite Pentagel su soluzione a 200 mg/L di proteine (PT) in vino modello.**

## 6.2.2 Effetto della bentonite sui polisaccaridi

Come per la prova eseguita con la bentonite Performa, sulle singole frazioni è stato valutato l'effetto della bentonite Pentagel andando a misurare la rimozione dei polisaccaridi.

In questo caso sulle proteine si è ripetuto lo strano comportamento osservato anche con la bentonite Performa, e cioè un apparente aumento dei polisaccaridi all'aumentare della dose di bentonite. Non siamo riusciti a dare una spiegazione a questo fenomeno, ma si ribadisce che si tratta comunque di valori molto bassi. Anche sui polisaccaridi del mosto sembra aumentare apparentemente il contenuto di polisaccaridi al dosaggio più alto di bentonite, ma si tratta probabilmente di una contaminazione.

In generale, si può confermare che anche questa bentonite non ha effetto sulle singole componenti polisaccaridiche testate in vino modello.

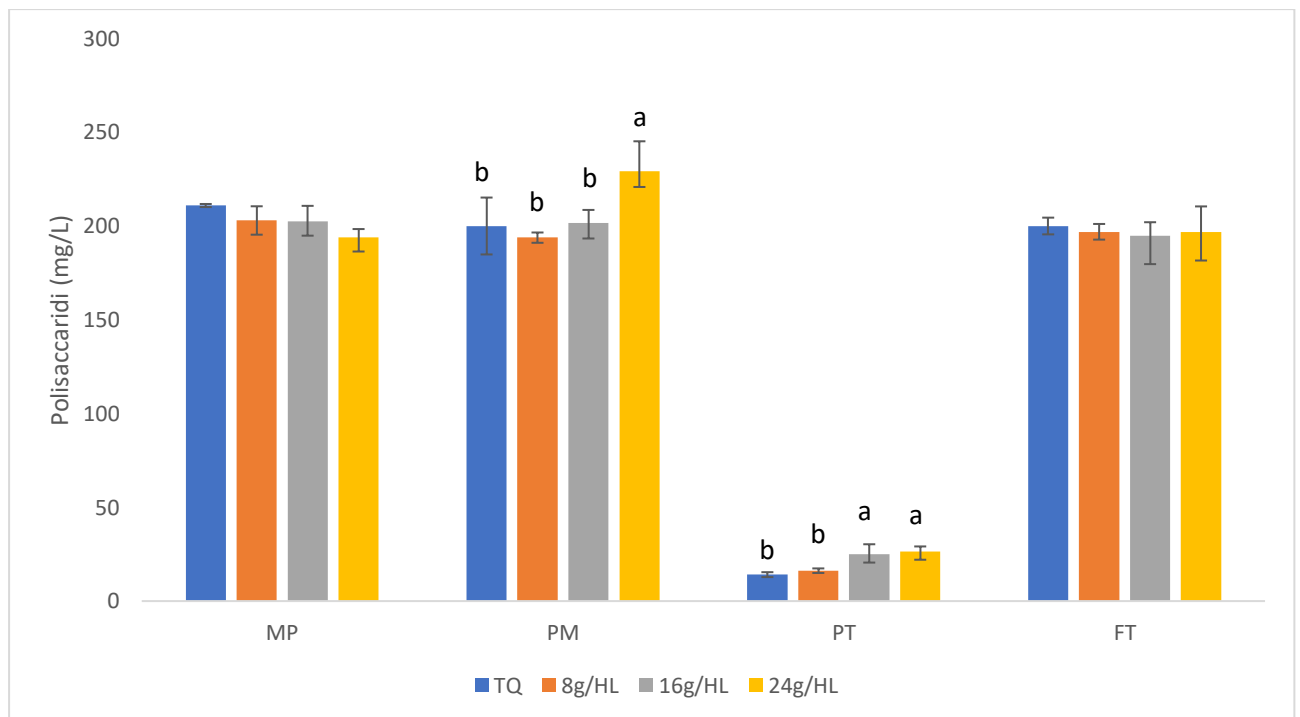


Figura 14. Contenuto di polisaccaridi nel vino modello dopo trattamento con bentonite Pentagel a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 24 ore. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).

### 6.2.3 Effetto dei polisaccaridi sull'interazione bentonite-proteine

Anche con questo secondo esperimento, infine, è stato valutato l'effetto della combinazione dei polisaccaridi con le proteine sulla capacità di rimozione della bentonite.

Anche se in questo secondo caso non si sono di fatto evidenziate differenze significative nelle diverse combinazioni, è comunque percepibile un effetto protettivo delle mannoproteine anche con questa seconda bentonite.

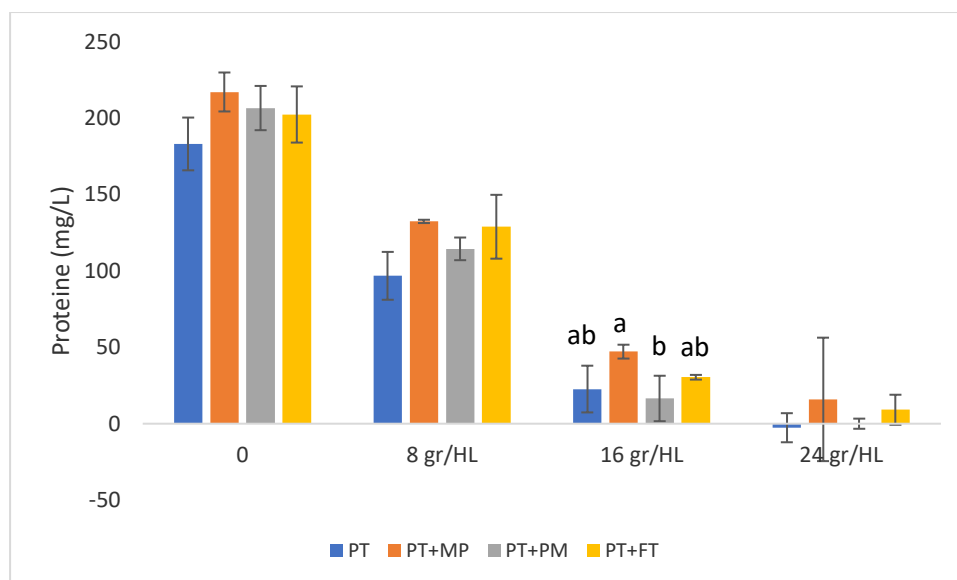


Figura 15. Contenuto di proteine nel vino modello con aggiunta di proteine del mosto (PT) e polisaccaridi (MP, MP, FT) dopo trattamento con bentonite Pentagel a dosi crescenti. Misure eseguite dopo 24 ore. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).

## ***7. Conclusioni***

Da questi esperimenti appare evidente come la bentonite non rimuova né i polisaccaridi né le mannoproteine. Questo aspetto, seppur ipotizzabile in base alla composizione di queste macromolecole, non era mai stato dimostrato chiaramente. In particolare per quanto riguarda le mannoproteine, che hanno diversi effetti positivi sul vino, il fatto che non siano affette da un eventuale trattamento con bentonite può essere una informazione utile per l'enologo, che sa di poter utilizzare la bentonite senza effetti negativi anche dopo una lunga sosta sui lieviti, ad esempio per rifinire l'instabilità proteica residua non ancora "mitigata" dall'effetto di colloide protettore proprio delle mannoproteine.

Altro aspetto da considerare, però, è che un trattamento con bentonite su un vino ricco di mannoproteine potrebbe limitare l'efficacia della bentonite stessa causando, per assurdo, la necessità di dosaggi più alti di coadiuvante. Infatti, almeno nel caso della bentonite Performa, i polisaccaridi in genere ed in particolare le mannoproteine, hanno dimostrato di ridurre, probabilmente per ingombro sterico, la capacità di rimozione delle proteine.

Questi dati suggeriscono, quindi, che un trattamento con bentonite potrebbe essere più opportuno quando eseguito su mosto, in assenza di mannoproteine, per avere una maggiore efficacia deproteinizzante, piuttosto che per il rischio di rimuovere le mannoproteine eventualmente rilasciate dai lieviti.

## ***8.Bibliografia***

Blade, W. Henry, and Roger Boulton, 'Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution', *American Journal of Enology and Viticulture*, 39.3 (1988), 193–99

Cappelli, D., Vannucchi, V. 2014. *Enologia*. Bologna: Zanichelli-Edizione

Catarino, Sofia, M. Madeira, F. Monteiro, F. Rocha, A. S. Curvelo-Garcia, and R. Bruno de Sousa, 'Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56.1 (2008), 158–65

Celotti Emilio "Nuovo metodo Per la valutazione delle potenzialità instabilità proteica dei vini" *enoforum* 2005

Curioni A. e Vincenzi S. "Le proteine dell'uva e del vino: origine,caratteristiche e funzionalità" *enoforum* 2011

Dambrouck, R. Marchal, L. Marchal-Delahaut, M. Parmentier, Maujean e P. Jeandet " Immunoreslevation of proteins from grapes and yeast in a white wine. " 2003

Derckel, J.P., Legendre, L., Audran, J.C., Haye, B. and Lambert, B. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): Five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues *Plant Sci.* (1996) 119: 31-37

Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F. & Barile, D. (2014). Use of non-Saccharomyces wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food microbiology*, 43, 5-15.

Dordoni R., Lambri M., Silva A., De faveri M., Manara M. "Impatto della bentonite sulle differenti frazioni proteiche e sui composti aromatici di origine varietale e fermentativa" 2009

Dufour, C.; Bayonove, CL "Structural influence of the wine different polysaccharides on the volatility of the aromatic substances in a model system. " *J. Agric. Food Chemistry*.1999,47, 671-677.

Dupin I., Brett M. McKinnon, E. J. Waters, “Saccharomyces cerevisiae and Mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and contact with lees and a proposal for their mechanism of action” 2000

Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L. & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153-159.

Ferreira R. B., Picarra-Perreira M.A., Monteiro S., Loureiro V.B., Teixeira A.R., 2002. “The wine proteins”, *Trends in Food Science & Technology* 12, 230-239.

Feuillat, M.; Freyssinet, M.; Charpentier, C. L'élevage sur lie de vins blancs de Bourgogne II. Évolution des macromolécules : polysaccharides et protéines. (1989)

Ficagna, E., Gava, A., Rossato, S.B., Rombaldi, C. V., Borsato, D. Effect on Merlot red wine of fining agents mixture: Application of the simplex centroid design. *Food Sci. Technol.* (2020)40: 729-735

Gerbaud, V.; Gabas, N.; Bloiun, J.; Pellerin, P.; Moutounet, M. Influence of polysaccharides and polyphenols of wine on the crystallization of potassium hydrogen tartrate. *J. Inter. Sci. Vigne Vin.* 1997,31, 65-83

Girbau, T., Stummer, B. E., Pocock, K. F., Baldock, G. A., Scott, E. S and waters, E. J. The effect of *Uncinola necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze- forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* (2004) 10: 125-133.

Gonçalves, Fernando, Alain Heyraud, Maria Norberta de Pinho, and Marguerite Rinaudo, ‘Characterization of White Wine Mannoproteins’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50.21 (2002), 6097–610

Gonzalez-Neves, G., Favre, G. e Gil, G. (2014). Effect of clarification on the color and pigment composition of young red wines. *Food chemistry*, 157,385–392

Gorinstein, S., A. Goldblum, S. Kitov, J. Deutsch, C. Loinger, S. Cohen, and others, ‘The Relationship Between Metals, Polyphenols, Nitrogenous Substances

and Treatment of Red and White Wines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 35.1 (1984), 9–15

Guilloux-Benatier, M.; Guerreau, J.; Feuillat, M. Influence of initial content of colloids on the production of yeast macromolecules and on the metabolism of wine microorganisms. *J. Enol. Vitico.*1995,46,486-492.

Hsu, Juinn-Chin, and David A. Heatherbell, 'Heat-Unstable Proteins in Wine. I. Characterization and Removal by Bentonite Fining and Heat Treatment', *American Journal of Enology and Viticulture*, 38.1 (1987), 11–16

Jaeckels, N., Tenzer, S., Rosch, A., Scholten, G., Decker, H. e Fronk, P. (2015). Removal of glucosidase for bentonite clarification during winemaking. *European food research and technology*, 241(2), 253–262

Kinley S, Obravovic D (2012) Save money and wine by choosing the right bentonite. *Aust NZ Grapegrow Winemak* 583:74–77

Langourieux S., Crouzet J.C., 1997. "Study of interactions between aroma compounds and glycopeptides by a model system", *J. Agric. Food Chem.* 45, 1873-1877.)

Lavigne, V.; Dubourdieu, D. Demonstration and interpretation of yeast lees ability to adsorb some volatile thiols contained in wine. *J. Inter. Sci. Vigne Vin.*1996,30, 201-206.

Llaubères, RM; Dubourdieu, D.; Villetaz, JC Exocellular polysaccharides from *Saccharomices* in wine. *J. Sci. Agroalimentare.*1987,41, 277-280

Lubber, S.; Charpentier, C.; Feuillat, M.; Voilley, A. Influence of yeast walls on the behavior of aromatic compounds in a model wine. *J. Enol. Vitico.*1994b,45, 29-33.

Lubber, S.; Voilley, A.; Feuillat, M.; Charpentier, C. Influence of yeast mannoproteins on the aromatic intensity of a model wine. *Lebensm.-Wiss. Tecno.*1994a,27, 108-114.

Marangon, M., Sauvage, F. X., Waters, E. J. and Vernhet, A. Effects of ionic strength and sulfate upon thermal aggregation of grape chitinases and

thaumatin-like proteins in a model system. *J. Agric. Food Chem.* (2011) 59: 2652-2662.

Miller, GC; Amon, JM; Gibson, RL; Simpson, RF. Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration. *Aust. Vignaiolo Enologo* 1985, 256, 46-50.

Pala A. *Assoenologi giovani n. di luglio-agosto 2018*

Paset M. "Ottimizzazione della capacità chiarificante di una bentonite mediante aggiunta di caolino" tesi unipd 2022

Pashova V., C. Guell, F. López, White wine continuous protein stabilization by packed column *J. Agric. e Food Chemical*, 2004, 52, 1558-1563

Pellerin, P.; Acque, E.; Brillouet, JM.; Moutounet, M. (Effet des polysaccharides sur la formation de brume protéique dans un vin blanc).*J. Int. Sci. Vigne Vin.*1994,28, 23-225.

Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, and D.Dubourdieu, *Trattato di enologia* (Milano: Edagricole, 2017)

Sauvage F.-X. , B. Sauvage, Bach, M. Moutonnet, A. Vernhet. White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation . *Food Chem.*, 2010, 118, 26-34

Schmidt, SA, Tan, EL, Brown, S., Nasution, UJ, Pettolino, F., Macintyre, OJ, Anderson, Pennsylvania (2009). The structure of Hpf2 glycan is essential for protection against the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3308–3315.

Sito acat-papertech <https://www.acat.com/en/product/paper-tech/bentonites>

Sito bentonite.it

Sito lallemmand: <https://www.lallemmandwine.com/it/italy/expertise-document/lieviti-inattivi-specifici-per-la-vinificazione-in-rosso>

Sito OIV- Codex enologico internazionale 2022 <https://www.oiv.int/it/norme-e-documenti-tecnici/prodotti-enologici/codex-enologico-internazionale>



Tattersall, D. B., van Heeswijck, R. and Høj, P. B. 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 Physiol.* (1997)

Van sluyter, Mcrae, Falconer, Smith, Basic, Waters, Marangon "protheic turbidity of wine: mechanisms of formation and progress in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*" 2015"

Vidal S., Williams P., Doco T., Moutounet M., and Pellerin P., 'The Polysaccharides of Red Wine: Total Fractionation and Characterization', *Carbohydrate Polymers*, 54.4 (2003)

Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M. & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439-447.

Vincenzi, Simone, Annarita Panighel, Diana Gazzola, Riccardo Flamini, and Andrea Curioni, 'Study of Combined Effect of Proteins and Bentonite Fining on the Wine Aroma Loss', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63.8 (2015), 2314–20

Waters, E. J., G. Alexander, R. Muhlack, K. F. Pocock, C. Colby, B. K. O'neill, and others, 'Preventing Protein Haze in Bottled White Wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11.2 (2005), 215–25

Waters, Elizabeth J., Patrice Pellerin, and Jean-Marc Brillouet, 'A Saccharomyces Mannoprotein That Protects Wine from Protein Haze', *Carbohydrate Polymers*, 23.3 (1994), 185–91

Waters, Elizabeth J., William. Wallace, and Patrick J. Williams, 'Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40.9 (1992), 1514–19