

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

**STUDIO DELL'INTERAZIONE
TRA LE DIFFERENTI CLASSI DI MACROMOLECOLE
DEI VINI ROSSI ITALIANI, DEL LORO RUOLO
NELLA STABILITA' COLLOIDALE
E NELLA PERCEZIONE DELL'ASTRINGENZA**

Relatore: Prof. Matteo Marangon

Laureanda: Matilde Boschetti

Matricola n. 1028000

ANNO ACCADEMICO 2017 - 2018

A Gloria

INDICE GENERALE

INDICE	5
RIASSUNTO	9
ABSTRACT	11
INTRODUZIONE	13
1) RUOLO DELLE MACROMOLECOLE NEI VINI ROSSI E LEGAME CON L'ASTRINGENZA	15
1.1) Definizione astringenza	15
1.2) Ipotesi chimico - fisiche sul meccanismo dell'astringenza	16
1.3) Proprietà chimico - fisiche della saliva e ruolo nella percezione dell'astringenza	17
1.4) Meccanismo d'interazione tra polifenoli e proteine salivari	20
1.5) Fattori che influenzano l'interazione polifenoli – proteine salivari e la percezione dell'astringenza	21
1.6) Proprietà sensoriali delle sostanze fenoliche del vino rosso	28
1.7) Nuovo metodo analitico per la valutazione dell'astringenza dei vini rossi	31
2) DESCRIZIONE DELLE SINGOLE MACROMOLECOLE DEL VINO	35
2.1) Composizione proteica del vino	35
2.1.1.) Analisi della composizione proteica del vino rosso Portugieser	37
2.1.1.1) Proteine dell'uva	38
2.1.1.2) Proteine del lievito	40
2.1.1.3) Glicoproteine	41
2.1.2) Saggio colorimetrico per la quantificazione delle proteine totali applicato a vini rossi	42
2.1.2.1) Procedure di precipitazione proteica	43

2.1.2.2) Scelta del Saggio Proteico e della Proteina Standard	44
2.1.2.3) Quantificazione proteica nei vini rossi	45
2.2) Composizione in polisaccaridi del vino	47
2.2.1) Caratterizzazione Arabinogalattani (AGP)	48
2.2.2) Caratterizzazione Mannoproteine (MP)	48
2.2.3) Caratterizzazione Ramnogalatturonani di tipo I (RGI)	49
2.2.4) Caratterizzazione Ramnogalatturonani di tipo II (RGII)	50
2.2.5) Quantificazione di polisaccaridi e oligosaccaridi nel vino rosso	51
2.3) Composizione polifenolica del vino	54
2.3.1) Flavan - 3 -oli monomerici e polimerici	55
2.3.2) Composti fenolici non flavonoidi e flavanoli	57
2.3.3) Polimeri Pigmentati	57
2.3.4) Saggio di Quantificazione dei polifenoli nel vino rosso	59
3) STABILITA' COLLOIDALE DEL VINO ROSSO	65
3.1) Fattori che influenzano la stabilità colloidale del vino rosso	65
3.2) Legami che caratterizzano la frazione colloidale del vino rosso	69
3.3) Esempi di sostanze fenoliche coinvolte nello stato colloidale del vino rosso	72
4) TORBIDITA' NEL VINO ROSSO	75
4.1) Evoluzione della torbidità nel vino	75
4.2) Fattori responsabili della torbidità del vino	76
4.3) Modello Multivariato dell'effetto dei diversi fattori sulla torbidità del vino rosso	78

5) SCOPO DELLA TESI	83
6) MATERIALI E METODI	85
6.1) Scopo del Progetto PRIN	85
6.2) Campionamento vini rossi	86
6.3) Procedura per la quantificazione del contenuto proteico totale in vini rossi commerciali	87
6.4) Procedura per la quantificazione dei polisaccaridi totali in vini rossi commerciali	90
6.5) Procedura per la stima indiretta della reattività dei tannini alla BSA (Indice di BSA)	93
6.6) Procedura per lo svolgimento dell'Heat Test o Test al Calore	94
7) RISULTATI E DISCUSSIONE	97
7.1) CONTENUTO IN PROTEINE TOTALI	97
7.2) GRAFICI INDIVIDUALI DELLE PROTEINE TOTALI	99
7.2.1) Vini rossi con valori di concentrazione proteica simili	104
7.2.2) Vini rossi con valori di concentrazione proteica variabili	105
7.3) CONTENUTO IN POLISACCARIDI TOTALI	106
7.4) GRAFICI INDIVIDUALI POLISACCARIDI TOTALI	108
7.5) INDICE DI BSA	115
7.6) GRAFICI INDIVIDUALI BSA	117
7.7) CORRELAZIONI	121
7.7.1) Correlazione Proteine totali - Polisaccaridi Totali	121
7.7.2) Correlazione Proteine totali - Indice BSA	122
7.7.3) Correlazione Polisaccaridi Totali - Indice BSA	123
7.8) STABILITA' COLLOIDALE	124

8) CONCLUSIONI	129
9) BIBLIOGRAFIA	133

RIASSUNTO

Le macromolecole dei vini (proteine, polisaccaridi e polifenoli) hanno notevole importanza per la qualità dei vini in quanto sono in grado di influenzare caratteristiche sensoriali quali la percezione dell'astringenza, e caratteristiche molecolari quali la stabilità colloidale. Ad oggi, non esiste una caratterizzazione approfondita della frazione macromolecolare dei principali vini rossi italiani. In questa tesi lo scopo è stato quello di quantificare le macromolecole di oltre 100 vini rossi italiani e di studiare la loro interazione al fine di delucidare il loro ruolo nella stabilità colloidale e nella percezione dell'astringenza dei vini. In particolare, si sono messi a punto ed applicati diversi metodi colorimetrici per la quantificazione di proteine e polisaccaridi dei vini, oltre che la messa a punto di un nuovo metodo analitico indiretto per determinare l'astringenza dei vini.

In generale, si è notata una grande variabilità inter- ed intra-varietale per i parametri considerati. Tali dati sono stati utilizzati per valutare la possibile presenza di correlazione per evidenziare il livello d'interazione delle macromolecole in soluzione e il loro conseguente impatto sulla stabilità colloidale dei campioni.

I quantitativi proteici medi sono stati di circa 43 mg/L, con punte di 155 mg/L, mentre per i polisaccaridi i valori medi rilevati erano di circa 495 mg/L con punte di 1081 mg/L. Tali valori sono stati confrontati con dati presenti in bibliografia ed hanno evidenziato un comportamento in linea con quanto riportato da autori stranieri per le proteine, mentre hanno evidenziato valori tendenzialmente maggiori per i polisaccaridi, fatto che potrebbe giocare un ruolo rilevante nella modulazione della percezione di astringenza nei vini.

Questo approccio potrebbe fornire degli interessanti elementi per indagare il ruolo individuale delle molecole presenti in soluzione, nell'interazione con altri componenti e nell'equilibrio dello stato colloidale del vino rosso, e rappresentare un ulteriore importante contributo per il miglioramento della valutazione dell'astringenza nei campioni selezionati.

ABSTRACT

Wine macromolecules (proteins, polysaccharides and polyphenols) play an important role for the quality of wines as they are able to influence sensory characteristics such as the perception of astringency, and molecular characteristics such as colloidal stability. To date, there is no in-depth characterization of the macromolecular fraction of the main Italian red wines. In this thesis the aim was to quantify the macromolecules of a large set of Italian red wines and to study their interaction in order to better understand their role in colloidal stability and in the perception of the astringency. In particular, different colorimetric methods have been developed and applied for the quantification of proteins and polysaccharides, as well as the development of a new indirect analytical method to determine the astringency of wines. In general, a large inter-and intra-varietal variability was noted for the parameters considered. These data were used to evaluate the possible presence of correlation to highlight the level of interaction of the macromolecules in solution and their consequent impact on the colloidal stability of the samples. The average protein quantities were about 43 mg/L, with peaks of 155 mg/L, while for polysaccharides the average values were about 495 mg/L with peaks of 1081 mg/L. These values were compared with data in the bibliography and showed a behavior in line with what was reported by foreign authors for proteins, while they showed values that tend to be higher for polysaccharides, which could play an important role in modulating the perception of astringency in Italian red wines. This approach could provide some interesting elements to investigate the individual role of the molecules present in the solution, their interaction with other components and the colloidal state of red wines, and

represent a further important contribution towards a better understanding of the drivers of astringency in Italian red wines.

INTRODUZIONE

Il crescente interesse dell'industria enologica italiana nel fornire sul mercato vini rossi che presentano un livello di astringenza equilibrato e piacevole, insieme alla carenza di informazioni riguardo alle caratteristiche sensoriali tipiche di ogni vino, ha portato ad avviare un Progetto di Ricerca indirizzato a fornire una descrizione completa della diversità di composizione esistente tra vini rossi provenienti dalle maggiori regioni vinicole italiane, in riferimento all'impatto che questo aspetto può avere sull'astringenza percepita dai consumatori. Il lavoro di tesi che viene presentato nell'elaborato si inserisce all'interno di questo Progetto di Ricerca.

Con l'obiettivo di indagare il ruolo che le macromolecole ricoprono in soluzione, è stata eseguita la quantificazione della concentrazione totale di proteine e polisaccaridi ed è stato messo a punto un metodo indiretto per studiare la reattività dei tannini con una proteina standard . La successiva esecuzione di prove di Heat Test o Test al Calore, ha consentito inoltre di stimare l'impatto che questi componenti, fondamentali per assicurare la produzione di un vino rosso di qualità, possono avere sulla stabilità del prodotto finito durante il periodo di commercializzazione.

I dati raccolti nella tesi hanno permesso di ricavare delle importanti informazioni riguardo il livello d'interazione che esiste tra le principali categorie di macromolecole del vino e riguardo all'influenza che esse possono avere sull'equilibrio del suo stato colloidale.

I risultati ottenuti potranno in futuro essere utilizzati come punto di partenza per compiere ulteriori ricerche in questo ambito.

1) RUOLO DELLE MACROMOLECOLE NEI VINI ROSSI E LEGAME CON L'ASTRINGENZA

1.1) Definizione di astringenza

I primi a sviluppare un vocabolario per descrivere le sensazioni legate all'astringenza avvertite a livello del palato, sono stati Lawless e collaboratori nel 1994, dopo aver testato diverse sostanze astringenti, come sali, tannini idrolizzabili, acidi carbossilici e loro miscele, le quali producono diversi picchi massimi di astringenza a cui corrispondono differenti velocità di decadimento. E' stato verificato che l'acido tannico è tra i più persistenti, con un complesso profilo sensoriale. La percezione dell'astringenza nell'ambiente orale viene definito un processo molto dinamico, che varia continuamente tra sensazioni di secchezza, rugosità e raggrinzimento della struttura cutanea della bocca, misurate nel loro insieme attraverso il coefficiente di frizione, avvertito quando le sostanze tanniche entrano in contatto con i meccanorecettori della lingua. Con specifico riferimento al vino rosso, un gruppo di panelisti esperti tra cui lo studioso Gawel (2000), ha sviluppato dei termini specifici per descrivere la sensazione di astringenza suscitata da un ampio set di campioni rappresentativi di vini rossi Italiani, Francesi e Australiani, tra cui si inseriscono gli aggettivi "setoso", "gessoso", "di carta smerigliata". Ad essi sono stati poi affiancati nella terminologia sensoriale altri descrittori più astratti, come "sapore nobile", "vegetale", "amaro", "acido", "legnoso" o "duro" tenendo presente che in generale un vino rosso di qualità deve presentare un livello bilanciato di astringenza.

Nel paragrafo successivo verranno quindi approfonditi i fattori chimico - fisici che stanno alla base dell'astringenza.

1.2) Ipotesi chimico - fisiche sul meccanismo di astringenza

La prima ipotesi chimico - fisica sull'origine della sensazione di astringenza è stata esposta da Breslin e suoi collaboratori nel 1993, i quali l'hanno definita come sensazione tattile dovuta all'incremento della frizione all'interno dell'ambiente orale, avanzando la considerazione che fosse una proprietà sensoriale. Negli anni successivi, Critchely e Rolls (1996), hanno eseguito degli approfondimenti per comprendere se il contatto dei recettori gustativi con sostanze fenoliche come gli acidi tannici, stimolassero delle risposte a livello cerebrale. I risultati di tali esperimenti hanno confermato questa teoria, rilevando attività neurologica in risposta alla percezione di astringenza a livello della corteccia cerebrale orbito - frontale, del nervo glosso - faringeo e della *Chorda tympani*, costituita da fibre nervose mecano - recettive. Le sostanze astringenti utilizzate nello studio erano tannini idrolizzabili in ambiente acido e all'assaggio suscitavano sia sensazioni di acidità che di amarezza.

E' stato inoltre verificato dal ricercatore Guinard e collaboratori nel 1986, che l'astringenza percepita tende ad aumentare di molto quando il tempo tra l'ingestione di bevande o alimenti tannici è ridotto, affermando che il legame dei polifenoli con le proteine epiteliali della bocca avviene dopo una prima complessazione con le proteine salivari. Tuttavia, ad un certo punto, la percezione dell'astringenza diminuisce per effetto dell'adattamento dei recettori gustativi che giungono a saturazione.

Inoltre, la supposizione che essa fosse una sensazione tattile, è stata confermata da un'ulteriore esperienza svolta da Breslin (1993) il quale ha verificato che l'astringenza poteva essere percepita in maniera differente a

seconda delle diverse aree della bocca con cui il vino veniva a contatto, in dipendenza del flusso dei composti fenolici e della saliva, comprendendo anche superfici non - gustative come le labbra superiori.

1.3) Proprietà chimico - fisiche della saliva e ruolo nella percezione dell'astringenza

Più del 93% della saliva umana viene secreta da tre paia di ghiandole esocrine maggiori, la parotide, le ghiandole sottomandibolari e le ghiandole sottolinguali (Dawes e Wood, 1973). Ci sono inoltre delle ghiandole accessorie o minori, tra le quali si possono distinguere la ghiandola boccale, la labiale, la palatina, la glosso - palatina, la linguale, la linguale anteriore e la ghiandola di von Ebner (Ferguson 1975, Green e Embery, 1985). La saliva è un fluido acquoso altamente diluito, che contiene prevalentemente proteine, glicoproteine, glicolipidi, carboidrati, siero e ioni inorganici (Wu et al., 1994). Ogni classe di composti contribuisce a più di una delle maggiori attività biologiche della saliva, tra cui se ne ricordano alcune come la copertura e lubrificazione delle superfici della mucosa orale, la loro idratazione, la riduzione della frizione tra il bolo alimentare e i denti durante la masticazione. E' proprio la diminuzione dell'abilità di lubrificazione della saliva, a causa della presenza dei polifenoli nel vino, che facilita la comprensione del meccanismo di astringenza (Mandel, 1987).

E' utile quindi sapere che le proprietà lubrificanti della saliva derivano da specifici composti proteici presenti al suo interno: alcune mucoproteine definite Mucine, delle Proteine Glicosilate Ricche di Prolina (GPRP) e delle Istitidine che verranno descritte nei paragrafi successivi.

- **Mucine**

Le mucine costituiscono il 26% del contenuto proteico totale della saliva umana (Fox et al., 1985). Vengono prodotte per la maggioranza dalle ghiandole sottolinguali e accessorie, ma in parte anche dalle sottomandibolari (Hensten-Pettersen, 1975). Se ne sono riconosciute due tipologie principali, MG1 di alto peso molecolare tra 2.000 e 2.500 kDa e la più piccola MG2, che si attesta tra 150 e 200 kDa (Cohen e Levine, 1989). Sono costituite da subunità legate tra loro attraverso ponti disolfuro, ognuna delle quali forma dei corti domini non glicosilati, alternati con estesi domini glicosilati (Nieuw Amerongen et al., 1995).

I domini glicosilati a loro volta sono caratterizzati da estese ed eterogenee catene oligosaccaridiche, attaccate a residui di serina o treonina attraverso legami α -glicosidici ad un residuo di N - acetilglucosamina nella regione centrale delle Mucine. Le sequenze ripetitive degli amminoacidi lungo le catene peptidiche sono formate per 1/3 da idrossi - amminoacidi, per il 30 - 35% da glicina, prolina, alanina e per quantità più piccole da amminoacidi aromatici, mentre i residui terminali sono costituiti da acido sialico, gruppi solfato e fucosio (Wu et al., 1994).

- **Proteine ricche di prolina**

Circa il 70% delle proteine delle secrezioni salivari della parotide e delle ghiandole sottomandibolari appartengono ad un'unica famiglia multigenica di Proteine Ricche in Prolina, le PRP (Kauffman e Keller, 1979). Esse sono composte da un peptide segnale e da una sequenza amminoacidica terminale, caratterizzata da una struttura primaria ripetitiva costituita da prolina, glicina, acido glutammico e glutammina (Hay et al., 1988). Questi residui comprendono circa il 70 - 88% della sequenza amminoacidica totale. Le PRP sono altamente polarizzate, con degli amminoacidi terminali carichi negativamente, seguiti da un'estesa sequenza non polare (Ferguson, 1991).

In generale, le Proteine Ricche di Prolina possono essere suddivise in tre principali categorie: le PRP acide, con peso molecolare tra i 12 e i 16 kDa, quelle basiche di peso molecolare tra 6 e 9 kDa e quelle glicosilate con un peso molecolare maggiore rispetto alle altre due, tra i 36 e i 78 kDa. Al loro interno, la presenza di residui di prolina giunge al 30 - 45% del totale, mentre la glicina insieme all'acido glutammico costituisce il restante 45% (Kauffman e Keller, 1979). I residui acidi degli amminoacidi possiedono un basso valore di punto isoelettrico (pI) posto tra 4 e 5, mentre quello dei residui basici è più alto, compreso tra i valori 9 e 10. Le PRP glicosilate invece, contengono sei unità oligosaccaridiche attaccate al centro della proteina attraverso legami N - glicosidici a residui di asparagina, treonina e serina (Reddy et al., 1982).

Delle sei unità di carboidrati presenti, una contiene acido sialico mentre le altre sono neutre.

Sulla base degli approfondimenti a livello strutturale, portati avanti da McArthur e i suoi collaboratori dal 1995, è stato possibile concludere che tutte

le proteine ricche in prolina, acido glutammico, glicina e glutammina hanno un'elevata affinità per i polifenoli del vino rosso, poiché nel loro insieme questi residui amminoacidici influenzano in maniera significativa il processo di riconoscimento tra i polifenoli e le PRP.

- **Istidine**

L'ultima importante famiglia di proteine salivari deriva dalle secrezioni sottomandibolari e della parotide, che contengono diversi peptidi di basso peso molecolare ricchi in istidina, arginina e lisina (Lamkin e Oppenheim, 1993).

I principali vengono nominati Istidina 1, Istidina 3 e Istidina 5 e possiedono una specifica attività antimicrobica. Recentemente, alcuni studi (Yan e Bennik, 1995) hanno evidenziato che le Istidine possono essere ancora più efficaci delle PRP nel precipitare i tannini condensati al valore di pH del vino, grazie al forte legame che avviene attraverso le interazioni idrofobiche tra le catene laterali di lisina e arginina e la zona aromatica dei polifenoli.

1.4) Meccanismo d'interazione tra polifenoli e proteine salivari

I fattori che maggiormente influiscono sulle proprietà viscoelastiche della saliva, vengono riconosciuti sia nella concentrazione e nel tipo di proteine solvate al suo interno, sia nelle interazioni non covalenti, idrofobiche e legami idrogeno che si instaurano tra di esse (Gerken 1993, Lofdahl e Odeblad, 1980). In questo contesto, le Proteine Glicosilate Ricche in Prolina (GPRP) ricoprono un ruolo fondamentale nel mantenere la caratteristica viscosità della saliva, mentre le Istidine influenzano la percezione dell'astringenza durante il

consumo di vino rosso. In questo paragrafo, verranno quindi analizzati i fattori che intervengono nella formazione del legame tra proteine salivari e specie polifenoliche del vino.

Il ricercatore Luck e i suoi collaboratori, nel 1994, hanno osservato che attorno ai siti di legame dei complessi tannici e proteici durante la coalescenza si forma uno strato di molecole d'acqua altamente ordinato, in un effetto entropico. Successivamente all'aggregazione, le interazioni idrofobiche e i legami idrogeno tendono a stabilizzare i complessi che si formano, coinvolgendo in particolare l'anello fenolico dei polifenoli sia monomerici che polimerici e la prolina o la glicina delle PRP (Baxter et al., 1997).

Un secondo meccanismo di precipitazione proteica in presenza di proantocianidine, è stato proposto da Mac Manus nel 1981 e prevede che, a basse concentrazioni di proteine salivari, sulla loro superficie si formi un monostrato di polifenoli associati. Siccome questa superficie è meno idrofila della proteina stessa, avviene l'aggregazione e la precipitazione proteica. Mentre, ad alte concentrazioni di proteine, l'aggregazione e la precipitazione sono rese possibili dalla formazione di un cross - linking tra le molecole proteiche e i polifenoli.

1.5) Fattori che influenzano l'interazione polifenoli - proteine salivari e la percezione dell'astringenza

L'estensione delle interazioni tra proteine salivari e tannini e la formazione di complessi molecolari è influenzata da diversi fattori sia di tipo fisico che chimico. Prima di tutto viene riconosciuta la grande importanza della struttura molecolare, della forma e della massa dei substrati, insieme alla loro

concentrazione assoluta in soluzione e il grado di idrosolubilità, poiché più è basso maggiori saranno le interazioni tra polifenoli e proteine e più aumenterà la possibilità che avvenga la precipitazione. Altri elementi fondamentali sono il grado di glicosilazione e l'idrofobicità delle proteine, il pH del mezzo, la concentrazione ionica, la concentrazione di etanolo e la temperatura alla quale queste interazioni avvengono. Inoltre, non bisogna dimenticare che il legame tra un particolare tipo di molecola polifenolica e una proteina è competitivo rispetto alla presenza di altre sostanze in soluzione, come nell'esempio del vino dove si trovano in particolare i polisaccaridi che possono influenzare l'intensità dell'astringenza percepita al momento del consumo, modificando la velocità di flusso e la composizione della saliva.

Inoltre, la capacità dei tannini condensati e idrolizzabili di legare le proteine e aumentare la sensazione di astringenza, incrementa con il grado di polimerizzazione fino al raggiungimento di un valore limite (MacManus et al., 1985).

- **Effetto dell'alcol etilico**

E' stato dimostrato che l'intensità della sensazione di astringenza diminuisce in presenza di alte concentrazioni di etanolo, dove esso diventa un accettore di legami idrogeno (Noble, 1990). Inoltre, alcuni modelli di studio hanno verificato che l'etanolo ha un effetto depressivo sulla precipitazione di tannini condensati e proteine PRP, poiché aumenta la loro solubilità in quanto vengono distrutti i legami idrofobici con le proteine della saliva (Calderon et al., 1968). E' stato osservato infine, che la presenza di etanolo migliora la lubrificazione della

mucosa orale oltre che aumentare l'amarezza percepita in presenza dei flavan - 3 - oli monomerici tipici del vino rosso (Fischer e Noble, 1994).

- **Effetto dell'acidità**

La precipitazione dei complessi tra tannini e proteine dipende anche dal range di pH a cui avviene. Gli acidi organici come il tartarico, presente nell'uva, dimostrano differenti e complessi profili astringenti e il pH in questo contesto diventa il fattore determinante nello stimolare l'intensità percepita dell'astringenza. Gli acidi possono creare astringenza attraverso la riduzione diretta della viscosità della saliva, che decresce con la diminuzione del pH e tale effetto diviene maggiore aumentando la concentrazione proteica al suo interno.

Yokotsuka e Singleton nel 1995 hanno dimostrato che, in un range di pH da 2,5 a 4,5, la precipitazione di tannini di diverso peso molecolare avviene in maniera completa quando essi sono legati alle Proteine Ricche di Prolina della saliva (PRP). Più grandi sono le dimensioni dei polifenoli, più efficace è l'interazione con le proteine. In vini modello, è stato verificato che l'intensità massima e la durata totale della sensazione di astringenza nella bocca prodotta da una miscela fenolica dei maggiori flavan - 3 - oli del vino rosso, incrementa con la diminuzione del pH. Infatti essa viene esaltata a valori di pH bassi, in quanto vi è una proporzione minore di molecole fenoliche rispetto alle proteine salivari, perciò vi è una maggiore propensione nel formare complessi proteici e tannici attraverso il rafforzamento delle interazioni idrofobiche, dei legami idrogeno e la neutralizzazione dei carboidrati carichi negativamente presenti sulla superficie delle proteine della saliva (Kallithraka et al., 1997).

Per questa ragione, al momento del consumo di vino rosso vi è una diminuzione dell'abilità lubrificante della saliva che risulta in una maggiore astringenza percepita. Una spiegazione collegata a questo fenomeno è il fatto che la mucina MG1 ha un $pK < 2,5$, mentre quello delle Proteine Ricche in Prolina Glicosilate (GPRP) è ben al di sopra del pH tipico della saliva, che varia tra i valori 3 e 5, supportando l'ipotesi che le Mucine ricoprano un ruolo maggiore rispetto alle GPRP nella percezione dell'astringenza (Christensen et al., 1987).

- **Effetto della forza ionica**

L'effetto del pH sull'interazione polifenoli - proteine è anche dipendente dalla concentrazione delle specie ioniche presenti in soluzione (Oh et al., 1980). La saliva umana contiene un complesso range di ioni inorganici e ioni di fosfato organico. Tra di essi sono stati riconosciuti ioni di magnesio (Mg^{+}) e calcio (Ca^{+}), insieme a potassio (K^{+}) e sodio (Na^{+}) (Martin et al., 1985). In tale contesto, Clamp e collaboratori nel 1978 hanno avanzato l'ipotesi che in un ambiente acido la carica delle proteine sia mascherata dalla presenza di questi ioni che riducono la repulsione elettrostatica tra le molecole proteiche, aumentando contemporaneamente le forze idrofobiche che promuovono l'interazione tra di esse. Questo ha permesso di confermare che la componente ionica salivare è un elemento essenziale per permettere la formazione di aggregati insolubili tra tannini e proteine in sistemi mediamente acidi e in presenza di eccesso di polifenoli, come avviene quando il vino rosso giunge a contatto con l'ambiente orale.

- **Effetto dei polisaccaridi e degli oligosaccaridi**

E' stato dimostrato che la presenza di polisaccaridi nel vino rosso può inibire l'interazione tra tannini e proteine e portare ad una perdita della percezione di astringenza (Smith et al., 1996). Differenti classi di polisaccaridi sono state descritte come composti capaci di interagire con i tannini del vino o con gli aggregati di proantocianidine, riducendo la presenza di polifenoli in forma libera in soluzione. In vini modello è stato verificato da Van der Reijden e collaboratori nel 1996, che la componente acidica dei polisaccaridi, come i ramnogalatturonani di tipo II, ricopre un ruolo fondamentale nella riduzione dell'astringenza percepita totale, che porta ad un cambiamento nell'effetto lubrificante della saliva. Tuttavia, un minimo contributo in tale senso viene apportato anche dalla frazione polisaccaridica neutra.

Per verificare quale impatto possono avere le componenti polisaccaridica e oligosaccaridica nel vino rosso sulla percezione dell'astringenza, in questo paragrafo viene riportato l'esempio dello studio svolto da Quijada - Morin e collaboratori nel 2014, dove viene analizzato il profilo polisaccaridico di vini rossi Spagnoli della varietà Tempranillo, relazionandolo all'effetto complessivo che esso può avere sull'astringenza del vino percepita al momento dell'assaggio. I vini rossi selezionati appartenevano alle Denominazioni d'Origine "Ribera de Duero", "Toro" e "Rioja". Per spiegare la relazione che esiste tra la composizione in polisaccaridi e l'astringenza percepita dei campioni, è stata costruita una regressione lineare multipla dove l'astringenza rappresentava la variabile dipendente, mentre le concentrazioni di proantocianidine e delle classi di polisaccaridi e oligosaccaridi le variabili indipendenti. Delle 21 variabili inizialmente selezionate, solo 9 erano

statisticamente significative per descrivere la relazione con l'astringenza nel modello di correlazione definitivo da cui è stato evidenziato il 96,8% di corrispondenza tra i dati.

Tutte le classi di polisaccaridi contenute nei campioni mostravano la capacità di diminuire l'astringenza percepita e l'effetto diventava maggiore quando veniva fatto riferimento ai ramnagalatturonani di tipo II, con una variabilità del 54,5% e alle mannoproteine con una variabilità del 74,5%. L'effetto delle mannoproteine nel diminuire l'astringenza è stato relazionato al fatto che esse siano in grado di legare le proantocianidine rendendole indisponibili a interagire con le proteine salivari, mentre l'effetto inibitorio dei ramnagalatturonani sull'astringenza percepita totale è stato studiato con correlazione positiva in vini modello e questo studio ha confermato tale risultato per la prima volta su matrici reali. La spiegazione può essere dovuta al fatto che i ramnagalatturonani presentano alcuni zuccheri e legami inusuali nella loro struttura molecolare, infatti sono i polisaccaridi più ramificati e complessi presenti nel vino rosso e questo aspetto può essere correlato direttamente alla diminuzione della percezione di astringenza.

Tra le frazioni oligosaccaridiche individuate, quattro residui glicosidici hanno mostrato correlazione con l'astringenza percepita: lo xilosio, il ramnosio, il galattosio e il mannosio.

In particolare, alte concentrazioni di galattosio corrispondevano ad basse percentuali di Polisaccaridi Ricchi di Arabinosio e Galattosio (PRAG), così come un incremento di mannosio era correlato ad una veloce degradazione delle mannoproteine, che non erano più disponibili a legare le proteine salivari per stimolare astringenza. In generale, alte concentrazioni di ramnosio tendevano a ridurre l'intensità dell'astringenza percepita, mentre un alto contenuto di

galattosio enfatizzava la sua percezione. L'influenza di mannosio e xilosio invece era minore rispetto ai primi due. La rilevazione di queste differenze, può essere collegata al grado di polimerizzazione raggiunto dai polisaccaridi in soluzione e alla loro struttura tridimensionale, perciò si può concludere che la presenza di singoli oligosaccaridi non sia in grado di indurre cambiamenti significativi nell'astringenza percepita di un vino rosso. In ogni caso, l'aggiunta di polisaccaridi e oligosaccaridi come variabili composizionali, ha consentito di migliorare in maniera considerevole la rappresentatività del modello prescelto. Analizzando nel complesso la curva di calibrazione, si è riscontrato che nel modello le epicatechine e le proantocianidine erano le componenti che, in base al loro diverso grado di galloilazione, hanno influenzato maggiormente la valutazione dell'astringenza percepita in relazione alla concentrazione di polisaccaridi in soluzione (Quijada - Morìn et al., 2014).

- **Percezione individuale dell'astringenza**

Anche la percezione individuale dell'astringenza è un elemento da tenere in considerazione e dipende soprattutto dalla velocità del flusso della saliva e dalla durata dell'astringenza percepita da ognuno (Fischer et al.,1994).

Un altro fattore da considerare, è l'efficacia con cui avviene il legame tra polifenoli e proteine a livello individuale, con particolare attenzione alla composizione proteica, alla concentrazione e al pH della saliva. L'acido carbonico o bicarbonato è il più importante sistema tampone della saliva umana. Insieme ai fosfati inorganici mantiene il pH della saliva > 6 e la sua capacità tamponante è maggiore quando la produzione di saliva viene stimolata.

La concentrazione proteica della saliva a contatto con i tannini del vino inizialmente tende a decrescere rapidamente, seguita da un marcato incremento trascorsi alcuni minuti dall'ingestione. La proporzione delle Proteine Ricche in Prolina secrete non viene alterata dopo la stimolazione salivare, mentre quella delle Istidine tende ad aumentare in queste circostanze. Questo fenomeno evidenzia come l'introduzione di differenti sostanze polifenoliche nell'ambiente orale durante l'assaggio del vino rosso, possa modificare la componente proteica della saliva e quindi provocare una diversa percezione dell'astringenza da un consumatore all'altro (Fischer et al.,1994).

1.6) Proprietà sensoriali delle sostanze fenoliche del vino rosso

Le sostanze astringenti che si trovano nell'uva vengono suddivise in tre classi principali: quella dei flavan - 3 - oli, quella dei composti non - flavonoidi e quella dei polimeri pigmentati. Questi composti sono caratterizzati ognuno da uno specifico profilo sensoriale che verrà descritto nei paragrafi successivi.

- **Caratteristiche sensoriali dei flavanoli monomerici e polimerici**

E' stato verificato da Robichaud e Noble (1990) l'impatto sensoriale delle forme monomeriche e polimeriche dei flavan - 3 - oli presenti nel vino rosso, evidenziando che entrambe le forme possono indurre sia sensazioni di astringenza che di amarezza percepibili al momento dell'assaggio. Infatti, una volta avvenuta l'ingestione, l'intensità massima della percezione di astringenza e amarezza e la durata della sensazione all'interno della bocca, tendono ad aumentare in maniera proporzionale all'incremento della concentrazione di

flavan - 3 - oli in soluzione (mg/l). Nel vino rosso, le forme monomeriche dei flavan - 3 - oli, raggiungono un picco massimo di intensità dell'astringenza più velocemente rispetto alle forme polimeriche, anche se la durata della sensazione astringente nell'ambiente orale è inferiore. Le stesse considerazioni possono valere anche per la percezione dell'amarezza, dato che le forme polimeriche dei tannini tendono ad esaltare tale caratteristica sensoriale rispetto ai dimeri, trimeri e tetrameri della stessa tipologia di molecole. Tuttavia, sono state rilevate anche delle differenze sensoriali tra alcune forme monomeriche nel gruppo dei flavan - 3 - oli.

Ad esempio, le epicatechine presentavano un picco di astringenza e amarezza più alto e di maggior persistenza rispetto a quello delle catechine, dettato solamente dalla diversa posizione di un gruppo idrossile sulla loro superficie. Questo aspetto conferma, come accennato nei paragrafi precedenti, che la percezione dell'astringenza viene direttamente influenzata dalla struttura chimica delle singole molecole e dal grado di polimerizzazione che esse raggiungono in soluzione.

- **Caratteristiche sensoriali dei composti non - flavonoidi e dei flavanoli**

Gli studiosi Singleton e Noble (1976), hanno evidenziato che le proprietà sensoriali della classe di composti definiti come idrossicinammati possono essere sia di astringenza che di amarezza. Nei vini questi composti sono presenti generalmente in concentrazioni vicine o al di sotto del limite di detection (LD) e questo indica che essi possiedono uno scarso impatto sensoriale. Un'analisi sensoriale eseguita attraverso un test duo - trio, ha dimostrato che i panelisti non erano in grado di distinguere le note aromatiche

legate alla presenza di acido caffeico, cumarico e caftarico nonostante queste sostanze venissero presentate alla più alta concentrazione endogena possibile nel vino. Tuttavia, la combinazione di acidi come l'idrossicinnamico e l'idrossibenzoico, possono avere comunque un effetto sensoriale.

Nel vino rosso i composti non - flavonoidi sono relativamente scarsi, si attestano circa sui 250 mg/l se comparati con i flavonoidi che invece arrivano a 1500 mg/l in soluzione.

La loro presenza impartisce al vino note amare e contribuisce alla "durezza" nella sensazione astringente. In particolare, tra questi componenti la Quercetina è stata ritrovata a concentrazioni significative per avere un impatto sensoriale (30 mg/l), poiché stimola il gusto amaro mentre presenta una debole astringenza.

- **Caratteristiche sensoriali dei polimeri pigmentati**

I ricercatori Singleton e Trousdale (1992), hanno suggerito che alcuni polimeri pigmentati presenti nel vino rosso potessero avere un impatto sull'astringenza. Tuttavia l'effetto astringente di questi composti rimane debole, in quanto attraverso l'incorporazione di un sale flavylum e della sua porzione glicosilata aumentano la loro solubilità, perciò la forza delle interazioni che essi riescono ad instaurare con le proteine salivari rimane limitata e non favorisce la precipitazione dei complessi tannino - proteici che stimolano la percezione di astringenza.

I termini sensoriali per definire l'astringenza "forte" o "debole", derivano quindi dal rapporto tra le proantocianidine monomeriche e polimeriche dei flavan - 3 - oli, i quali risultano essere i composti fenolici che maggiormente influiscono

sull'amarezza e l'astringenza percepite al momento del consumo di un vino rosso.

1.7) Nuovo metodo analitico per la valutazione dell'astringenza dei vini rossi

Attualmente nel mercato enologico vi è grande richiesta di vini rossi invecchiati in botte o in bottiglia che possiedano delle particolari caratteristiche, ossia che siano tannici, colorati, corposi e astringenti. Il colore del vino rosso è dovuto principalmente a composti fenolici come le antocianidine e le proantocianidine, che si trovano naturalmente nell'uva e vengono estratte durante la fermentazione. Esse inoltre, legandosi alle proteine salivari, inducono la peculiare sensazione di astringenza al momento del consumo, che viene stimata di solito attraverso le prove di assaggio effettuate durante un panel test.

Sebbene i panelisti siano appositamente formati per valutare la qualità di specifici alimenti o bevande, nella loro percezione permane un fattore di soggettività che può influenzare il risultato finale dell'analisi sensoriale, perciò nel tempo è nata l'esigenza di trovare un metodo di valutazione più analitico ed oggettivo.

Nel contesto del vino rosso, nel 2004 è stato proposto da Llaudy e collaboratori un metodo predittivo per la stima dell'astringenza che correla la composizione polifenolica dei campioni con un'analisi colorimetrica.

Oggigiorno, il metodo analitico più diffuso per stimare le proprietà astringenti dei vini rossi prevede l'utilizzo dell'Indice di Gelatina (Gelatin Index). Questa procedura richiede che la concentrazione di proantocianidine in soluzione venga valutata prima e dopo l'aggiunta in eccesso di gelatina al vino. Tale

metodo, sebbene sia riproducibile, fornisce solo un risultato approssimativo in quanto parte delle proantocianidine presenti inizialmente in soluzione sono soggette a idrolisi acida durante la fermentazione ed inoltre in esso non viene tenuto conto dell'interferenza che le diverse macromolecole presenti nel vino potrebbero apportare all'analisi. In aggiunta la gelatina, derivando dal collagene, è una miscela di proteine diverse perciò questo può diventare un'importante fonte di variabilità e imprecisione. Il nuovo metodo proposto da Llaudy et al. (2004) invece, si basa sull'impiego di Ovoalbumina che viene di solito aggiunta come agente chiarificante ai vini rossi, in quanto ha la capacità di legare e precipitare i tannini presenti in soluzione. Un vantaggio rispetto alla gelatina è che l'Ovoalbumina è una proteina singola e questo rende il metodo più riproducibile e la determinazione dell'astringenza più oggettiva.

In questo caso, l'aggiunta progressiva di Ovoalbumina provoca un decremento dell'assorbanza del supernatante che presenta un andamento logaritmico e viene misurata ad una lunghezza d'onda di 280 nm. Essa rappresenta l'indicatore della concentrazione polifenolica del vino rosso. Quando una piccola quantità di Ovoalbumina viene aggiunta ad una soluzione di acidi tannici, si formano dei complessi tra proteine e tannini che appaiono come precipitati torbidi. Inizialmente la quantità di acido tannico è maggiore rispetto a quella dell'Ovoalbumina, quindi tutte le proteine in soluzione si legano ad una certa quantità di tannini e precipitano. Tuttavia, quando l'Ovoalbumina raggiunge la concentrazione massima in soluzione, quella dei tannini aumenta sempre meno fino a che non rimane più acido tannico in soluzione e l'Ovoalbumina, che non riesce a precipitare, aumenta il valore dell'assorbanza a 280 nm.

I due metodi analitici sono stati applicati in confronto all'analisi sensoriale su 10 campioni di vino rosso di diversa origine. I vini sono stati selezionati sulla base della loro diversa composizione fenolica e del livello di astringenza percepita. In generale, l'espressione dell'Intensità di Astringenza tra i metodi analitici e l'analisi sensoriale sono simili, ma se i campioni di vino vengono ordinati in base ad astringenza crescente, si possono notare alcune divergenze tra le diverse tipologie di prove (Llaudy et al., 2004).

Queste considerazioni possono venire confermate dall'ampiezza del range di deviazione standard, che per l'analisi sensoriale arriva al 25,8%, per l'Indice di Gelatina varia tra 11,3% nel caso sia espresso come valore percentuale e 12,9% quando l'espressione del risultato avviene tramite l'Intensità di Astringenza. Il metodo analitico dell'Ovoalbumina invece, presenta la deviazione standard più bassa in assoluto, la quale si attesta intorno al 5,2%. In ogni caso, l'analisi sensoriale deve essere utilizzata come procedura di riferimento per il confronto con altri metodi analitici indirizzati alla stima dell'astringenza.

L'alto coefficiente di correlazione, insieme alla bassa percentuale di errore relativo e all'alta riproducibilità che caratterizzano il metodo con l'Ovoalbumina, portano a concludere che tale prova possa essere applicata in futuro come analisi standard per ottenere dei risultati caratterizzati da maggiore oggettività rispetto all'analisi sensoriale, in quanto questo metodo riproduce al meglio il comportamento dei composti fenolici del vino rosso (Llaudy et al., 2004).

2) DESCRIZIONE DELLE SINGOLE MACROMOLECOLE DEL VINO

2.1) Composizione proteica del vino

La composizione proteica di mosti e vini è caratterizzata dalla presenza di proteine a basso peso molecolare, che si trovano in basse concentrazioni in soluzione. I fattori estrinseci e intrinseci che maggiormente la condizionano, possono essere individuati lungo tutta la filiera di produzione dal campo fino alla cantina e sono riconducibili a: varietà dell'uva, caratteristiche del terreno di coltivazione e clima, che apportano diversi elementi di stress biotici e abiotici alle piante, processo di vinificazione e durata della fase d'invecchiamento in botte o in bottiglia, nonché alle condizioni generali di stoccaggio dei vini. Tuttavia, la fase che in maniera più consistente modifica l'assetto proteico dal succo d'uva al vino è la fermentazione, per effetto della proteolisi e della denaturazione che le proteine dell'uva subiscono a causa dei cambiamenti di pH che avvengono in questo momento specifico. I valori di Punto Isoelettrico (pI) che le sostanze proteiche presentano in soluzione in tali circostanze variano tra 3 e 9 con una media intorno a 4,1 fino a 5,8 e ciò le porta a subire una forte degradazione e modificazione delle loro proprietà chimiche e strutturali originali (Robinson e Davies, 2000).

Diversi studi sono stati svolti nel tempo per chiarire l'origine delle proteine presenti nel vino e hanno rilevato la presenza di diverse decine di polipeptidi, i quali per la stretta somiglianza tra le rispettive masse molecolari sono stati ipotizzati essere correlati tra loro a livello strutturale. Le masse molecolari evidenziate, generalmente si attestano tra i 20 e i 30 kDa, anche se alcuni peptidi presentano valori minimi intorno ai 9 kDa e massimi di 62 kDa. Essi

sono stati riconosciuti essere omologhi delle proteine appartenenti alla famiglia PR, legata alla patogenesi vegetale e vengono ricondotti a tre grandi categorie: quella delle Chitinasi, delle proteine Taumatina - Simili (TLP) e delle Osmotine (Robinson e Davies, 2000). Tali peptidi derivano molto probabilmente da uno o pochi precursori comuni sintetizzati durante la formazione dei grappoli. La proteolisi che subiscono durante le ultime fasi di maturazione dell'uva è limitata e questo fenomeno può spiegare anche la loro intrinseca resistenza all'ambiente acido del vino e al processo di vinificazione, che porta al ritrovamento di proteine nel prodotto pronto alla commercializzazione, sebbene in quantità esigue, che si aggirano in media intorno ai 10 mg/l fino ad un massimo di 230 mg/l per i vini bianchi.

Il primo studio riguardante la descrizione dell'assetto proteico dei vini, è stato pubblicato nel 1959 (Koch J. e Sajak E., 1959).

Negli anni successivi, la scoperta di tecniche analitiche moderne ha contribuito a delucidare diversi caratteri strutturali delle proteine del vino e sono stati messi a punto differenti metodi per la loro purificazione, identificazione e quantificazione.

Tra di essi vengono inclusi: tecniche cromatografiche di scambio ionico (FPLC), (Dorrestein et al., 1995; Waters et al., 1993), Cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC) (Santoro 1995; Tyson et al., 1981), Cromatografia ad esclusione di massa e Cromatografia di affinità (Pellerin e Waters et al., 1993), Elettroforesi 2D (Lamikanra et al., 1998), Elettroforesi capillare (Ledoux et al., 1992; Dizy et al., 1999), Focusing isoelettrico (Dawes et al., 1994; Pueyo et al., 1993) e infine Blotting proteico (Hsu et al., 1987) e metodi immunologici applicati per individuare la presenza di proteine aggiunte eventualmente al vino come agenti chiarificanti (Monteiro et al., 1999; Ferreira et al., 2000).

La maggioranza degli studi sulla composizione e caratterizzazione proteica nei vini a partire dal 2004 è stata svolta sui vini bianchi, tuttavia, l'esempio che viene preso in considerazione nel paragrafo successivo è stato svolto su vini rossi della varietà Portugieser, ed è stato portato avanti dall'equipe di Wigand nel 2009.

2.1.1) Analisi della composizione proteica del vino rosso Portugieser

Il set di vini rossi Portugieser selezionato proveniva da otto varietà d'uva diverse e le proteine sono state identificate attraverso l'utilizzo della tecnica di Elettroforesi SDS - PAGE, accoppiata allo spettrometro di massa ESI - Q - TOF. In questo contesto sono state trovate strette somiglianze tra i campioni, sebbene ci fossero delle differenze nella quantità e nella composizione proteica dei prodotti finiti.

Tutte le bande proteiche ottenute presentavano variazioni nel range da 25 a 30 kDa e da 60 a 70 kDa. Tuttavia, è stato evidenziato che alcuni campioni contenevano un'intensa banda di dimensioni inferiori, intorno ai 12 kDa, che è stata successivamente classificata come appartenente ad una Proteina Carrier di Lipidi (Transfer Lipid Protein - TLP). In totale sono stati individuati 121 peptidi provenienti sia dall'uva che rilasciati dai lieviti durante la vinificazione. Ora andremo ad analizzare in dettaglio le tipologie di proteine evidenziate durante questo esperimento (Wigand et al., 2009).

2.1.1.1) Proteine dell'uva

Già durante la fase dell'invasatura e maturazione dei grappoli, si nota un significativo incremento della sintesi proteica e questo porta all'aumento del contenuto totale di proteine nell'uva. Tra le proteine presenti nei frutti, sono state riconosciute:

- **Proteine Carrier di Lipidi (Lipid Transfer Proteins - LTPs)**

Le Proteine Carrier di Lipidi si trovano nella buccia e nei semi dell'uva e la loro presenza nel vino in bottiglia è dovuta alla durata della macerazione durante il processo di vinificazione. Le LTP fanno parte del sistema di difesa della pianta, quindi la loro azione dipende anche dalle condizioni climatiche in vigneto.

La Proteina Carrier di Lipidi ritrovata nel vino rosso Portugieser è un'Isoforma 4 della famiglia LTP da *Vitis vinifera* e questo è stato il primo studio che ha dimostrato la sua presenza nel vino rosso. È stata riconosciuta essere un potenziale allergene dell'uva che non viene idrolizzato durante la vinificazione, quindi può essere ritrovato nel prodotto finito. In questo specifico caso, è stato ipotizzato che la tipologia di proteine LTP non fosse sempre presente in tutti i campioni analizzati o comunque non in quantità sufficienti per essere rilevate dal colorante elettroforetico Comassie Brilliant Blue.

- **Taumatina Like Proteins (TLP)**

Nel vino rosso Portugieser è stata anche ritrovata una coppia di proteine Taumatina - Simili da *Vitis vinifera*, con bande molto intense sui 25 kDa e

identificata attraverso il confronto con un database sulle sequenze conosciute delle proteine del vino. Le TLP sono raggruppate nella famiglia delle proteine PR, anch'esse legate alla patogenesi vegetale, poiché hanno proprietà antifungine dovute alla loro abilità nel permeabilizzare le membrane cellulari dei funghi (Tattersall et al., 1997). Sono anch'esse allergeni dell'uva.

Inoltre, insieme alle Chitinasi, sono alcune delle proteine più abbondanti nei succhi estratti da uve mature, regolate da un unico gene di *Vitis vinifera*, che viene espresso in momenti specifici della formazione e maturazione dei grappoli, in concomitanza con l'accumulo di zuccheri e l'ammorbidimento dei frutti. Oltre che nel Portugieser, le proteine Taumatina - Simili sono state identificate tramite elettroforesi in altri vini rossi, tra cui il vino Chianti italiano e il Cabernet Sauvignon sebbene in piccole quantità, mentre nei vini Bordeaux, Pinot Nero e Dornfelder le bande TLP erano più intense (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

- **Chitinasi**

E' stato riportato che le Chitinasi rappresentano il 50% delle proteine solubili presenti nei grappoli d'uva (Waters et al., 1998). Anche questo gruppo di proteine è coinvolto nel meccanismo di difesa della pianta contro gli attacchi fungini. Il loro livello nelle piante sane è piuttosto basso, mentre sono indotte dalla presenza di ferite e da attacchi microbici. Uve cresciute e maturate nello stesso vigneto, ma raccolte in annate consecutive, presentano lo stesso set di proteine della famiglia PR come componenti proteici maggioritari.

Esistono diverse Isoforme delle Chitinasi, con una massa molecolare media di 32 kDa, dovute all'espressione di geni costitutivi o tessuto - specifici, indotti

dallo stress nei grappoli d'uva, nelle foglie di vite, nelle radici e negli steli. La loro attività enzimatica incrementa con la maturazione dei frutti e continua ad aumentare durante la fase di accumulo degli zuccheri nei grappoli.

Nel vino rosso Portugieser sono state identificate Chitinasi di classe IV, appartenenti alla famiglia proteica PR₃.

Insieme alle Chitinasi, sono state rilevate anche delle β - 1- 3 Glucanasi che hanno anch'esse proprietà antifungine, dovute alla loro abilità catalitica di idrolizzare la chitina e i β - glucani, abbondanti componenti strutturali delle membrane cellulari delle ife fungine.

- **Invertasi vacuolare**

L'Invertasi è un enzima vacuolare localizzato nella polpa dell'uva, ed è responsabile dell'accumulo degli esosi glucosio e fruttosio durante la maturazione dei grappoli. Le bande proteiche di 37,47,71 e 77 kDa rilevate nel vino rosso oggetto di studio, possono essere attribuite all'Invertasi Vacuolare 1 da *Vitis vinifera*. A questa tipologia di proteina è stata quindi attribuita una massa molecolare teorica di 71,5 kDa (Wigand et al., 2009).

2.1.1.2) Proteine del lievito

I lieviti possono influenzare la composizione proteica dei vini principalmente in due modi.

Il primo riguarda il possibile trasferimento di proteine al vino durante il processo di autolisi delle cellule, il secondo è legato alla presenza di enzimi

esocellulari, come le proteasi, che possono contribuire all'idrolisi delle proteine del mosto (Feuillat et al., 1980).

Al termine di questi processi, i lieviti apportano al vino proteine insolubili e termo - instabili e a conferma di ciò, anche nel vino rosso Portugieser sono state ritrovate numerose proteine originate dalla loro presenza. Tra queste sono state riconosciute: il precursore 11 delle proteine di parete legate covalentemente (P47001), un altro precursore di proteine di parete CWP1 (P28319), il precursore proteico TOS1 (P38288), il precursore ECM 33 della matrice proteica extracellulare (P38248), un probabile precursore di Glicosidasi CRH1 (P53301) ed un precursore di Chitinasi (P29029). Queste proteine sono tutte state identificate come costituenti della membrana cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*. Tuttavia, la loro massa molecolare differisce da quella delle sequenze riportate in database e tale fenomeno può essere legato al diverso grado di glicosilazione che le caratterizza.

2.1.1.3) Glicoproteine

Alcuni studi (Yokotsuka et al., 1991) hanno riportato che nel vino sono presenti alcune proteine glicosilate, tra cui Glicoproteine debolmente acide e proteine legate agli arabinogalattani (AGP), che sono state purificate e caratterizzate nel vino rosso. Rappresentano dal 4,3 al 5,2% dei colloidi totali precipitati in condizioni alcoliche e il cui contenuto proteico è inferiore al 10%. Queste AGP derivano probabilmente da pectine native dell'uva, per l'azione di enzimi endogeni pectolitici.

Nel vino rosso Portugieser (Wigand et al., 2009), con la colorazione tramite base di Schiff, si è supposto che le proteine sotto i 100 kDa fossero

Glicoproteine derivate dai lieviti durante la vinificazione, poiché non sono state identificate tra le proteine dell'uva. Infatti, le proteine della parete cellulare e le Chitinasi presentano dei legami O – glicosidici estesi, inoltre si è rilevata potenziale glicosilazione nella proteina TOS1, nella glicosidasi e nella proteina ECM 33.

Esse sono state localizzate nelle bande con un range di massa molecolare tra i 20 e i 70 kDa.

Per concludere, sono state identificate anche altre classi minori di proteine sintetizzate durante la maturazione dell'uva, riconducibili a: quattro Proteine Ricche di Prolina (PRP), una proteina il cui dominio N - terminale è simile ad alcune Pectinmetilesterasi (PME), due proteine ricche in glutammato e alcune proteine indotte dalla risposta a fattori di stress esterni, come una Metallothioneina (Met), un fattore di trascrizione e un enzima del Citocromo P450 (Davies e Robinson, 2000).

2.1.2) Saggio colorimetrico per la quantificazione delle proteine totali applicato a vini rossi

La misurazione della quantità di proteine nel vino non è un'analisi standard, quindi ci sono pochi studi che indagano sul contenuto proteico reale dei vini. Tuttavia, in questo paragrafo verranno presentati alcuni metodi di precipitazione applicati a vini rossi per la quantificazione della componente proteica di origine, insieme ai requisiti che un saggio proteico e uno standard di calibrazione devono avere per rappresentare in maniera esaustiva la composizione proteica di un vino.

2.1.2.1) Procedure di precipitazione proteica

Esistono diverse procedure di precipitazione proteica da applicare a campioni di vino come pretrattamento, che hanno l'obiettivo di permettere una determinazione diretta della concentrazione totale di proteine in soluzione. Esse possono essere ricondotte a:

- **Precipitazione con KDS**

In questo tipo di precipitazione, la reazione tra Cloruro di Potassio (KCl) e Sodio Dodecil Solfato al 10% (SDS) porta alla formazione del composto KDS, il quale, comportandosi come agente stabilizzante grazie alla sua natura ionica, rinforza le interazioni intermolecolari tra le proteine causandone la precipitazione. Questo fenomeno permette di formare il pellet dopo una fase di centrifugazione, che viene recuperato per essere sottoposto alle analisi successive (Vincenzi et al., 2005).

- **Precipitazione con acetone**

In questo caso, le proteine vengono precipitate aggiungendo due volumi di acetone ad un volume di vino. E' stato verificato che questo rapporto consente all'acetone di legare in minima parte i composti contaminanti presenti in soluzione, che potrebbero reagire con lo standard del saggio scelto per la quantificazione e falsare il risultato finale dell'analisi. L'azione dell'acetone consiste nell'abbassare la costante dielettrica del mezzo in cui sono immerse le proteine, diminuendone la forza repulsiva ed aumentando l'interazione tra di

esse, per provocarne la precipitazione e formare il pellet dopo centrifugazione (Vincenzi et al., 2005).

- **Precipitazione con TCA/acetone**

Un terzo metodo di precipitazione è quello che prevede l'utilizzo di una soluzione di TCA/acetone, composta da 2 volumi di acetone e 1 volume di acido Tricloroacetico (TCA) al 10%, aggiunta ad 1 volume di vino. L'ottenimento del pellet avviene sempre tramite centrifugazione e il meccanismo di precipitazione proteica può essere comparato a quello descritto per l'acetone puro. (Vincenzi et al., 2005).

2.1.2.2) Scelta del Saggio Proteico e della Proteina Standard

Importanti determinanti nella scelta di un metodo di quantificazione proteica, sono le caratteristiche delle sostanze coloranti utilizzate nel saggio e quelle della proteina standard scelta come riferimento per la calibrazione. A questi fattori è infatti attribuibile la differenza tra i dati ottenuti durante l'analisi.

In questo paragrafo vengono riportate a titolo d'esempio le considerazioni avanzate da Smith e i suoi collaboratori nel 2011, nel cui studio hanno confrontato il Saggio dell'acido Bicinconinico (BCA) e quello di Bradford, applicati per quantificare le proteine di 48 vini rossi della varietà Pinot Nero. Il primo saggio è basato sull'assorbanza dovuta alla riduzione del rame e sua successiva chelazione da parte dell'acido Bicinconinico (BCA), mentre il secondo sul cambiamento dell'assorbanza del colorante Comassie Brilliant Blue, posti a confronto con concentrazioni crescenti delle proteine standard

Sieroalbumina Bovina (BSA) e Invertasi da lievito. Se le proteine del vino si combinassero perfettamente con lo standard di calibrazione, la quantità misurata verrebbe determinata da una proporzionale variazione della colorazione durante il saggio, corrispondente al valore 1, che indica la massima correlazione raggiungibile in un saggio colorimetrico (Smith et al., 2011).

Molto spesso però, questo fenomeno non avviene nella realtà, quindi viene scelto lo standard di calibrazione che maggiormente si avvicina a tale valore, rispecchiando con più fedeltà il comportamento delle proteine del vino. Lo standard che più chiaramente ha mostrato tale comportamento è stato l'Invertasi da lievito, sia durante il saggio di Bradford, sia durante quello con il BCA. Tuttavia, è stato verificato che l'Invertasi sottostima in maniera consistente la presenza delle glicoproteine, perciò anche i Mannolisati da lievito sono stati considerati come standard validi, poiché permettono di ottenere una panoramica completa dell'insieme delle sostanze proteiche che caratterizzano il vino, essendo maggiormente rappresentativi della sua componente proteica glicosilata (Smith et al., 2011).

2.1.2.3) Quantificazione proteica nei vini rossi

In bibliografia vengono riportati diversi risultati di quantificazione proteica ottenuti da differenti varietà di vini rossi.

Un primo esempio riguarda un vino Merlot dove la quantità di proteine totali variava da 77 a 48 mg/l a cui ne possono seguire altri, come quello di un Moscato Bailey che ne conteneva da 33 a 87 mg/l con una media di 57 mg/l (Brillouet et al., 1991).

Un altro caso interessante coinvolge invece un vino Carignan Nero, dove il ricercatore Vidal e collaboratori nel 2004 hanno rilevato una concentrazione proteica media di 63 mg/l. In questo specifico caso, è stato presunto che tutte le proteine identificate fossero glicosilate, poiché è stata verificata la presenza dal 2 all'11% di carboidrati associati.

Le Mannoproteine derivanti dalla parete cellulare dei lieviti, rappresentavano circa 1/3 sul totale dei polisaccaridi presenti, le cui concentrazioni in soluzione variavano da 300 a 1000 mg/l e sono state quantificate in mannano - equivalenti.

Un ulteriore esempio è quello di un Cabernet Sauvignon che ha mostrato contenuti proteici variabili da 45 a 86 mg/l (Brillouet et al., 1991).

Per concludere, in confronto alle concentrazioni sopra indicate, nel vino Pinot Nero analizzato da Smith nel 2011 sono state quantificate le proteine in campioni tal quali e dializzati, ottenendo dei pellet dove i pesi molecolari delle sostanze azotate individuate si dividevano in due frazioni, sotto e sopra i 3500 Da.

Infine, sono stati selezionati dal set completo di vini tre campioni rappresentativi del range totale dei contenuti proteici rilevati dopo la quantificazione, con concentrazioni minime intorno ai 13 - 14 mg/l, fino ad arrivare a contenuti medi di 50 mg/l e ad un massimo di 102 mg/l, espressi in equivalenti di Invertasi.

Le differenze riscontrate tra le concentrazioni proteiche di diverse varietà, confermano quindi la notevole influenza che le caratteristiche genetiche delle cultivar di vite, la loro localizzazione geografica, le condizioni di coltivazione e quelle di vinificazione hanno sulla componente proteica finale di un vino.

2.2) Composizione in polisaccaridi del vino

I polisaccaridi che si trovano nel vino possono derivare sia dalle membrane cellulari dei microorganismi, sia dall'uva. Diversi studi, a partire da quello eseguito da Brillouet nel 1990, hanno identificato molti polisaccaridi nel vino verificando che quelli provenienti dalle pareti cellulari dei grappoli d'uva contengono prevalentemente arabinogalattani e ramnogalatturonani di secondo ordine (RG-II), mentre quelli derivanti dalle cellule di lievito sono per la maggior parte mannoproteine.

Per comprendere meglio il modo in cui i polisaccaridi possono interagire con le altre molecole nel vino, la ricercatrice Vernhet e la sua equipe dal 1996 ha approfondito le loro proprietà chimiche ed elettrostatiche, evidenziando che le principali differenze tra di essi sono relazionate alla densità di carica elettrica negativa e alla diversità di composizione come il grado di metilazione o acetilazione, alla distribuzione dei gruppi uronosilici e alla forza ionica.

Altri studiosi invece, hanno concentrato l'attenzione su come i polisaccaridi possono modificare l'equilibrio colloidale del vino, attraverso l'auto - aggregazione dei tannini in soluzione e la complessazione dell'acido tartarico provocando la precipitazione dei tartarati (Gerbaud et al., 1996; Riou et al., 2002).

Nel paragrafo successivo, verrà riportato l'esempio del lavoro di caratterizzazione della frazione polisaccaridica di un vino rosso Carignan Nero, svolto da Vidal nel 2003, con particolare riguardo all'effetto che essa ha sulle sue proprietà sensoriali. Tale studio ha portato alla caratterizzazione di due principali frazioni di polisaccaridi, acida e neutra, risultanti in una miscela di Arabinogalattani (AGP) e Mannoproteine (MP), individuando anche una terza

frazione ricca di Ramnogalatturonani di tipo I (RG - I) e II (RG - II), classificati sulla base della loro composizione in residui glicosidici.

2.2.1) Caratterizzazione Arabinogalattani (AGP)

La composizione dei residui glicosidici degli arabinogalattani presenti nei campioni, ha permesso di individuare sei frazioni distinte nominate AGP1; AGP2; AGP3; AGP4; AGP0b e AGP0c.

Durante l'analisi si è visto che l'acido glucuronico era l'acido uronico prevalente di tutti gli Arabinogalattani (AGP), mentre l'acido galatturonico era presente solo nelle frazioni AGP3 e AGP4, per le quali vi erano inoltre elevate concentrazioni di ramnosio. Le frazioni AGP0b e AGP0c invece, erano strettamente correlate in termini di composizione, variando essenzialmente per il loro contenuto in mannosio e glucosio ed evidenziando un elevato rapporto galattosio/arabinosio.

2.2.2) Caratterizzazione Mannoproteine (MP)

Durante questa seconda fase di caratterizzazione, sono state ottenute sei frazioni proteiche di composizione molto simile, accomunate dalla presenza di residui glicosidici ricchi in mannosio, che superava il 98% del peso totale dei polimeri. Nelle due frazioni nelle quali il contenuto di mannosio era più basso, il galattosio e l'arabinosio erano i componenti minoritari più presenti, suggerendo che una piccola percentuale di arabinogalattani fosse presente come contaminante. E' stata inoltre evidenziata la presenza di diversi agliconi,

così come di fosforo, che influenza la carica elettrica netta delle Mannoproteine.

Altri aspetti che potrebbero spiegare le differenze rilevate tra questi polimeri, sono il range molto ampio di pesi molecolari che va da 50 a 530 kDa, le loro sequenze amminoacidiche e le caratteristiche della struttura secondaria.

E' stato ipotizzato che alcune Mannoproteine possono agire come fattori protettivi dalla torbidità del vino (Waters et al., 1994), mentre altre potrebbero avere un effetto inibitorio sulla cristallizzazione del potassio tartarato, che ha luogo nella fase iniziale della fermentazione e che può portare a successivi fenomeni di instabilità nel vino.

2.2.3) Caratterizzazione Ramnogalatturonani di tipo I (RGI)

Sono state inoltre individuate due frazioni di Ramnogalatturonani di tipo I (RG I) e la loro composizione era dominata dalla presenza di acido galatturonico e ramnosio. Erano anche presenti tutti gli zuccheri tipici delle catene di pectina.

In tale contesto è stato verificato infatti che il ramnosio era presente prevalentemente come legame 2 - ramnosilico e l'acido galatturonico come legame 4 - galatturonosilico, in un rapporto vicino ad 1. Inoltre, la presenza di legami 2 - 3 e 2 - 4 di ramnosio con metilesteri di arabinosio, galattosio, fucosio, xilosio e glucosio, indicava che le catene laterali erano attaccate ai ramnogalatturonani attraverso le frazioni di ramnosio.

In aggiunta, la presenza degli Arabinogalattani di tipo I, è stata confermata dall'esistenza di legami terminali 3 - 4 di galattosio e 4 - 5 di arabinosio, ed è stato dimostrato che i Ramnogalatturonani di tipo I contengono arabinogalattani di tipo I e II, i quali si presentano come corte catene

ramificate. Nella composizione dei legami glicosidici, spiccava anche la presenza di xiloglucani provenienti dalla membrana cellulare vegetale, composti da legami β - 1- 4, che venivano sostituiti all'altezza del carbonio C₆ da legami α -1 -4. I maggiori metilesteri che li componevano erano contraddistinti dalla presenza di fucosio, galattosio e xilosio terminali.

Infine, si è rilevata la presenza di un legame di tipo 4 e 6 con il glucosio, individuato in entrambe le frazioni RG - I in proporzioni simili. La composizione eterogenea della struttura dei Ramnagalatturonani di tipo I, deriva dalla degradazione enzimatica delle catene pectiche che avviene durante il processo di vinificazione e può spiegare il meccanismo di formazione delle sostanze aromatiche che caratterizzano il bouquet finale del vino rosso.

2.2.4) Caratterizzazione Ramnagalatturonani di tipo II (RG II)

Le frazioni di ramnagalatturonani di tipo II sono state identificate sulla base degli zuccheri che li compongono, ossia apiosio, fucosio, xilosio, acido acerico, acido docosaesaenoico (DHA) e acido keto-deossioctolosonato (KDO). Le frazioni RG - II 1 e RG- II 2 erano prevalentemente monomeriche, mentre RG - II 3 era dimerica e RG - II 4 si presentava come una miscela di entrambe le forme. La presenza di forme monomeriche era generalmente scarsa, anche se una piccola concentrazione ne è stata rilevata nella polpa dell'uva, mentre la forma RG II dimerica si trovava in particolare nelle membrane cellulari e nel succo d'uva.

Nel complesso i polisaccaridi ottenuti in questo studio erano costituiti dal 42% di Arabinogalattani (AGP), il 35% di Mannoproteine (MP), il 4% di

Ramnogalatturonani di tipo I e il 19% di Ramnogalatturonani di tipo II (Vidal et al., 2003).

Il ritrovamento di questi componenti, ha permesso di avanzare delle ipotesi sull'effetto che essi possono avere a livello sensoriale sul prodotto finito, concludendo che la presenza dei polisaccaridi nel vino rosso ha un impatto diretto sulle sue caratteristiche di palatabilità, ed in particolare sulla pastosità, rendendo meno spiccata e più gradevole la sensazione di astringenza al momento del consumo.

2.2.5) Quantificazione di polisaccaridi e oligosaccaridi nel vino rosso

Dopo aver evidenziato le caratteristiche strutturali delle diverse classi di polisaccaridi, in questo paragrafo verrà riportato un lavoro di quantificazione della componente polisaccaridica in vini rossi della varietà spagnola Tempranillo, svolto da Quijada - Morin e collaboratori nel 2014. Nello studio sono stati considerati campioni appartenenti a tre tipologie di vini contrassegnati dalla Denominazione d'Origine: Toro, Rioja e Ribera de Duero. Innanzitutto, è stato determinato il contenuto di polisaccaridi totali in tutti i campioni considerati, espresso come concentrazione in mg/l. I polisaccaridi erano costituiti principalmente da Mannoproteine (MP), Polisaccaridi ricchi in Arabinosio e Galattosio (PRAG), Ramnogalatturonani di tipo II (RG - II) e Glucani. Il range dei polisaccaridi totali presenti in soluzione variava da 180 a 525 mg/l ed in particolare i campioni dei vini più invecchiati presentavano un contenuto polisaccaridico minore rispetto ai vini "giovani", suggerendo che la concentrazione dei polisaccaridi in soluzione tende a diminuire durante lo stoccaggio del vino, soprattutto dopo la fine della fermentazione malolattica.

I Glucani in tutti i campioni analizzati rappresentavano la classe minoritaria di composti, con una concentrazione media che variava da 6,6 a 21,3 mg/l, mentre i Ramnagalatturonani di tipo II variavano tra i 63 e i 142 mg/l con il valore massimo raggiunto dai campioni di denominazione Toro.

I valori degli stessi componenti erano invece inferiori in campioni di Ribera de Duero, tra 63,2 e 115,1 mg/l e in quelli di Rioja, che andavano da 92 a 115,2 mg/l.

I Polisaccaridi Ricchi in Arabinosio e Galattosio (PRAG) erano presenti soprattutto nei vini "giovani", con un picco massimo tra i 30 e i 60 giorni dopo la fine della fermentazione alcolica, variando da 22,7 a 278,9 mg/l.

La presenza di questa tipologia di composti è stata verificata essere legata all'annata di vendemmia e all'area di produzione.

Valori di PRAG particolarmente elevati sono stati evidenziati soprattutto nei campioni appartenenti alla Denominazione d'Origine Toro, suggerendo che potessero essere presenti in quantitativi considerevoli all'inizio della fase di invecchiamento, oppure che venissero degradati molto lentamente durante la maturazione in botte o in bottiglia.

Per quanto riguarda il rapporto arabinosio/galattosio, si attestava su valori tra 1,09 e 1,28 ed era molto più elevato nei vini "giovani" rispetto a quelli sottoposti ad invecchiamento, dove invece risultava tra 0,35 e 0,67, ed è stato supposto che queste differenze fossero correlate alle diverse tecniche di vinificazione applicate (Quijada - Morin et al., 2014).

Per quanto concerne la concentrazione delle Mannoproteine in soluzione, in media variava tra 75,2 a 186,2 mg/l, con valori massimi rilevati nei campioni Ribera de Duero.

Non sono state evidenziate differenze imputabili all'annata o all'area di produzione, tuttavia un'influenza maggiore sul loro livello può essere relazionata all'uso di enzimi o all'applicazione di trattamenti con il calore, al processo di vinificazione e al ceppo di lievito utilizzato nella fermentazione.

La presenza delle Mannoproteine incrementava in particolare alla fine della fermentazione alcolica, per poi rimanere costante nei successivi due anni di invecchiamento in bottiglia.

Infine, tutti i campioni analizzati presentavano delle basse percentuali di Glucani in soluzione.

Per quanto riguardava invece la componente oligosaccaridica totale, essa variava tra 75 e 325 mg/l ed era più bassa rispetto ai vini rossi Merlot e Carignan. Tuttavia, tali quantitativi erano simili a quelli raggiunti dai vini Grignolino e Chardonnay, con cui questi valori sono stati confrontati. Le maggiori differenze tra i residui glicosidici della frazione oligosaccaridica, si notavano per le concentrazioni di glucosio, acido galatturonico e arabinosio, che erano comunque in accordo con quelle rilevate nel Merlot. In particolare l'acido galatturonico, il glucosio e il mannosio presentavano il contenuto più alto in tutti i campioni studiati. Rispettivamente, il glucosio variava da 16 a 73 mg/l, il mannosio tra 15 e 40 mg/l e l'acido galatturonico da 9 a 86 mg/l. Infine, l'acido glucurronico e il fucosio erano i residui meno abbondanti della frazione oligosaccaridica di tutti i vini analizzati.

In questo contesto, la maggioranza dei residui glicosidici originava dalla parete cellulare dei lieviti, mentre il resto derivava dai polisaccaridi della parete cellulare dell'uva.

In conclusione, le differenze tra i livelli di polisaccaridi e oligosaccaridi riscontrate nei campioni hanno confermato l'influenza che fattori come l'anno

di vendemmia, la durata della fase d'invecchiamento, l'area di produzione e la modalità di vinificazione possono avere sul profilo polisaccaridico di un vino rosso(Quijada - Morin et al., 2014).

2.3) Composizione polifenolica del vino

Il primi ricercatori a dare una definizione chimica dei tannini sono stati Swain e Bate - Smith nel 1962, indicandoli come composti fenolici idrosolubili aventi un peso molecolare medio tra i 500 e i 3000 Da con la capacità di precipitare alcaloidi, gelatine e altre proteine. Nel 1981 invece, lo studioso Haslam ha illustrato la possibile conformazione strutturale dei tannini, affermando che essi fossero costituiti da un considerevole numero di gruppi fenolici associati in un'orientazione di-idrossilica o tri-idrossilica, che venissero accumulati all'interno di un anello fenolico di medie dimensioni.

Nel caso specifico del vino rosso, quando è molto astringente lo si definisce comunemente "tannico", difatti una serie di composti fenolici derivano dall'uva e possono essere suddivisi in tre grandi categorie: i flavan - 3 - oli, i composti fenolici non flavonoidi e i polimeri pigmentati.

Nel paragrafo successivo verranno descritte le loro caratteristiche chimiche, per comprendere meglio l'influenza che essi possono avere sulla percezione dell'astringenza al momento dell'assaggio del vino.

2.3.1) Flavan - 3 - oli monomerici e polimerici

I composti flavan - 3 - oli monomerici e polimerici, comprendono la maggioranza dei costituenti fenolici del vino rosso (Singleton e Noble, 1976). Essi vengono estratti dalla buccia dell'uva e dallo strato esterno dei semi durante la fermentazione. I flavan - 3 - oli sono composti da 15 atomi di carbonio ($C_6 - C_3 - C_6$), dove la catena C_3 è satura.

Nell'uva vengono riconosciuti due principali gruppi di flavan - 3 - oli monomerici. Il primo gruppo è rappresentato dalla catechina (+) e il suo diastereoisomero epicatechina (-) e sono definite proantocianidine, consistenti in un o - difenolo idrossilato in 3° e 4° posizione, racchiuso in una struttura ad anello. Il secondo gruppo, è costituito invece da epigallocatechine (-) e gallocatechine (-), che sono prodelfinidine triossilate in 3°, 4° e 5° posizione.

Inoltre, nell'uva è stata riportata frequentemente la presenza di un'altra forma monomerica derivata da una singola esterificazione, ossia un'epicatechina (-) - 3 - o - gallata (Prieur et al., 1994). Mentre le forme polimeriche dei flavan - 3 - oli, vengono generate dall'addizione sequenziale di carbocationi derivati da composti intermedi tra flavan - 3 - 4 - dioli e monomeri flavan - 3 - oli, che agiscono come unità terminali.

Un'altra possibile via è quella della polimerizzazione indotta dall'acetaldeide e i composti che si generano sono definiti proantocianidine o tannini condensati.

E' stato inoltre verificato che le forme polimeriche dei flavan - 3 - oli sono le maggiori responsabili della sensazione di astringenza correlata al vino rosso, mentre le forme monomeriche contribuiscono significativamente alla sua amarezza.

Le proantocianidine dimeriche e trimeriche dell'uva sono collegate tra loro attraverso legami benzilici C₄ dell'anello flavanico eterociclico formato da carboni C₆ o C₈, mentre le proantocianidine dei semi hanno una struttura stereochimica dominante *cis*, con le epicatechine che servono come estensioni della catena e le catechine che agiscono come unità terminali dominanti.

I flavanoli dei semi della varietà Merlot, se comparati a 33 flavanoli della buccia d'uva, sono meno polimerizzati e sono caratterizzati dall'abbondante presenza di derivati galloilati, che aumentano con l'incrementare del grado di polimerizzazione.

Inoltre, i monomeri che includono epicatechine gallate (-) dominano il profilo fenolico dei semi di 19 cultivar di vite, rappresentando più del 50% del contenuto totale dei flavanoli presenti, mentre nella buccia d'uva contribuiscono solo per il 2%.

Sia in cultivar a buccia bianca che nera, il ricercatore Ricardo e i suoi collaboratori nel 1991 hanno verificato che la proantocianidina B1 è la maggior componente fenolica nelle bucce d'uva, mentre la forma B3 si ritrova nei semi immaturi, anche se poi la sua concentrazione per unità di massa diminuisce con la maturazione, venendo sostituita dalla forma B2 che aumenta progressivamente.

In generale quindi le proantocianidine prevalenti nei semi sono la B1 e la B2.

In conclusione, le differenze di composizione che intervengono lungo il processo di formazione e maturazione dei frutti, possono essere spiegate attraverso le diversità legate alle caratteristiche intrinseche delle cultivar studiate e al grado di maturazione dei semi.

2.3.2) Composti fenolici non - flavonoidi e flavanoli

I maggiori costituenti fenolici dei fluidi vacuolari dei grappoli d'uva sono gli idrossicinnamati, tra i quali i maggiori sono esteri dell'acido tartarico, caftarico e cutarico.

Dallo studio di Singleton e collaboratori del 1986, si è evidenziato che l'acido caftarico si trova in cultivar a buccia gialla in media intorno ai 124 mg/l, mentre l'acido cutarico si attesta verso i 17 mg/l. Invece, in cultivar a buccia rossa, la concentrazione di acido caftarico è circa di 167 mg/l e quella dell'acido cutarico di 22 mg/l.

Dopo la vinificazione la quantità di acido caftarico e cutarico diminuisce in soluzione rispettivamente di $1/5$ e $1/2$ se confrontata con la concentrazione iniziale, perché il resto dei composti viene idrolizzato nelle forme libere di acido idrossicinnamico, caffeico e cumarico.

Nel 1988, Vèrette ha riportato il ritrovamento in vini rossi di quantità di acido caffeico intorno ai 125 mg/l e di acido cumarico di 30 mg/l, mentre gli idrossicinnamati costituivano circa il 15% dei fenoli totali. Quindi è stato ipotizzato che la presenza significativa di questo insieme di composti in soluzione possa avere un importante impatto sull'amarezza e l'astringenza del vino.

2.3.3) Polimeri pigmentati

I primi a suggerire che l'astringenza dei vini rossi fosse legata alla formazione di complessi tra antocianine e tannini sono stati i ricercatori Singleton e Truodale

nel 1992, i quali hanno poi approfondito la struttura chimica di due principali tipi di polimeri pigmentati del vino rosso.

Il primo, che è stato studiato attraverso un modello, si presentava di colore rosso - blu ed era un prodotto di condensazione tra un malvidina - 3 -glucoside e varie proantocianidine attraverso un ponte acetile, che includeva monomeri di catechine e epicatechine, le proantocianidine dimeriche B2 e B3 e le proantocianidine B2 gallate. Questa reazione è stimolata dalla presenza di acetaldeide, da un pH acido e da diverse concentrazioni di anidride solforosa (SO_2) in soluzione, quindi prosegue rapidamente nell'ambiente vino, fino a portare alla precipitazione i composti condensati in un periodo di poche settimane.

Sempre all'interno della stessa tipologia di polimeri, è stato identificato un composto stabile di colore rosso - arancio, resistente all' SO_2 e isolato da una soluzione modello.

Viene formato da una reazione tra un malvidina - 3 - glucoside con una proantocianidina B2, in presenza di un residuo vinilico in posizione C_8 .

Una seconda classe di composti riguarda dei pigmenti di colore giallo, con assorbanza massima tra 425 nm e 455 nm. Essi sono definiti pigmenti flavylum - flavani e sono stati ipotizzati derivare dal legame tra il carbonio C_4 , il sale di flavylum e il carbonio C_8 della catechina, per portare alla formazione di un flavene condensato incolore, seguita dall'ossidazione in un sale xanthylum di colore giallo.

2.3.4) Saggio di Quantificazione dei polifenoli nel vino rosso

La quantificazione e la caratterizzazione dei polifenoli nell'uva e nel vino rosso si sono sempre rilevati degli aspetti di difficile gestione nell'ambito delle analisi chimiche, in quanto i tannini si presentano come molecole anfifiliche di elevata reattività che mostrano un ampio range di strutture chimiche diverse ed inoltre vengono spesso ritrovati ad interagire nelle matrici originali con altre molecole fenoliche contenenti gruppi funzionali simili.

In questo paragrafo verranno presentati due saggi per la quantificazione dei tannini in uve e vini rossi, confrontati dai ricercatori Mercurio e Smith nel 2008. Sono conosciuti come Saggio di Precipitazione con Metilcellulosa (MPC) e Saggio di Adams - Harbertson (A - H). Entrambi sono basati sul fenomeno della precipitazione dei tannini e dimostrano l'abilità dei polifenoli di complessare e precipitare insieme ai polisaccaridi e alle proteine presenti in soluzione. Sono stati sviluppati con l'obiettivo di ridurre i costi e i tempi di esecuzione e di elaborare ampi set di dati sulla concentrazione dei tannini presente nell'uva e nel vino rosso di diverse varietà.

- **Fattori che influiscono sulla scelta di un Saggio di Quantificazione dei polifenoli**

I principali obiettivi di questo studio sono stati di confrontare le differenze tra le quantità di tannini rilevate dal Saggio MCP e da quello di Adams - Harbertson (A - H) ed inoltre di valutarne la correlazione con l'astringenza percepita. Tali metodi infatti, potrebbero fornire informazioni sull'astringenza del vino rosso senza dover ricorrere a lunghe e costose analisi sensoriali. L'attuale ricerca si

propone di valutare le similitudini e le differenze tra i due saggi quantitativi per quanto riguarda la ripetibilità, l'efficienza e la praticità di esecuzione, infine viene determinata anche la corrispondenza tra le quantità di tannini rilevate con le due tecniche.

Il saggio di Precipitazione con Metilcellulosa (MCP) e di Adams - Harbertson (A - H), sono stati svolti in triplicato su sei campioni di vino rosso commerciale. Per il saggio MCP, le quantità di tannini rilevate sono state espresse in equivalente di epicatechina (mg/l) e andavano da 1450 a 2300 mg/l, mentre per il Saggio A - H il range variava tra 162 e 590 mg/l e le quantità di tannini erano espresse in equivalenti di catechina.

La ripetibilità dei due saggi era simile, con un coefficiente di varianza (CV) inferiore al 7%.

In esperimenti precedenti, Sarneckis e collaboratori (2006) avevano comparato il saggio MCP con un'analisi di Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (HPLC) in fase inversa e avevano riportato un coefficiente di correlazione sulla quantità di tannini rilevata pari a $r^2 = 0,62$, rappresentativo del 50% degli estratti omogenati dell'uva e $r^2 = 0,56$ per il vino rosso.

Comparando questi risultati con il saggio MCP e quello di A - H svolti da Mercurio e Smith, è stata ottenuta una regressione lineare tra i risultati ricavati da entrambe le tecniche, che mostrava elevata correlazione con le quantità di tannini individuate negli estratti omogenati dell'uva ($r^2 = 0,96$) e un buon coefficiente anche per il vino rosso ($r^2 = 0,80$).

E' stato evidenziato come la correlazione sia minore per il vino rispetto agli estratti dell'uva e ciò può essere spiegato attraverso le differenze di struttura chimica che esistono tra i tannini dell'uva e quelli presenti nel vino.

Già il ricercatore Kennedy (2006) e i suoi collaboratori avevano evidenziato in uno studio precedente la complessità della struttura molecolare dei tannini ritrovati nell'uva e in particolare nel vino rosso. Infatti, a causa delle modifiche che i tannini subiscono nell'ambiente acido e ossidativo creato dalla fermentazione del vino, le loro caratteristiche molecolari possono differire molto rispetto a quelle che mostrano i tannini dell'uva, poiché si presentano come miscele eterogenee di composti fenolici definiti polimeri pigmentati, che si contraddistinguono per l'incorporazione di antocianine nella propria struttura.

Inoltre, un'altra differenza tra i due Saggi viene individuata nel differente sistema di rilevazione dei tannini (Mercurio e Smith, 2008). L'MCP infatti tiene conto sia dell'assorbanza generata dai composti tannici originariamente presenti nell'uva, sia di quella dovuta alle antocianine incorporate nei tannini del vino, misurata alla lunghezza d'onda di 280 nm.

Il Saggio di Adams - Harbertson invece quantifica solamente i tannini presenti nel vino, senza rilevare le antocianine al loro interno. L'assorbanza finale in questo saggio viene rilevata ad una lunghezza d'onda di 510 nm.

Il coefficiente di pendenza della retta ottenuta dalla regressione lineare si attesta su un valore pari a 0,36 per il Saggio MCP, mentre un valore inferiore riguarda il Saggio A - H, dove la pendenza si attesta intorno a 0,32.

Questi risultati sono correlati con le quantità di tannini rilevate dal Saggio MCP che raggiungono circa 802 mg/l, mentre non vengono rilevati dal Saggio Adams - Harbertson.

Successivamente, nel confronto è stata analizzata l'influenza della fase di isolamento e rilevazione dei tannini sulle differenze di concentrazione di tannini riportate (Mercurio e Smith, 2008).

E' stato evidenziato che entrambi i saggi sono efficaci nel rimuovere le sostanze tanniche sia dall'uva che dal vino, anche se tale capacità è più evidente nel Saggio di precipitazione con Metilcellulosa rispetto al Saggio A - H che utilizza come agente precipitante la Sieroalbumina Bovina (BSA), poiché la prima lega tutte le forme tanniche, mentre nella seconda tecnica i piccoli pigmenti polimerici (SPP) rimangono in soluzione.

In entrambi i casi comunque, i componenti fenolici non vengono estratti individualmente, bensì come miscela di forme monomeriche.

Per comprendere l'origine delle diversità nella quantità di tannini rilevata, è stata presa in considerazione anche l'influenza che possono avere gli standard utilizzati per stabilire la curva di calibrazione.

Un tannino nella forma oligomerica può contenere fino a otto sub-unità con più di 500 strutture chimiche diverse, perciò uno standard sufficientemente rappresentativo di tale complessità non è disponibile a livello commerciale, rendendo necessario utilizzare delle molecole più semplici come i monomeri epicatechina e catechina per quantificare i tannini. Infatti, la catechina è utilizzata nel Saggio Adams -Harbertson, mentre l'epicatechina nel Saggio con Metilcellulosa e non hanno portato a differenze significative nella rilevazione della quantità totale di polifenoli in soluzione.

Si può concludere perciò che le differenze tra i risultati di quantificazione dei due Saggi non siano dovute allo step di isolamento o rilevazione dei tannini, né alla scelta degli standard di calibrazione e al loro rapporto con i tannini in soluzione, alla presenza di Metilcellulosa o di Sieroalbumina Bovina (BSA), ma piuttosto alla differente struttura chimica delle diverse classi di polifenoli presenti nel vino rosso (Mercurio e Smith, 2008).

- **Correlazione dei Saggi con l'astringenza percepita nel vino rosso**

Differenti esperimenti sono stati portati avanti nel tempo per valutare la correlazione tra quantità di tannini e astringenza percepita nel vino rosso, in particolare attraverso tecniche di cromatografia e Saggi di precipitazione proteica.

Alcuni esempi possono essere il lavoro svolto dal ricercatore Condelli (2006) e collaboratori che hanno costruito un modello predittivo con $r^2 = 0,95$ per la percezione dell'astringenza del vino rosso, attraverso la verifica della capacità dei campioni di sviluppare torbidità precipitando con le proteine salivari Mucine.

Inoltre, Kennedy (2006) e collaboratori hanno analizzato 40 vini rossi per valutarne l'astringenza e hanno comparato i risultati con diversi metodi di quantificazione dei tannini, incluso il saggio Adams - Harbertson che ha mostrato una buona correlazione con $r^2 = 0,82$.

Per valutare la correlazione tra astringenza e saggio MCP, nel lavoro svolto da Mercurio e Smith (2008), 10 vini rossi Shiraz e 10 Cabernet Sauvignon sono stati analizzati attraverso un'analisi sensoriale descrittiva eseguita in triplicato. In seguito sono stati individuati come descrittori principali la texture di superficie, la sensazione di secchezza e l'adesività, con un coefficiente di correlazione pari a 0,96. Il confronto con il Saggio di Metilcellulosa (MCP) a sua volta ha mostrato una forte correlazione con $r^2 = 0,83$, anche se ancora più alto è risultato il coefficiente del Saggio A - H, pari a 0,90, che supera il valore ottenuto precedentemente da Kennedy (2006).

Tale studio conferma quindi le potenzialità che l'applicazione di queste due tecniche di quantificazione, grazie alla loro semplicità ed efficienza nel predire

obbiettivamente l'astringenza percepita, potrà apportare in futuro sia alla ricerca in campo enologico sia alla produzione industriale del vino rosso.

Le metodiche potranno infatti essere utilizzate da viticoltori e enologi per comprendere meglio come la concentrazione dei tannini nel prodotto finito sia relazionata a diversi fattori quali: la maturazione dell'uva, il monitoraggio del livello di qualità in vigneto e del processo di vinificazione, nonché la qualità attesa nel prodotto finito al momento della vendita per andare incontro alle nuove esigenze di mercato e alle preferenze dei consumatori.

3) STABILITA' COLLOIDALE DEL VINO ROSSO

3.1) Fattori che influenzano la stabilità colloidale del vino rosso

La formazione della sensazione di astringenza legata al vino rosso è un processo complesso, che dipende sia da ogni singolo composto presente in soluzione sia dall'aggregazione dei differenti componenti, che sta alla base della stabilità colloidale del vino.

Il ricercatore Somers, nel 1966 ha affermato che i tannini, riconosciuti come polimeri pigmentati, nel loro ruolo colloidale si possono anche trovare sotto forma di antocianine monomeriche disperse e che il processo di interazione con le altre macromolecole tipiche del vino rosso può coinvolgere complessi quali: proantocianidine - proantocianidine, proantocianidine - proteine, proantocianidine - polisaccaridi e proantocianidine - proteine - polisaccaridi. In quest'ultimo caso, gli elementi che maggiormente influenzano nel complesso la sensazione di astringenza sono i polisaccaridi.

In questo paragrafo verranno presentati i meccanismi di interazione colloidale delle catechine e delle epicatechine nella loro forma polimerica con le altre principali sostanze presenti nel vino rosso, sulla base delle ipotesi avanzate nel 2012 dal ricercatore Scollary e collaboratori.

- **Interazioni proantocianidine - proantocianidine**

Nello studio della stabilità colloidale sono stati innanzitutto presi in considerazione i flavan - 3 - oli nella forma monomerica e dimerica, estratti dai semi dell'uva in un vino modello con aggiunta di acido tartarico. E' stato

dimostrato che la struttura del composto iniziale, in particolare l'estensione della galloilazione dei polifenoli, suscita la formazione di aggregati. La relazione che si crea tra massa del polimero e grado di polimerizzazione in questa fase è complessa e l'alta solubilità delle proantocianidine potrebbe essere proprio la ragione della capacità delle grandi molecole di adottare una conformazione flessibile in presenza di legami idrofobici e di avere un impatto sulla percezione dell'astringenza.

Le caratteristiche delle catechine e epicatechine e la loro capacità di legare le unità C₄, C₆ e C₈ di altre molecole, permette di formare isomeri multipli: 8 per i dimeri, 32 per i trimeri e 128 per i tetrameri.

In questo contesto è stato verificato il fenomeno di auto - associazione tra polifenoli, dimostrando che questi aggregati molecolari possiedono una costante di affinità elevata e un basso valore di concentrazione micellare critica, che portano alla formazione di torbidità o precipitati.

Con i dimeri e i trimeri le micelle sono piccole e la costante di affinità é bassa, mentre la cmc è più alta, influenzata in particolare dalla concentrazione di etanolo in soluzione.

L'interazione proantocianidine - proantocianidine è dominata dalla presenza di legami $\pi - \pi$ e legami idrogeno grazie ai quali i flavan - 3 - oli sono capaci di formare colloidali in concentrazione significativa per suscitare la percezione di astringenza nel vino rosso.

- **Interazioni proantocianidine - proteine**

E' stata dimostrata una relazione complessa tra la massa delle proantocianidine, i legami con le proteine, il rapporto tannini/proteine e la stabilità colloidale.

Le dinamiche conformazionali delle proantocianidine e delle proteine dipendono dalle interazioni di legame che si formano, che coinvolgono legami idrogeno e effetti idrofobici come le forze di Van Der Waals nella matrice acida del vino. In queste condizioni, la flessibilità del peptide si riduce e il legame idrogeno che si forma tra di esso e le proantocianidine è la forza che determina l'associazione.

I due più importanti parametri che influenzano l'interazione tra proteine e tannini sono la concentrazione micellare critica delle proantocianidine e la loro struttura tridimensionale, che determina il sito preferenziale di legame e bilancia l'interazione idrofilica e idrofobica tra i polimeri coinvolti.

Le interazioni al di sotto della concentrazione micellare critica sono specifiche, portando alla formazione di strutture altamente ordinate tra i siti di legame dei peptidi e dei tannini.

In particolare, la conformazione delle proantocianidine dimeriche in questo contesto appare come fattore fondamentale per la formazione di legami intramolecolari π , che dominano la conformazione compatta di queste molecole, mentre nella struttura molecolare estesa predomina un arrangiamento di anelli fenolici che suscita legami intermolecolari, divenendo un elemento chiave per differenziare il potenziale astringente delle diverse proantocianidine.

- **Interazioni proantocianidine - proteine - polisaccaridi**

Alcuni studi descrivono anche aggregati formati dai tre principali componenti del vino rosso: proantocianidine/proteine/polisaccaridi (Scollary et al., 2012).

I polisaccaridi sono l'elemento che in particolare influenza le dimensioni degli aggregati. Tuttavia, l'effetto dipende dalla classe di polisaccaridi coinvolta, poiché le Mannoproteine e gli Arabinogalattani mostrano un forte effetto inibitorio che però tende a decrescere all'aumento della loro massa molecolare, mentre i Ramnogalatturonani di tipo II possono essere coinvolti nella co - aggregazione.

Questo indica che gli aspetti di ingombro sterico dei diversi polisaccaridi può essere un elemento fondamentale nel determinare la formazione di sospensioni colloidali nel vino.

Poncet - Legrand e collaboratori nel 2007, hanno proposto un meccanismo dove i polisaccaridi di grande massa molecolare vanno incontro a flocculazione, mentre i polisaccaridi di piccola massa generano una copertura della superficie superiore che limita l'interazione tra i tannini e risulta in piccole particelle.

Inoltre, sono state individuate due modalità con cui i polisaccaridi possono inibire la formazione di aggregati di proteine e tannini.

La prima prevede che i polisaccaridi possano formare dei complessi ternari con gli aggregati tannini - proteine per incrementarne la solubilità, mentre un meccanismo alternativo riguarda la possibilità per i polisaccaridi di inglobare le proantocianidine e interferire con la loro abilità nell'aggregare con le proteine.

Anche l'aumento del carattere ionico dei polisaccaridi è un altro fattore di inibizione del legame.

Per quanto riguarda l'impatto che altri componenti del vino possono avere sugli aggregati colloidali, è stato riconosciuto che l'incremento della concentrazione di etanolo in soluzione genera aggregati molecolari più piccoli e polidispersi o può portare alla distruzione delle Epigallocatechingallate (EGCG) e quindi all'inibizione dell'aggregazione proteica.

Per questo motivo, l'incremento dell'etanolo diminuisce la percezione di astringenza.

Infine, la formazione di aggregati sferici o frammentati tra tannini e proteine salivari, cambia la dinamica conformazionale delle molecole coinvolte a seconda della loro geometria, inducendo cambiamenti nelle caratteristiche della texture, variando la durata del legame ai recettori gustativi e influenzando complessivamente la percezione di astringenza.

3.2) Legami che caratterizzano la frazione colloidale del vino rosso

E' stato studiato da Zanchi e collaboratori nel 2008 lo stato fisico dei tannini in una soluzione modello acqua - etanolo, per verificare il tipo di interazione che si instaura tra le proteine salivari e i tannini.

Il modello ha permesso di chiarire i meccanismi di auto - aggregazione e precipitazione dei polifenoli in scala nanometrica, che influenzano la percezione dell'astringenza nel consumo di vino rosso. In questo contesto è stata analizzata la modalità di aggregazione, la morfologia e la struttura interna dei nano - aggregati tannico - proteici e in particolare la compattazione delle molecole proteiche a formare micelle.

Durante l'invecchiamento del vino rosso, i tannini condensati e le antocianine continuano a modificare la loro struttura polimerizzando, ramificando e infine

rompendosi. E' un'evoluzione chimica che procede durante tutta la shelf - life del vino rosso, dove vengono coinvolte sia interazioni elettrostatiche tra le superfici delle molecole, sia cambiamenti nelle interazioni idrofobiche e idrogeno, così come la presenza di specie ioniche in soluzione come l'acido tartarico contribuiscono a creare una dispersione colloidale metastabile, la quale causa il fenomeno di intorbidamento del vino.

Il pH del solvente è stato aggiustato al valore di 3,4 e variando progressivamente la percentuale di etanolo della soluzione, si è ottenuta una sequenza di step di precipitazione che hanno permesso di individuare tre frazioni di tannini, le quali hanno mostrato differenti comportamenti di aggregazione.

Si è potuto notare che fattori quali la forza molecolare, la tensione interfacciale, il numero di monomeri e la massa critica di aggregazione insieme alla concentrazione di etanolo e alla forza ionica del mezzo, diventano gli elementi determinanti perché venga completata la prima fase di nucleazione delle macromolecole tanniche, che presentano inizialmente carattere idrofilo.

A conferma di tale deduzione, è stato verificato che ad alte concentrazioni di etanolo e bassa forza ionica venivano formate delle dispersioni colloidali metastabili partendo da flavanoli monomerici, mentre diminuendo la concentrazione di etanolo e aumentando la forza ionica venivano create delle dispersioni colloidali instabili, dove i tannini aggregavano rapidamente portando alla formazione di grandi flocculi che precipitavano in breve tempo. Il fenomeno di precipitazione coinvolgeva fino al 33% dei tannini totali, mentre la maggioranza rimaneva in soluzione arrivando a rappresentare il 65% della frazione tannica complessiva.

La prima frazione di tannini isolata era costituita da tannini idrofobici con una conformazione estesa dove le superfici idrofobiche erano più esposte al solvente.

Infatti questa tipologia di tannini formava piccoli gruppi di particelle colloidali che rimanevano disperse in soluzione.

Nella seconda frazione invece, i colloidali tendevano ad aggregare rapidamente e precipitare, mentre la frazione rimanente veniva completamente solvatata.

Partendo da tali considerazioni, è stato possibile confermare che le interazioni tannino - tannino sono un elemento sufficiente per creare sospensioni colloidali nel vino ed è stato verificato che la micellizzazione indotta dai tannini è più rapida in caso di presenza di una molecola monomerica che si lega ad aggregati già formati, rispetto alla presenza di poche molecole libere che si aggregano spontaneamente.

Inoltre, dato che i tannini non sono carichi elettricamente al valore del pH del vino, si crede che l'aggregazione continui fino alla fase di separazione.

E' stato indagato infine il ruolo delle frazioni idrosolubili dei tannini nel compattare le Proteine salivari Ricche di Prolina (PRP), dove le frazioni di prolina disponibili per un'interazione con i tannini vanno da 35 a 51 e i polifenoli legati agiscono come sostanze che rafforzano le interazioni idrofobiche tra i siti delle proline, suscitando quindi l'astringenza all'assaggio del vino rosso (Zanchi et al., 2008).

3.3) Esempi di sostanze fenoliche coinvolte nello stato colloidale del vino rosso

- **Malvidine - 3 - glucoside**

In soluzioni modello che riproducono le condizioni del vino rosso, sono state individuate da Remy e collaboratori nel 2000 delle molecole fenoliche quali le malvidine - 3 - glucoside, le catechine e alcuni dimeri di proantocianidine per studiare l'evoluzione di questi composti nel vino.

Il primo meccanismo d'interazione che è stato studiato riguarda una reazione di condensazione che avviene tra antocianine e flavanoli, mediata da acetaldeide.

La seconda via metabolica corrisponde invece ad una reazione diretta tra antocianine e flavanoli.

Sono stati inoltre proposti due meccanismi di addizione nucleofila: il primo inizia con un attacco nucleofilo al legame elettrofilo C₄ del gruppo flavylum dell'antocianina formata da un flavanolo, il secondo coinvolge lo ione carbonio rilasciato dalla rottura del legame interflavinico di una proantocianidina in ambiente acido, mentre l'antocianina reagisce come nucleofilo. Il polimero pigmentato malvidina - 3 - glucoside origina dall'interazione diretta tannino - tannino, reagendo sia nella sua forma di emichetale, sia nella forma flavylum anche se quest'ultima è molto meno nucleofila rispetto alla prima. Entrambe le forme, tuttavia, entrano a far parte dell'equilibrio colloidale del vino.

Le specie elettrofile come lo ione carbonio, catalizzano la rottura delle proantocianidine, mentre l'emichetale derivato dalle antocianine, compete con i flavanoli nella formazione del legame carbonio - carbonio.

Altre malvidine della frazione polimerica sono state individuate come incorporate all'interno di strutture a basso peso molecolare, risultando in corte catene in presenza di grandi quantità di forme monomeriche delle antocianine, che possono addizionarsi alle proantocianidine proprio come i monomeri dei flavanoli. Non è escluso comunque che all'interno del vino rosso, le stesse reazioni possano coinvolgere anche le proantocianidine ad alto peso molecolare.

- **Polimero catechina - acetaldeide**

Durante l'invecchiamento del vino rosso, il contenuto fenolico diventa progressivamente più complesso influenzando il colore, il gusto e la stabilità colloidale, per l'avvenire di reazioni di condensazione e polimerizzazione dirette o indirette tra i flavanoli al valore di pH del vino, partendo da proantocianidine in forma libera che vengono trasformate in polimeri pigmentati. In una soluzione modello di vino è stata studiata da Saucier e collaboratori nel 1997 la formazione di un prodotto di condensazione tra catechine e acetaldeide. Nel primo stadio della reazione non sono state rilevate particelle, mentre nella seconda fase si sono formati degli aggregati di particelle di grandi dimensioni la cui massa molecolare media incrementava rapidamente. Essi non sembravano tuttavia essere legati ad un elevato grado di polimerizzazione delle singole molecole o alla presenza iniziale di forme polimeriche complesse.

Quindi, gli aggregati erano formati da un grande numero di piccoli polimeri e il processo di auto - associazione è simile a quello che avviene per le micelle alla concentrazione micellare critica (cmc), che decresce all'aumentare della massa dei polimeri a causa delle interazioni idrofobiche. Il risultato della reazione è un

dimero di catechine legate tramite un ponte etile e solo la struttura ad anello è coinvolta nella condensazione dell'acetaldeide.

L'associazione non specifica che avviene tra le catechine in forma dimerica e altri polifenoli, così come con polisaccaridi e proteine in soluzione attraverso meccanismi basati sulla concentrazione e sull'idrofobicità delle molecole, entra a far parte della componente colloidale del vino rosso.

4) TORBIDITA' NEL VINO ROSSO

4.1) Evoluzione della torbidità nel vino

Nel vino la torbidità si sviluppa in sfavorevoli condizioni di stoccaggio, ed è dovuta prevalentemente alla coagulazione e all'aggregazione delle proteine che tendono a precipitare sotto forma di sedimenti amorfi, oppure flocculare e rimanere in sospensione.

Questo fenomeno assume una considerevole importanza tecnologica per il vino in quanto influenza la sua stabilità, che rappresenta uno dei principali caratteri qualitativi considerati dai consumatori, diminuendo il valore commerciale del prodotto finito e rendendolo inaccettabile per la vendita.

I primi studi effettuati per comprendere la natura dei composti responsabili della torbidità del vino, sono stati svolti da Koch e Sajak nel 1959, oltre che da Moretti e Berg nel 1965. Inizialmente, la componente proteica è stata indicata come principale elemento responsabile dello sviluppo di torbidità, tuttavia, i valori di concentrazione proteica rilevati non erano rappresentativi, poiché sovrastimati dalla presenza di una quantità considerevole di composti non proteici.

Da questi risultati è stato dedotto che tali sostanze possono ricoprire un ruolo fondamentale nell'innescare la formazione di torbidità e che quindi la concentrazione proteica totale non poteva essere un'informazione sufficiente a prevedere l'evoluzione dell'intorbidamento durante la shelf - life dei vini.

Nel tempo, sono stati sviluppati diversi metodi per determinare la stabilità dei vini, tra cui si possono riportare a titolo d'esempio l'uso di precipitanti delle proteine come i tannini, l'acido Tricloroacetico (TCA) e l'Heat test, che tra tutte

le procedure analizzate ha mostrato la maggiore correlazione con il reale comportamento della torbidità nei vini imbottigliati (Berg e Akiyoshi, 1961).

4.2) Fattori responsabili della torbidità del vino

Con l'obiettivo di spiegare come avviene l'insolubilizzazione delle proteine del vino, sono state avanzate due ipotesi principali:

- le singole proteine mostrano una diversa sensibilità alla denaturazione con il calore, contribuendo in maniera differente all'instabilità dei vini e alla formazione di torbidità;
- lo sviluppo di torbidità nei vini è controllato da una serie di composti di origine non proteica;

L'incompleta comprensione dell'effettivo ruolo delle proteine nel produrre intorbidamento nel vino, è legata alle difficoltà riscontrate nell'individuare specifiche classi proteiche coinvolte nel fenomeno.

Durante le analisi svolte da Waters e collaboratori nel 1991, è stata utilizzata come modello la proteina Sieroalbumina Bovina (BSA), poiché presenta un potenziale di produzione di torbidità simile a quello che si verifica nel vino.

In questi esperimenti sono stati valutati anche la massa molecolare e il punto isoelettrico delle proteine, in relazione alla loro suscettibilità ad una minore o maggiore solubilizzazione.

I risultati hanno portato a concludere che le frazioni proteiche maggiormente responsabili della torbidità, fossero quelle di bassa massa molecolare e basso punto isoelettrico (pI).

In aggiunta, Dawes e collaboratori nel 1994, hanno svolto un lavoro di frazionamento delle proteine totali del vino in diversi gruppi in base al loro punto isoelettrico, osservando che tutti i componenti proteici che contribuivano alla torbidità erano termo - instabili e suggerendo che essi potessero interagire con altri composti di diversa origine come proantocianidine e polisaccaridi, creando instabilità nel prodotto finito.

In tale contesto, lo studio ha confermato che questo fenomeno era indotto dal basso pH del vino e da alte concentrazioni di polisaccaridi, mentre il contenuto di alcol non sembrava avere un effetto evidente.

Infatti, alcune classi di polisaccaridi, come le Mannoproteine dai lieviti e gli Arabinogalattani e Ramnogalatturonani dall'uva, portano cariche negative ai valori di pH tipici del vino e come conseguenza possono stabilire interazioni elettrostatiche e ioniche con gli altri componenti, formando composti solubili e insolubili.

Questo processo è fortemente influenzato sia dalla loro carica netta, sia dalle caratteristiche dei loro gruppi funzionali.

Tuttavia, i composti che maggiormente provocano torbidità nel vino complessandosi con le proteine attraverso legami idrogeno e idrofobici, sono stati indicati essere i polifenoli come le proantocianidine (Yokotsuka et al., 1991; Vernhet et al., 1996).

In conclusione, anche la presenza di tracce di metalli pesanti in soluzione è stato individuato come potenziale fattore minoritario capace di indurre la formazione di aggregati tannico - proteici e quindi lo sviluppo di torbidità (Krug, 1968).

4.3) Modello Multivariato dell'effetto dei diversi fattori sulla torbidità del vino rosso

Per stimare lo sviluppo di torbidità nel vino rosso, nello studio di Siebert e collaboratori del 1996 è stato costruito un modello Multivariato, che ha messo a confronto quattro fattori principali: proteine e polifenoli attivi nella formazione di torbidità, pH e contenuto alcolico del vino.

Sono stati svolti 24 esperimenti in quattro ripetizioni per esaminare le diverse combinazioni delle variabili.

E' stata costruita una regressione lineare multipla tra i risultati previsti e quelli realmente ottenuti, che però mostrava un coefficiente di correlazione non molto alto, intorno a 0,54.

I dati poi sono stati rielaborati in scala logaritmica e il coefficiente ha raggiunto valori intorno a 0,88.

La non linearità del modello è stata quindi spiegata nella variabilità dell'effetto dei diversi fattori che intervengono nella formazione di torbidità, come: variazioni di dimensione delle particelle, concentrazione proteica, presenza di amminoacidi liberi, polifenoli e polisaccaridi, percentuale di alcol, pH e presenza di metalli in soluzione.

- **Stima della quantità dei polifenoli che inducono torbidità**

La stima della quantità di polifenoli nel succo d'uva e nel vino rosso è stata ottenuta addizionando progressivamente acido tannico. La torbidità ha raggiunto valori da 2 a 4 NTU nel caso del succo d'uva, mentre andava da 4 a 15 NTU per il vino rosso. Questi risultati sono stati poi confrontati con il livello

d'intorbidamento dovuto all'aggiunta di gelatina e ciò ha potuto confermare che il rapporto tra proteine e polisaccaridi è effettivamente in grado di indurre torbidità, formando dei complessi che in soluzione possiedono il comportamento discontinuo tipico dei sistemi molecolari a limitata solubilità.

- **Caratteristiche di proteine e polifenoli coinvolti nella torbidità**

Le proteine coinvolte nella formazione di torbidità rappresentano una minima parte del contenuto proteico dei vini e la loro principale caratteristica riguarda la predominanza di prolina nella struttura dei peptidi, mentre per lo studio delle caratteristiche dei polifenoli sono stati scelti come standard l'acido tannico e la catechina, evidenziando che il gruppo o - difenolo è la parte attiva del legame con le Proteine Ricche di Prolina (PRP), anche se non può formare cross - linking.

Infatti, è stato verificato che più il numero degli o - difenoli presenti nella molecola aumenta, maggiore è la percentuale di precipitazione dei polifenoli.

- **Effetto dell'alcol**

In questo studio è stato confermato che l'effetto dell'alcol ai valori di pH del vino è prevalentemente inibitorio per la formazione di torbidità.

Questo fenomeno è dovuto alla ridotta polarità del solvente etanolo rispetto all'acqua.

- **Effetto del pH**

Il pH influenza il comportamento delle proteine in soluzione rendendo le macromolecole meno ionizzabili, con un cambiamento nell'attrazione o repulsione ionica, avendo effetto sulla loro carica netta totale.

Il pH inoltre può alterare la solubilità delle molecole proteiche e l'accessibilità dei polifenoli ai siti di attacco delle proteine.

A pH di 3,1 - 3,7, tipici valori del vino rosso, si verifica una modesta formazione di torbidità, con il livello minore corrispondente al minor valore di pH raggiungibile in soluzione.

- **Effetto degli amminoacidi liberi**

Anche la prolina in forma libera, che nel vino rosso presenta una media che va da 150 a 1000 mg/l, ha un effetto sul legame con i polifenoli entrando in competizione con le proteine. In questo contesto si nota la formazione di complessi più piccoli e solubili, che non sono in grado di aumentare di molto la torbidità.

- **Effetto dei metalli**

I metalli pesanti sono contaminanti che possono indurre torbidità ed è la conseguenza dell'attività catalitica di ossidazione o polimerizzazione dei polifenoli, che quindi reagiscono con le proteine .

- **Effetto dei polisaccaridi**

I polisaccaridi possono agire nel vino rosso come elementi protettivi dalla torbidità, diminuendola o prevenendola. Nel loro ruolo interagiscono con altre sostanze colloidali, entrando in competizione sia con le proteine che con i polifenoli a livello sterico, bloccando l'accesso delle molecole ai siti di legame e mantenendole in soluzione.

Questo modello Multivariato (Siebert et al., 1996) ha permesso di confermare le ipotesi avanzate in bibliografia sulla dinamica delle principali macromolecole nel formare torbidità nel vino rosso, evidenziando inoltre l'effetto degli altri fattori presenti in soluzione e permettendo di ottenere una rappresentazione attendibile dei fenomeni di instabilità che possono influenzare la qualità totale del vino nel tempo.

5) SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di quantificare le diverse componenti della frazione macromolecolare (proteine e polisaccaridi) di oltre 100 vini rossi italiani e studiare la loro interazione al fine di delucidare il loro ruolo nella stabilità colloidale e nella percezione dell'astringenza dei vini.

6) MATERIALI E METODI

6.1) Scopo del Progetto PRIN

Il lavoro di tesi che viene presentato in questo paragrafo si inserisce all'interno del progetto PRIN: "La diversità dei tannini nei vini rossi italiani", che si sviluppa a livello nazionale in un arco di tempo di 36 mesi.

Lo scopo del progetto è di fornire, attraverso un approccio trascrizionale, composizionale, chimico e sensoriale, una descrizione dettagliata delle differenze esistenti tra i campioni di un ampio set di vini rossi provenienti dalle maggiori regioni vinicole italiane, per delineare una mappa dell'astringenza percepita al momento del consumo in relazione alla loro specifica origine varietale e geografica.

Le informazioni riguardo il meccanismo con cui le specie chimiche dell'ambiente "vino", quali proteine e polisaccaridi, entrano in contatto con i tannini e modulano la percezione dell'astringenza raccolte durante questo periodo di analisi, permetteranno di aumentare nel tempo la capacità degli enologi italiani di rendere ottimale il processo di vinificazione, considerando le caratteristiche delle diverse cultivar per garantire la produzione di un vino rosso che esibisca proprietà sensoriali e composizionali stabili nel tempo.

Il progetto PRIN viene gestito attraverso la collaborazione di sei Unità di Ricerca: l'Università di Verona, la Fondazione Edmund Mach (FEM), l'Università di Torino, l'Università di Bologna, l'Università di Napoli e l'Università di Padova.

La tesi si è svolta nell'ambito delle analisi chimiche effettuate presso l'Università degli Studi di Padova e il contributo che potrà apportare al Progetto PRIN riguarderà sia l'approfondimento delle caratteristiche chimiche delle

singole macromolecole del vino rosso, sia la possibilità di verificare le conseguenze che la loro capacità di aggregarsi in soluzione potrebbe apportare alla qualità complessiva del vino.

Nei paragrafi successivi verranno descritti i protocolli utilizzati durante lo svolgimento delle analisi di quantificazione delle principali classi di macromolecole presenti nei vini rossi coinvolti nel progetto PRIN.

Le prove sono state eseguite in triplicato per ogni campione e hanno riguardato:

- la quantificazione delle proteine totali;
- la quantificazione dei polisaccaridi totali;
- la stima della reattività dei tannini, attraverso il Saggio di precipitazione proteica della proteina Sieroalbumina Bovina (BSA) tramite nefelometro;
- l'esecuzione dell'Heat Test o Test al Calore per verificare la stabilità colloidale dei vini;

6.2) Campionamento vini rossi

Per lo svolgimento delle analisi sono stati campionati vini rossi di 11 varietà autoctone italiane. In dettaglio:

- 11 Nebbiolo dal Piemonte;
- 22 Teroldego dal Trentino;
- 20 Raboso Piave dal Veneto;
- 7 Corvina dal Veneto;
- 12 Sangiovese dall'Emilia Romagna;
- 7 Sangiovese dalla Toscana;

- 6 Sagrantino dall'Umbria;
- 9 Montepulciano dall'Abruzzo;
- 11 Primitivo dalla Puglia;
- 10 Aglianico dalla Campania;
- 3 Nerello Mascalese dalla Sicilia;
- 9 Cannonau dalla Sardegna;

Per un totale di 127 campioni.

6.3) Procedura per la quantificazione del contenuto proteico totale in vini rossi commerciali

Il seguente protocollo è stato adattato sulla base del Protocollo di Smith et al. del 2011.

Lo scopo di questa procedura è stato quello di risalire alla quantità di proteina totale presente nei campioni di vino rosso commerciale coinvolti nel progetto PRIN.

Per eseguire questo protocollo, sono stati utilizzati una bilancia digitale, due centrifughe da laboratorio capaci di lavorare almeno fino a 16.000 giri, uno Spettrofotometro e le relative cuvette in plastica, alcune micro - pipette da laboratorio di volume da 0,1 µl a 10 ml e i puntali corrispondenti, Siringhe in plastica, Filtri da 0,45 µm e/o 0,22 µm, tubi Falcon in plastica da 50 ml e da 15 ml, tubi Eppendorf in plastica da 1,5 ml, Acqua Ultrapura, PoliVinilPoliPirrolidone (PVPP), l'enzima Invertasi per la retta di taratura, Acetone puro, Acido Tricloroacetico (TCA), Sieroalbumina Bovina (BSA) e kit Bio - Rad contenente il reagente spettrofotometrico di Bradford.

Inizialmente sono stati prelevati direttamente dalle bottiglie 50 ml di ogni campione, per poi trasferire 10 ml di vino in apposite falcon in triplicato, pretrattandoli con 0,05 g/10 ml di Polivinilpolipirrolidone (PVPP), un composto che lega parte della componente polifenolica dei vini rossi, in particolare leucoantociani e catechine. I vini sono rimasti in contatto con il PVPP per 15 minuti con agitazione costante. Dopo centrifugazione a 14.000 g, il surnatante veniva filtrato a 0,45 o 0,22 μm con filtri a siringa.

Successivamente, a 500 μl di surnatante di ogni vino venivano aggiunti 1000 μl (1ml) di soluzione di 10% TCA in acetone per favorire la precipitazione delle proteine. Ogni campione è stato preparato in triplo.

Successivamente, i campioni sono stati posti a - 18°C per tutta la notte, quindi sono stati centrifugati per 10 minuti a 16.000 giri. Il pellet così ottenuto è stato recuperato facendo scolare lentamente il surnatante, avendo cura di non perdere il residuo proteico sul fondo chiamato pellet e definito come prodotto di consistenza granulare, ottenuto per agglomerazione di materiale, che viene fatto precipitare.

E' stato quindi aggiunto ad ogni campione replicato 1 ml di acetone puro al fine di lavare eventuali impurità rimaste intrappolate nel pellet.

A questo punto, le eppendorf sono state centrifugate una seconda volta per 10' a 14.000 giri, poi l'acetone è stato di nuovo fatto scolare e le eppendorf sono state lasciate ad evaporare sotto la cappa per tutta la notte.

Dopo questo passaggio, tutti i campioni in triplicato sono stati dissolti in 500 μl di acqua ultrapura.

In questa fase è stata stabilita la retta di taratura con l'enzima Invertasi, partendo da una concentrazione iniziale di enzima di 1 g/l con cui i campioni sono stati confrontati durante le letture dell'assorbanza allo spettrofotometro.

Per costruire la retta sono state preparate 7 eppendorf da 1,5 ml, che rappresentavano i 7 standard della taratura (ST₁;ST₂;ST₃;ST₄;ST₅;ST₆;ST₇).

A questo punto, gli standard dal 2 al 7 sono stati riempiti con 1 ml di acqua ultrapura.

Successivamente sono stati prelevati 2 ml dalla soluzione madre (SM) con l'Invertasi, per addizionarli allo standard ST₁.

Da questa prima soluzione standard è stato poi prelevato 1 ml e aggiunto allo ST₂, quindi si è continuato in modo progressivo per tutti gli standard fino ad arrivare allo ST₆.

Lo standard ST₇ presentava solo acqua ultrapura.

Nelle 7 eppendorf la concentrazione iniziale di Invertasi è stata a mano a mano dimezzata, fino a raggiungere una concentrazione finale di 0 g/l.

In conclusione, esse sono state trasferite direttamente in cuvetta come è avvenuto per 100 µl di ogni campione, comprese le repliche, a cui sono stati aggiunti 1000 µl (1ml) di reagente di Bradford tal quale.

Le letture dell'assorbanza sono state effettuate allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda di 595 nm, in presenza di un bianco (W) costituito da 100 µl di acqua ultrapura e 1 ml di reagente di Bradford.

6.4) Procedura per la quantificazione dei polisaccaridi totali in vini rossi commerciali

Il seguente protocollo è stato adattato sulla base del Protocollo di Sagarra et al. del 1995, "Spectrophotometric Methods for the analysis of Polysaccharide Levels in Winemaking Products". Lo scopo di questa procedura è stato quello di risalire alla quantità totale di polisaccaridi presente nei campioni di vino rosso commerciale coinvolti nel progetto PRIN.

Per svolgere questo protocollo sono stati utilizzati una serie di strumenti e attrezzature tra cui: una bilancia digitale, due centrifughe da laboratorio capaci di operare almeno fino a 14.000 giri, uno Spettrofotometro e relative cuvette in plastica, micro - pipette di volume da 0,1 µl a 10 ml e i relativi puntali da laboratorio, tubi Falcon in plastica da 50 ml e da 15 ml, tubi Eppendorf in plastica da 2 ml, un Vortex per miscelare il contenuto dei campioni, Siringhe in plastica e Filtri da 0,45 o 0,22 µm, PoliVinilPoliPirrolidone (PVPP), Acqua Ultrapura, Fenolo, Glucosio in polvere, Etanolo puro, Acido Solforico puro (H₂SO₄).

Inizialmente, come nel caso della quantificazione proteica, 10 ml di ogni campione di vino in triplicato sono stati pretrattati con 0,05 g di PoliVinilPoliPirrolidone (PVPP) in apposite falcon per eliminare in parte i pigmenti presenti e filtrati con siringa a filtro da 0,45 o 0,22 µm.

A questo punto, 20 µl di surnatante di ogni campione sono stati prelevati dalle falcon e immessi in triplo in tubi eppendorf da 2 ml. Dopodiché, ad ogni tripletta di eppendorf per campione sono stati aggiunti 500 µl di etanolo puro, quindi esse sono state collocate in frigorifero a 4°C per tutta la notte.

Successivamente, le eppendorf sono state centrifugate a 14.000 giri per 30 minuti e svuotate del surnatante avendo la cautela di non perdere il pellet.

Al pellet di tutti i campioni e relative repliche, è stato quindi aggiunto 1 ml di etanolo puro al fine di lavare eventuali impurità intrappolate nei pellet. I campioni sono quindi stati fatti miscelare nel vortex tramite generazione di vibrazioni, fino a che tutto il residuo polisaccaridico è tornato completamente in soluzione. Dopo questo passaggio i campioni sono stati centrifugati per la seconda volta a 14.000 giri per 30 minuti, è stato di nuovo svuotato il surnatante e le eppendorf sono state lasciate ad evaporare sotto cappa per tutta la notte.

Prima di allestire le eppendorf per la retta di taratura con il glucosio, è stata preparata la soluzione di acqua - fenolo, costituita aggiungendo 1 µl di fenolo all'80% per ogni ml di acqua richiesto. Il fenolo è una sostanza cancerogena per inalazione, perciò i passaggi che hanno previsto la sua presenza sono stati svolti rispettando una serie di misure di sicurezza, tra cui l'azionamento della cappa aspirante alla massima potenza, l'utilizzo del camice e dei guanti. Tutte le operazioni sono state svolte rigorosamente sotto cappa aspirante e al termine tutto il materiale monouso è stato smaltito in apposite taniche sotto cappa, mentre le attrezzature non monouso sono state disinfettate con una soluzione di acqua e alcol e mantenute per un certo periodo di tempo sotto la cappa in funzione. Particolare attenzione è stata adottata anche per l'acido solforico (H_2SO_4), utilizzato successivamente, poiché è un forte corrosivo.

La preparazione della retta di taratura con il glucosio iniziava con l'allestimento di una soluzione madre (SM) che presentava una concentrazione di 1 g/l di glucosio in acqua ultrapura, corrispondente a 0,01 g di glucosio/10 ml di acqua ultrapura. Dalla soluzione madre venivano successivamente prelevati 100 µl

aggiungendovi 9,9 ml di soluzione acqua - fenolo. Alla fine si ottenevano in totale 10 ml di acqua - fenolo, con una concentrazione di 100 mg di glucosio per litro. Questa soluzione veniva nominata Sol₁. Da essa veniva prelevato 1 ml e ci si aggiungeva 1 ml di soluzione acqua - fenolo, ottenendo Sol₂, perciò si procedeva in maniera progressiva fino a costituire Sol₆. L'ultima soluzione, Sol₇, conteneva solo 1 ml di acqua ultrapura.

Successivamente, nella costruzione degli standard della retta di taratura, venivano prelevati 400 µl da Sol₁ e veniva aggiunto 1 ml di acido solforico (H₂SO₄), per ottenere lo Standard 1 (ST₁) e così si proseguiva per tutti gli standard progressivamente, fino allo standard ST₆. Lo standard ST₇ conteneva sempre solo acqua ultrapura, fenolo e acido solforico.

Lo stesso procedimento è stato rispettato anche per tutti i campioni in triplicato che poi, insieme agli standard, venivano miscelati con il vortex e fatti sostare sotto cappa per 30 minuti per far avvenire la reazione esotermica tra l'acido solforico e i polisaccaridi.

Passata mezz'ora, i campioni e gli standard della retta venivano trasferiti nelle cuvette per la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 490 nm.

Il bianco (W) che veniva utilizzato durante la misurazione dell'assorbanza, era costituito da 400 µl di acqua - fenolo e 1 ml di acido solforico (H₂SO₄). Un'accortezza che veniva applicata prima di effettuare le letture, era di trasferire il contenuto delle eppendorf alle cuvette molto lentamente per evitare la formazione di bolle che avrebbero potuto falsare il risultato finale e attendere almeno 5 minuti prima di proseguire, per fare in modo che i campioni miscelati all'acido solforico si stabilizzassero.

6.5) Procedura per la stima indiretta dei tannini totali (Indice di BSA):

Lo scopo di questa procedura è stato di stimare la quantità di tannini totali presenti in soluzione misurando la loro reattività con la proteina Sieroalbumina Bovina (BSA) attraverso la formazione di torbidità. Per eseguire quest'analisi sono stati utilizzati: una bilancia analitica, uno stock di proteina Sieroalbumina Bovina (BSA), Acqua Ultrapura, un Nefelometro con appositi contenitori in vetro da 10 ml per la lettura della torbidità e tubi Falcon in plastica da 50 ml per contenere i campioni di vino, insieme ad una micro - pipetta da 20 µl per dosare la soluzione di BSA nel vino e un Vortex per miscelare la soluzione BSA - acqua ultrapura.

Inizialmente veniva prelevata dal frigorifero la Sieroalbumina Bovina (BSA) e veniva preparata la soluzione stock BSA - acqua ultrapura, corrispondente ad una concentrazione di 10 g/l ed equivalente a 0,01 g di BSA su 10 ml di acqua ultrapura. In seguito veniva effettuata una prima misura delle Unità Turbidimetriche Nefelometriche (NTU) su ogni campione di vino tal quale in triplicato, a cui venivano poi aggiunti 20 µl di stock BSA. Si attendeva quindi un tempo di reazione di 5 minuti, poi venivano lette le Unità Nefelometriche Turbidimetriche (NTU) dopo l'aggiunta dello stock BSA. L'Indice di Reattività alla BSA è stato ricavato dalla differenza tra le Unità Nefelometriche Turbidimetriche (NTU) lette dopo l'aggiunta di BSA e prima della sua aggiunta, su una media basata sulla ripetizione in triplo delle letture di ogni campione.

L'equazione a cui si è fatto riferimento è la seguente:

$$\text{Indice BSA } (\Delta NTU) = NTU \text{ dopo BSA} - NTU \text{ al tempo iniziale.}$$

6.6) Procedura per lo svolgimento dell'Heat Test o Test al Calore

Lo scopo di questa procedura è stato quello di misurare il potenziale d'intorbidamento e quindi la stabilità colloidale dei campioni di vino rosso italiano coinvolti nel progetto PRIN, dopo aver subito una fase di riscaldamento. Durante la prova sono stati utilizzati i seguenti materiali e attrezzature: un Filtro Sottovuoto da 0,45 μm , un Nefelometro e le relative cuvette in vetro da 10 ml, un Bagnetto Termostato, tubi Falcon in plastica da 50 ml e 15 ml, Becker da 40 ml, Contenitori di Polistirolo, Ghiaccio.

Innanzitutto, sono stati filtrati 35 ml di ogni campione di vino rosso sotto cappa con un filtro sottovuoto da 0,45 μm . Subito dopo la filtrazione, il vino veniva suddiviso in tre cuvette da 10 ml e ne venivano misurate le Unità Nefelometriche Turbidimetriche (NTU) tramite un nefelometro. Se il valore di NTU rilevato risultava inferiore a 2, i campioni venivano considerati conformi per la prosecuzione dell'analisi, altrimenti l'operazione di filtrazione sottovuoto e le conseguenti letture al nefelometro venivano ripetute fino a quando risultava rispettato il limite di accettabilità sopraindicato.

Successivamente, i campioni venivano trasferiti in tubi falcon in plastica da 15 ml ed erano sottoposti ad una fase di riscaldamento a 80°C per 2 ore all'interno di un bagnetto termostato per consentire la denaturazione delle proteine in soluzione. Durante questa fase, le falcon venivano mantenute in leggera agitazione. Terminato il riscaldamento, i campioni venivano immersi in un contenitore di polistirolo riempito di ghiaccio e lasciati raffreddare per 15 minuti. In questo passaggio le proteine presenti coagulavano e precipitavano. Dopodiché seguiva una sosta sempre di 15 minuti sul bancone a temperatura ambiente. Prima di poter procedere all'effettuazione delle letture con il

nefelometro, i campioni venivano miscelati un paio di volte manualmente per consentire al precipitato di rimanere in sospensione e formare torbidità. Le Unità Nefelometriche Turbidimetriche (NTU) Nette venivano misurate attraverso la differenza tra le NTU dopo e prima del riscaldamento, per stimare il livello di instabilità colloidale raggiunto dai campioni.

L'equazione di riferimento è la seguente:

$$\Delta NTU NETTE = NTU \text{ dopo riscaldamento} - NTU \text{ prima del riscaldamento}$$

7) RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1) CONTENUTO IN PROTEINE TOTALI

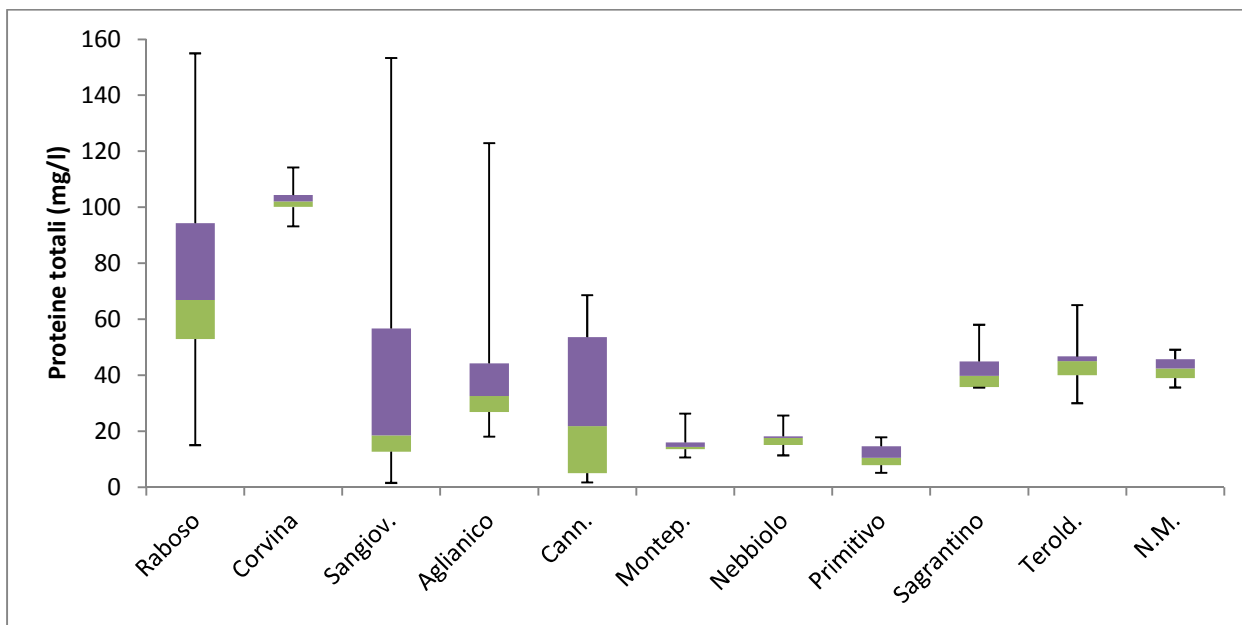


Figura 7.1 - 01 Grafico aggregato (Box Plot) che riporta i dati della concentrazione media delle proteine rilevate nei campioni (mg/l).

Dal grafico Box Plot (**Figura 7.1 - 01**), che raccoglie i dati aggregati della concentrazione proteica media dei campioni di vino rosso analizzati, si può notare come la Corvina abbia il contenuto proteico medio più alto, il quale si attesta attorno ai 102,6 mg/l, mentre il Primitivo presenta il contenuto proteico medio più basso, con un massimo che raggiunge 11 mg/l. La media complessiva delle proteine di tutti i vini studiati è risultata essere pari a 43,4 mg/l. Osservando il grafico si deduce che i campioni possono essere distinti in due gruppi principali: il primo è costituito da vini i cui campioni presentano concentrazioni di proteine simili tra loro, fra cui si trovano il Corvina, il

Montepulciano, il Nebbiolo, il Primitivo, il Teroldego e il Nerello Mascalese. Il secondo gruppo è invece costituito da vini che hanno evidenziato alta variabilità nei valori raggiunti. Tra di essi possono essere individuati il Raboso Piave, il Sangiovese, l'Aglianico, il Cannonau e il Sagrantino.

7.2) GRAFICI INDIVIDUALI DELLE PROTEINE TOTALI

Di seguito si riportano i grafici individuali che mostrano il contenuto medio in proteina di ogni campione di vino analizzato (Figura 7.2 – da 01 a 11).

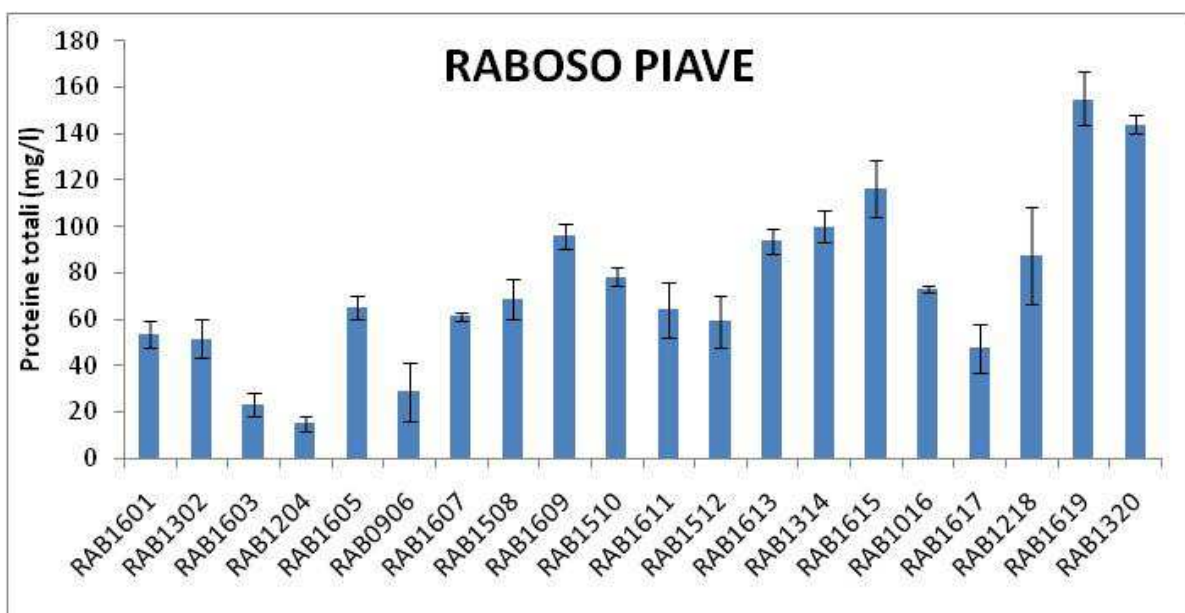


Figura 7.2 - 01 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Raboso Piave (mg/l).

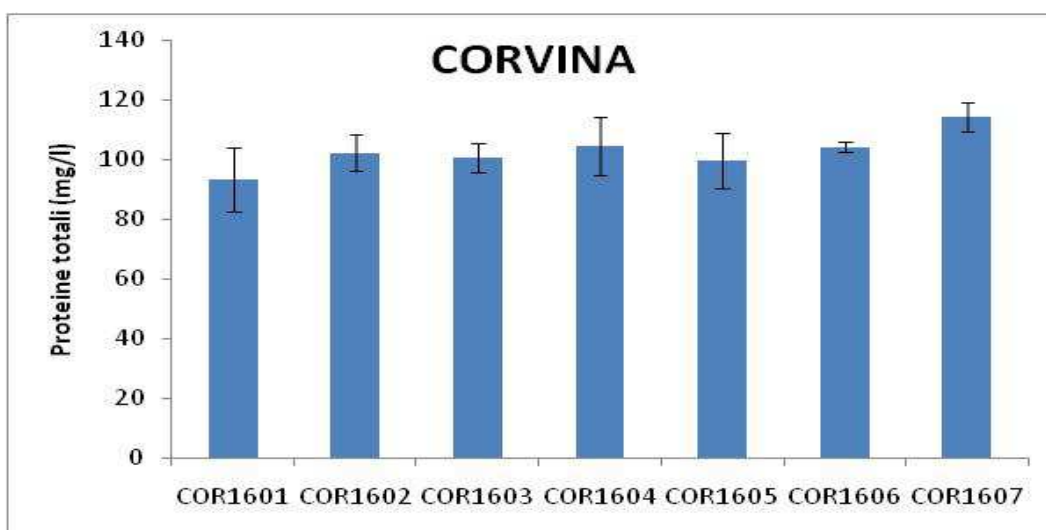


Figura 7.2 - 02 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Corvina (mg/l).

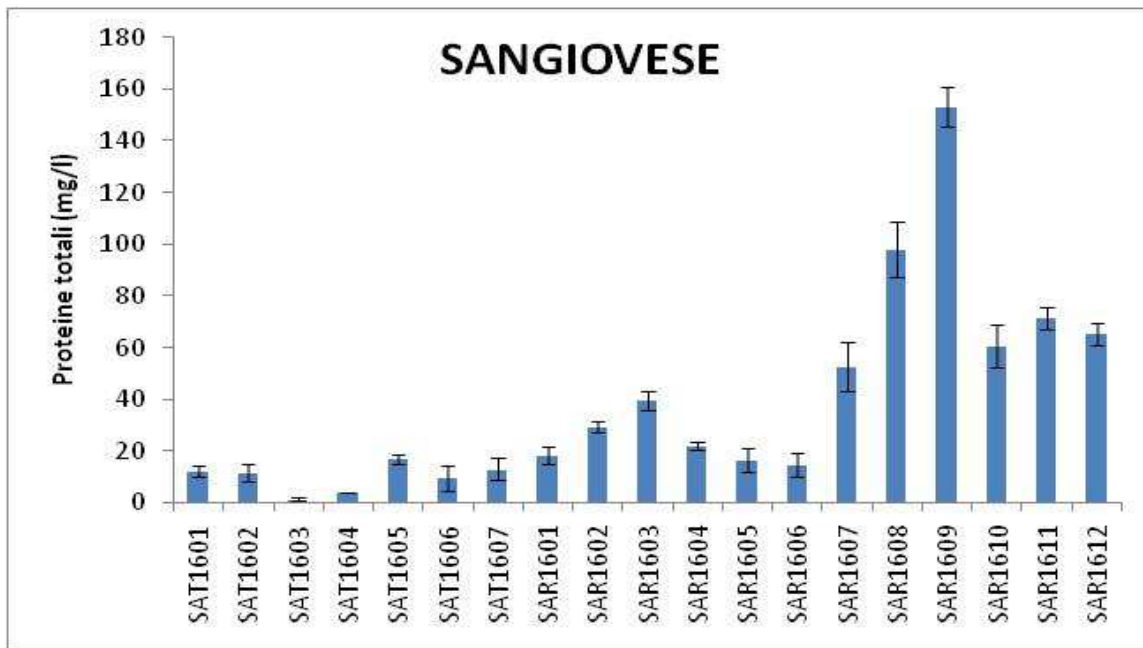


Figura 7.2 - 03 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Sangiovese (mg/l).

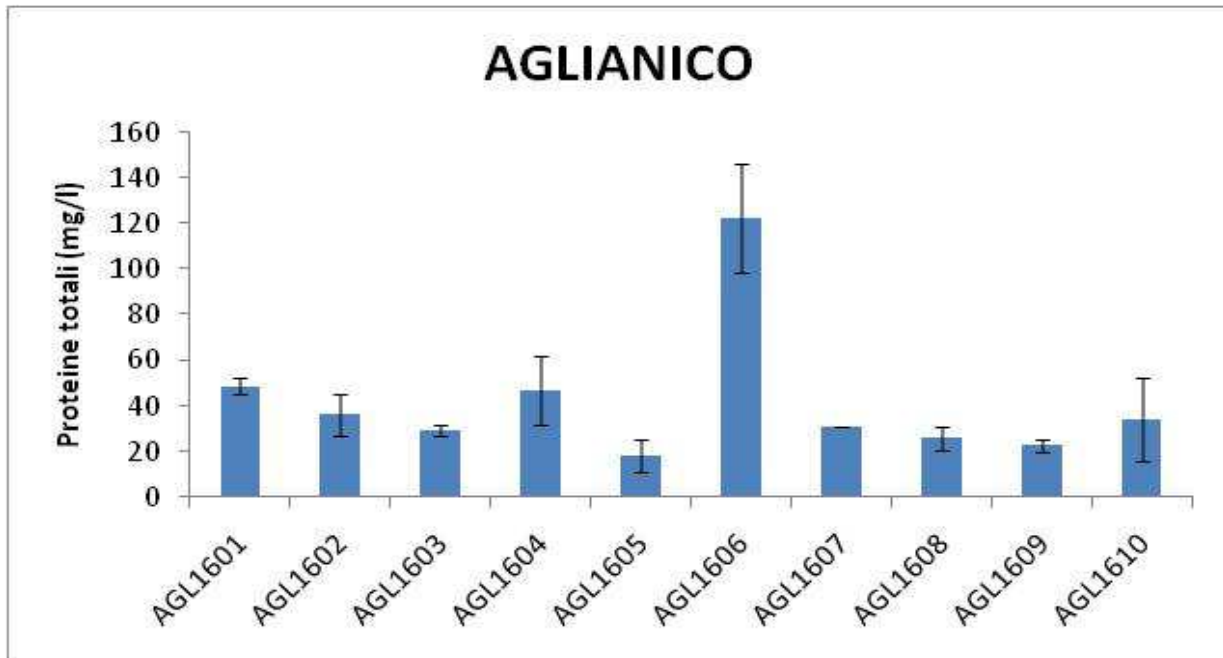


Figura 7.2 - 04 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Aglianico (mg/l).

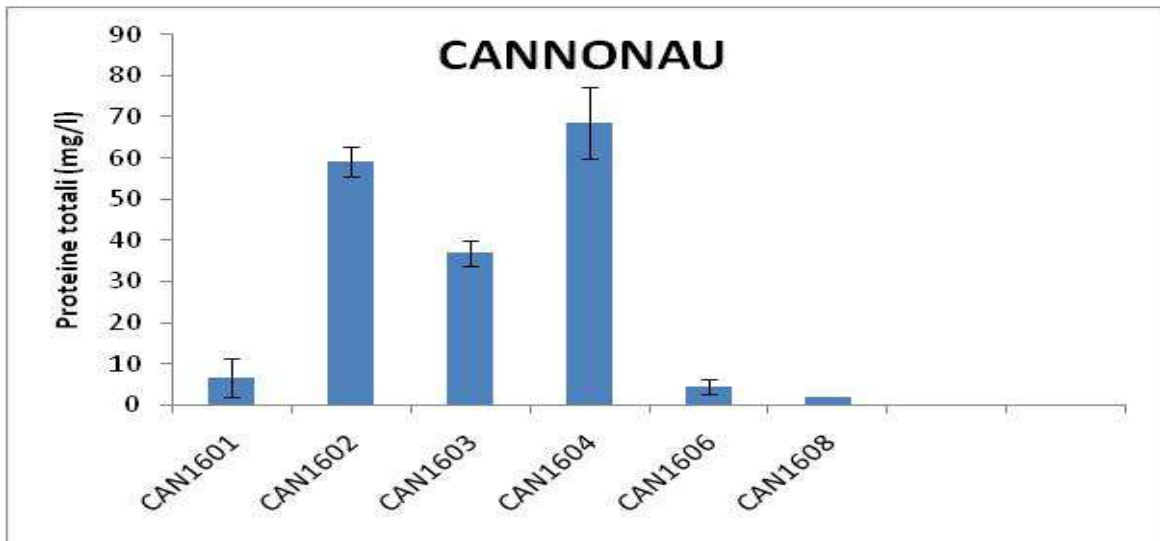


Figura 7.2 - 05 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Cannonau (mg/l).

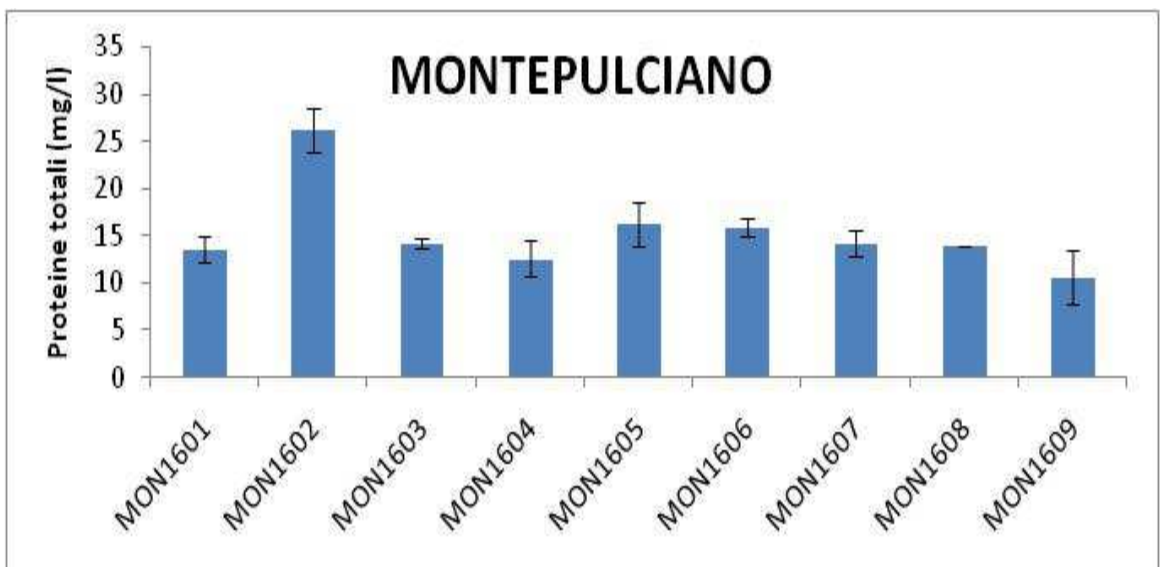


Figura 7.2 - 06 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Montepulciano (mg/l).

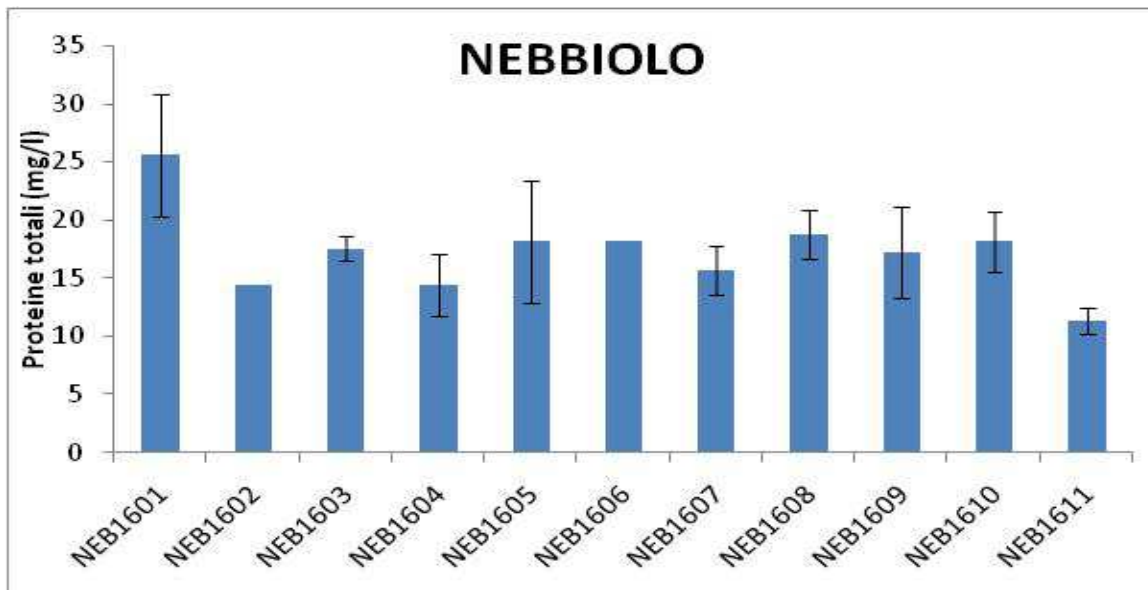


Figura 7.2 - 07 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Nebbiolo (mg/l).

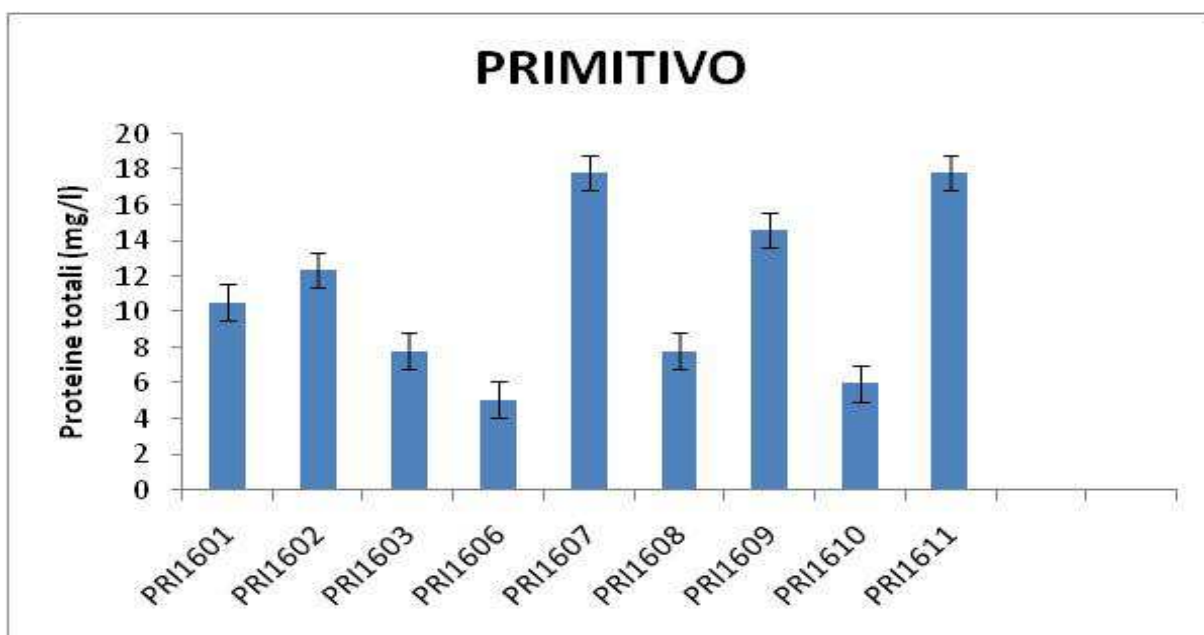


Figura 7.2 - 08 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Primitivo (mg/l).

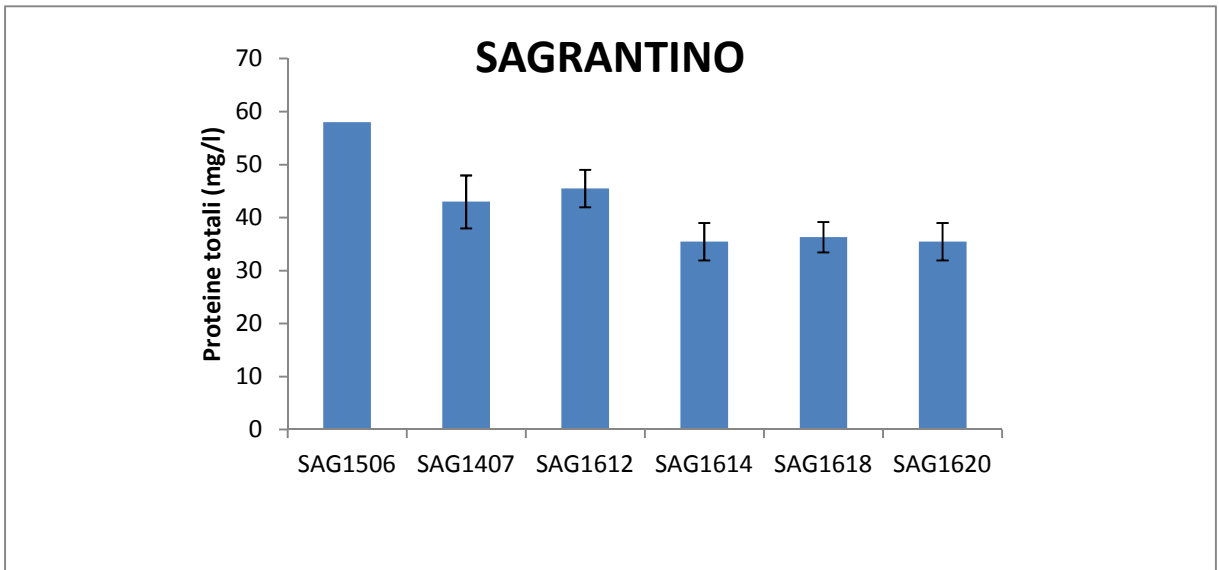


Figura 7.2 - 09 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Sagrantino (mg/l).

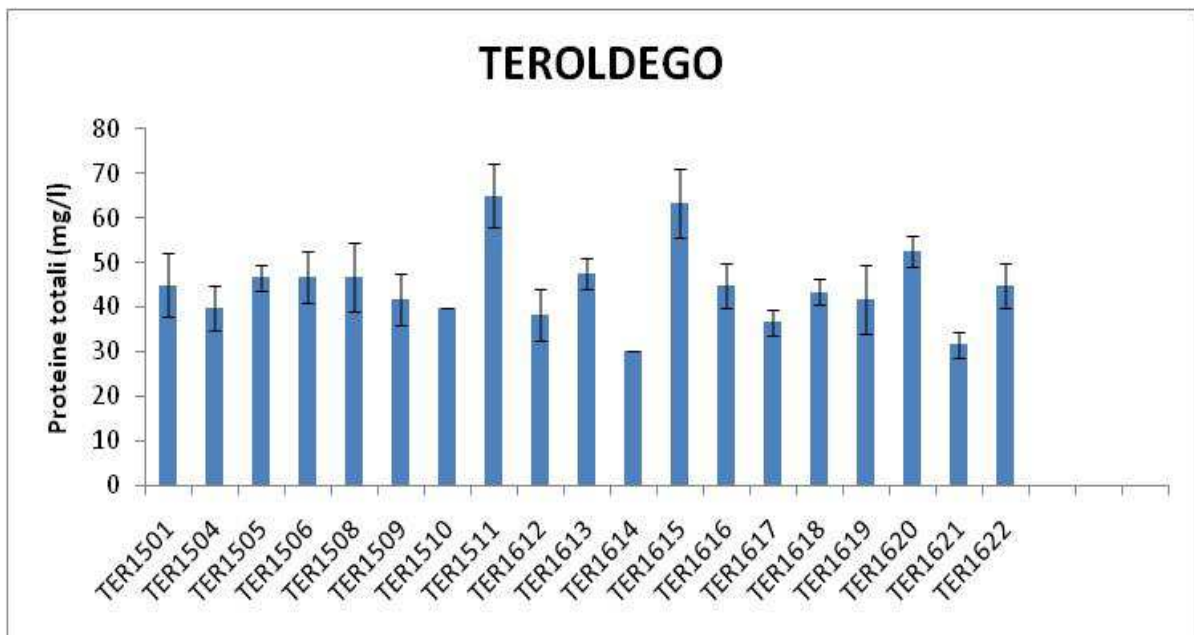


Figura 7.2 - 10 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Teroldego (mg/l).

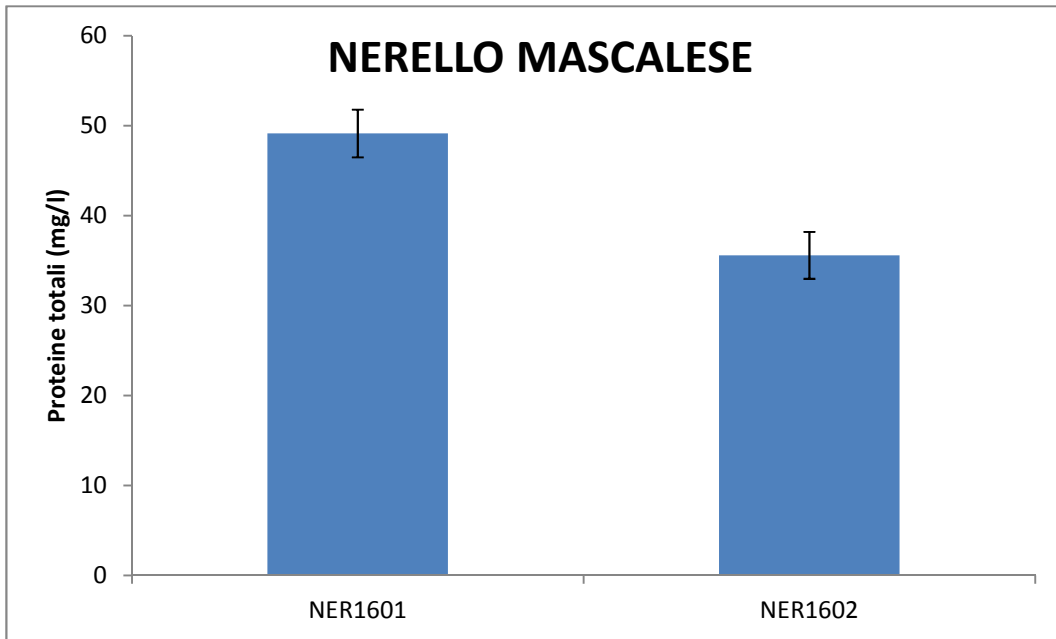


Figura 7.2 - 11 Diagramma a barre che riporta i valori medi delle proteine totali rilevate nei campioni di Nerello Mascalese (mg/l).

7.2.1) Vini rossi con valori di concentrazione proteica simili

Analizzando individualmente i grafici a barre dei vini con i risultati più simili, si può vedere che i campioni di Corvina (**Figura 7.2 - 02**) presentano valori molto vicini tra loro, i quali si attestano su una media di 100 mg/l di proteine totali, con un minimo di 93,2 mg/l ed un massimo di 114,2 mg/l. Per quanto riguarda il Montepulciano (**Figura 7.2 - 06**) e il Nebbiolo (**Figura 7.2 - 07**), rispettivamente la media si stabilisce intorno a 14 mg/l e 18,1 mg/l di proteine totali. Per il Montepulciano (**Figura 7.2 - 06**) il massimo raggiunge i 26,3 mg/l, mentre per il Nebbiolo (**Figura 7.2 - 07**) arriva a 25,5 mg/l.

Nel caso del vino Primitivo, (**Figura 7.2 - 08**) si evidenzia una similitudine sia per i valori minimi, che si attestano tra 5,1 e 7,8 mg/l, sia per i massimi, in quanto i

campioni che presentano i quantitativi maggiori si concentrano tra i 12 e i 17,8 mg/l di proteine totali.

Per il vino Teroldego (**Figura 7.2 - 10**) la maggior parte dei campioni presentano risultati simili che vanno da 45 a 47,5 mg/l, ma si evidenzia anche la presenza di un picco di concentrazione pari a 65 mg/l ed un minimo di 30 mg/l.

Per concludere, nel caso del Nerello Mascalese (**Figura 7.2 - 11**) c'erano a disposizione solamente tre campioni di cui uno non è stato quantificato, mentre negli altri due campioni sono state identificate quantità di proteine totali da 35,6 mg/l a 49,1 mg/l.

7.2.2) Vini rossi con valori di concentrazione proteica variabili

Tra i vini con concentrazione proteica con più variabilità intra-varietale si evidenzia dai grafici individuali il Sangiovese (**Figura 7.2 - 03**), che nelle concentrazioni minime varia da 1,5 a 16,3 mg/l, mentre nelle massime va da 39,6 a 153,3 mg/l. Si deduce anche dal Box Plot (**Figura 7.1 - 01**) che la variabilità maggiore risiede nei valori massimi.

Anche l'Aglianico (**Figura 7.2 - 04**), presenta una notevole variabilità nei risultati, dove il minimo raggiunge i 18,1 mg/l e il massimo arriva a 122,8 mg/l di proteine totali.

Tra i campioni di Cannonau (**Figura 7.2 - 05**) invece si nota una grande differenza tra i valori minimi, che vanno da 1,7 a 6,7 mg/l e le concentrazioni maggiori che variano da 36,9 a 68,6 mg/l.

Infine nel Sagrantino (**Figura 7.2 - 09**), si trovano valori minimi molto simili, che vanno da 35,5 a 36,3 mg/l, mentre si osserva una maggiore variabilità nelle concentrazioni superiori, che vanno da 43 a 58 mg/l.

7.3) CONTENUTO IN POLISACCARIDI TOTALI

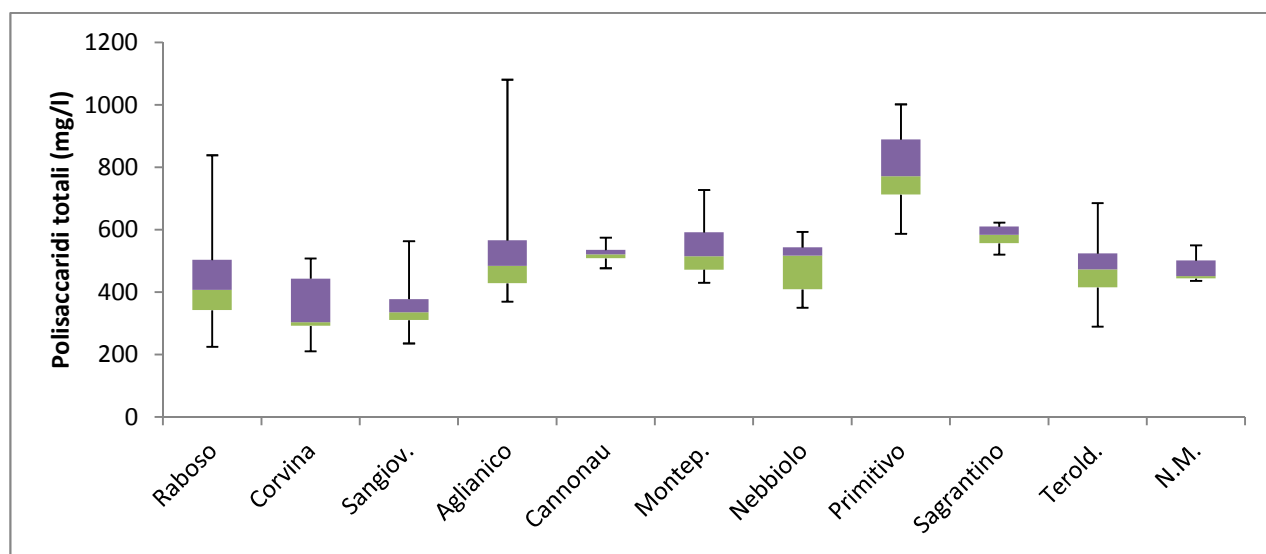


Figura 7.3 - 01 Grafico aggregato (Box Plot) che riporta i dati della concentrazione media dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di vino rosso italiano (mg/l).

Dal grafico Box Plot (**Figura 7.3 - 01**) che riunisce i dati aggregati delle concentrazioni medie dei polisaccaridi totali presenti nei vini rossi analizzati, si può notare come il vino Primitivo presenti il contenuto medio più alto, che raggiunge i 794 mg/l, mentre il Corvina presenti il contenuto medio più basso, il quale arriva ad 351 mg/l di polisaccaridi totali.

La media complessiva di tutti i campioni è risultata essere pari a 495 mg/l di polisaccaridi totali. Di conseguenza, è stata evidenziata un'elevata variabilità tra le concentrazioni minime e massime dei polisaccaridi rilevate in soluzione, le quali variano da 350 mg/l, fino a picchi intorno ai 1000 mg/l, un fatto probabilmente dovuto sia a caratteristiche genetiche che a differenze in fase di

vinificazione, con tecniche in grado di estrarre più o meno polisaccaridi collocati prevalentemente nelle bucce d'uva.

Si può osservare dal Box Plot (**Figura 7.3 - 01**) come la variabilità dei dati sia più marcata per le concentrazioni superiori rispetto a quelle inferiori, con l'eccezione del Sagrantino dove la maggiore differenza si nota nei valori più bassi della mediana.

7.4) GRAFICI INDIVIDUALI POLISACCARIDI TOTALI

Nel paragrafo successivo verranno analizzati i grafici individuali dei campioni che hanno mostrato le differenze più significative (**Figure da 7.4 01 - 11**).

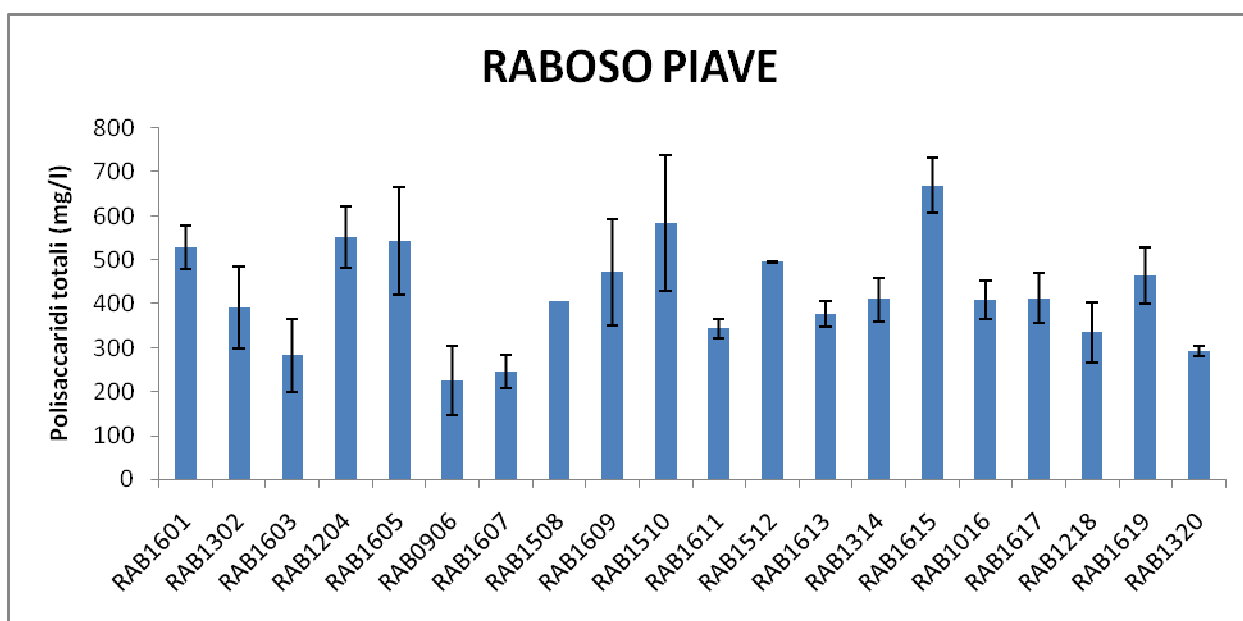


Figura 7.4 - 01. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Raboso Piave (mg/l).

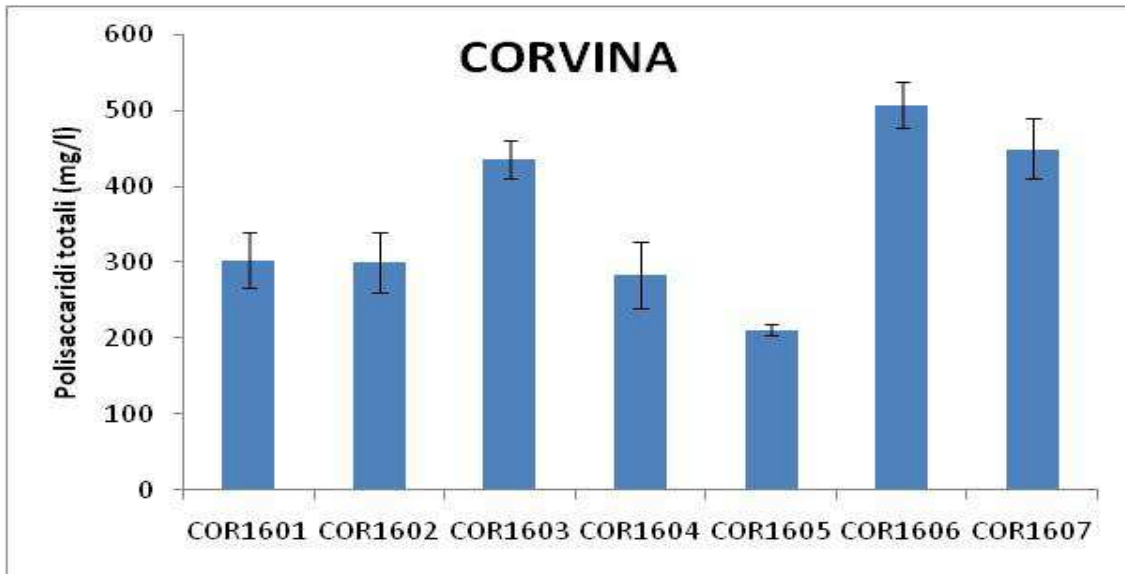


Figura 7.4 - 02. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Corvina (mg/l).

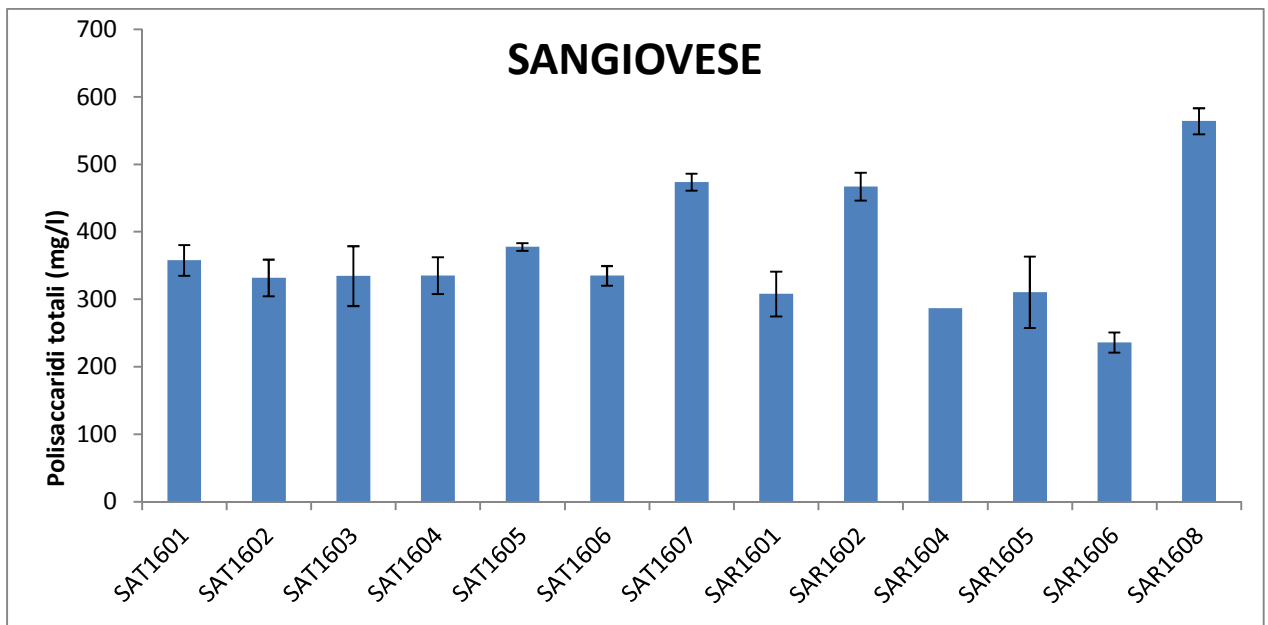


Figura 7.4 - 03. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Sangiovese (mg/l).

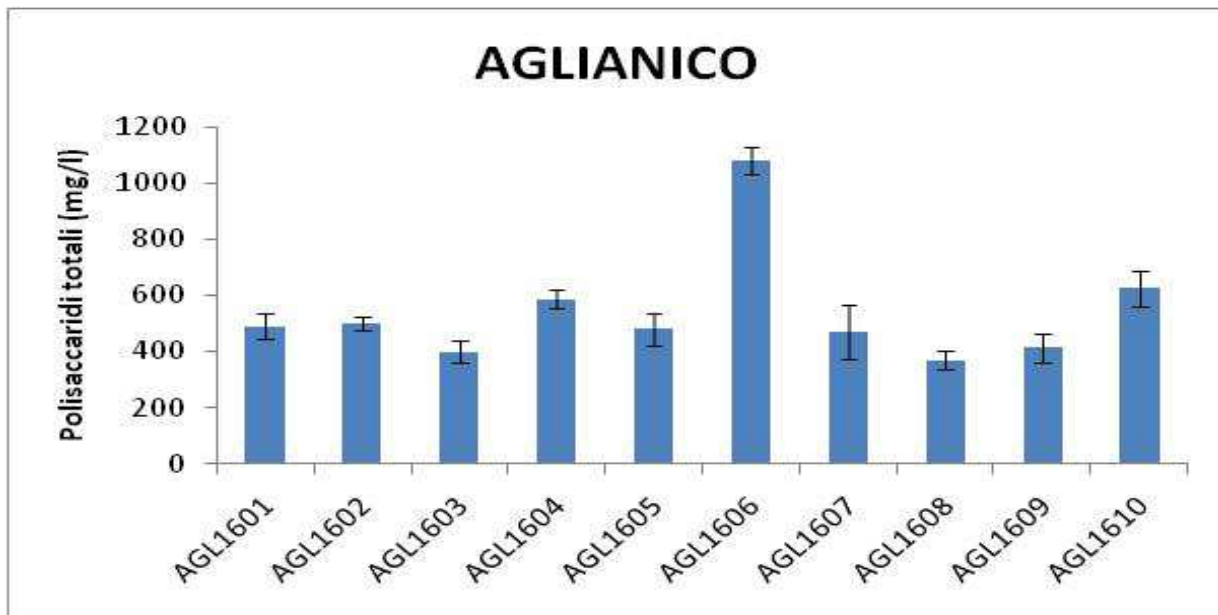


Figura 7.4 - 04. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Aglianico (mg/l).

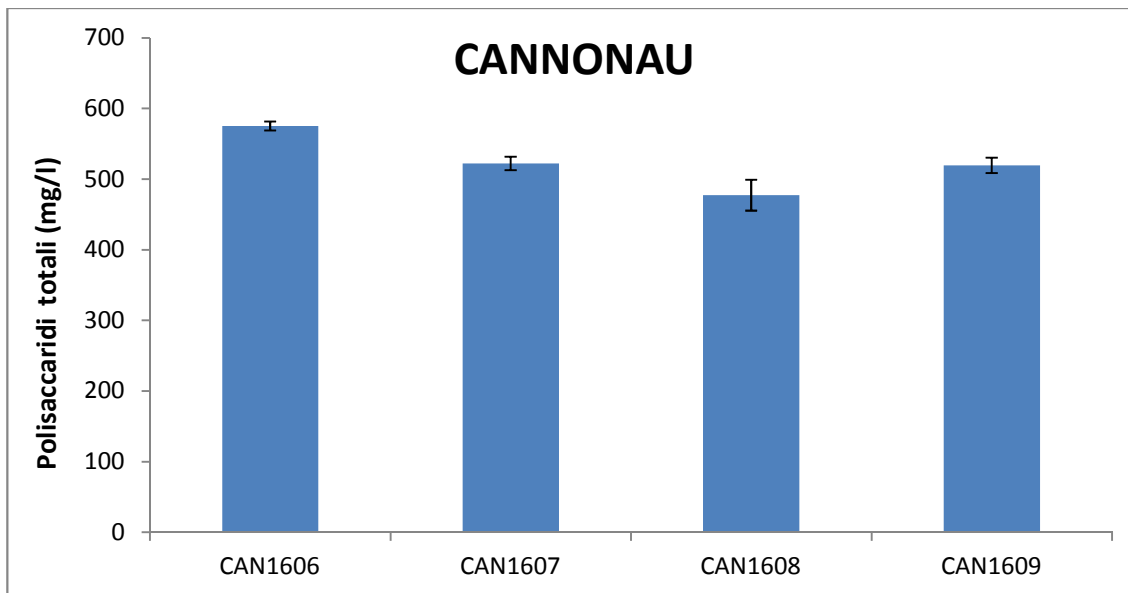


Figura 7.4 - 05. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Cannonau (mg/l).

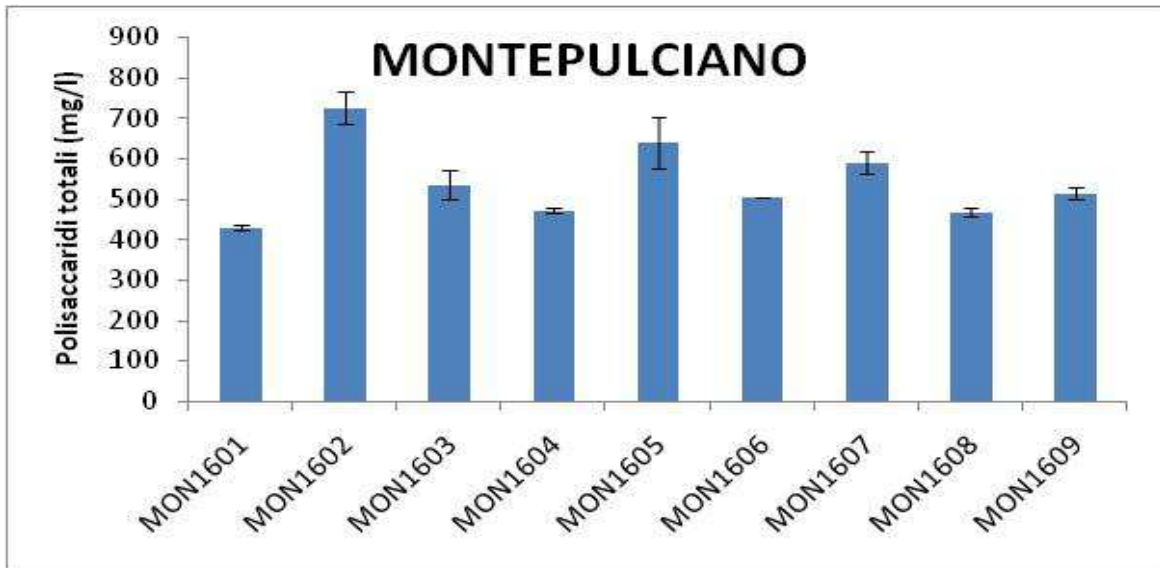


Figura 7.4 - 06. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Montepulciano (mg/l).

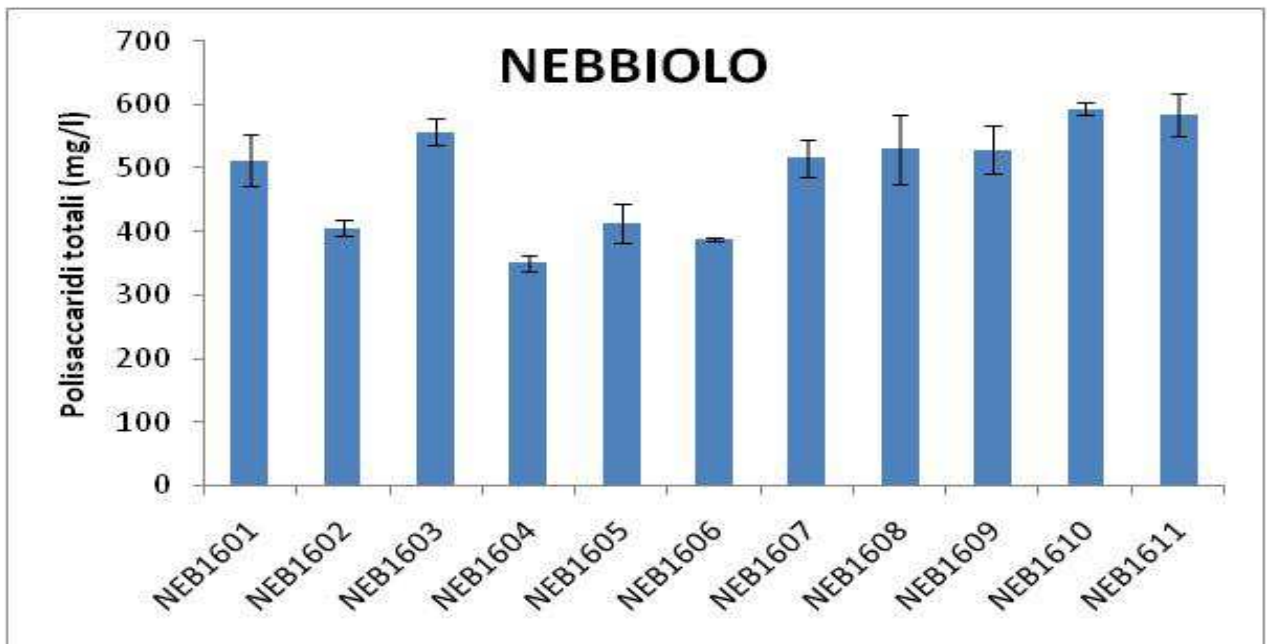


Figura 7.4 - 07. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Nebbiolo (mg/l).

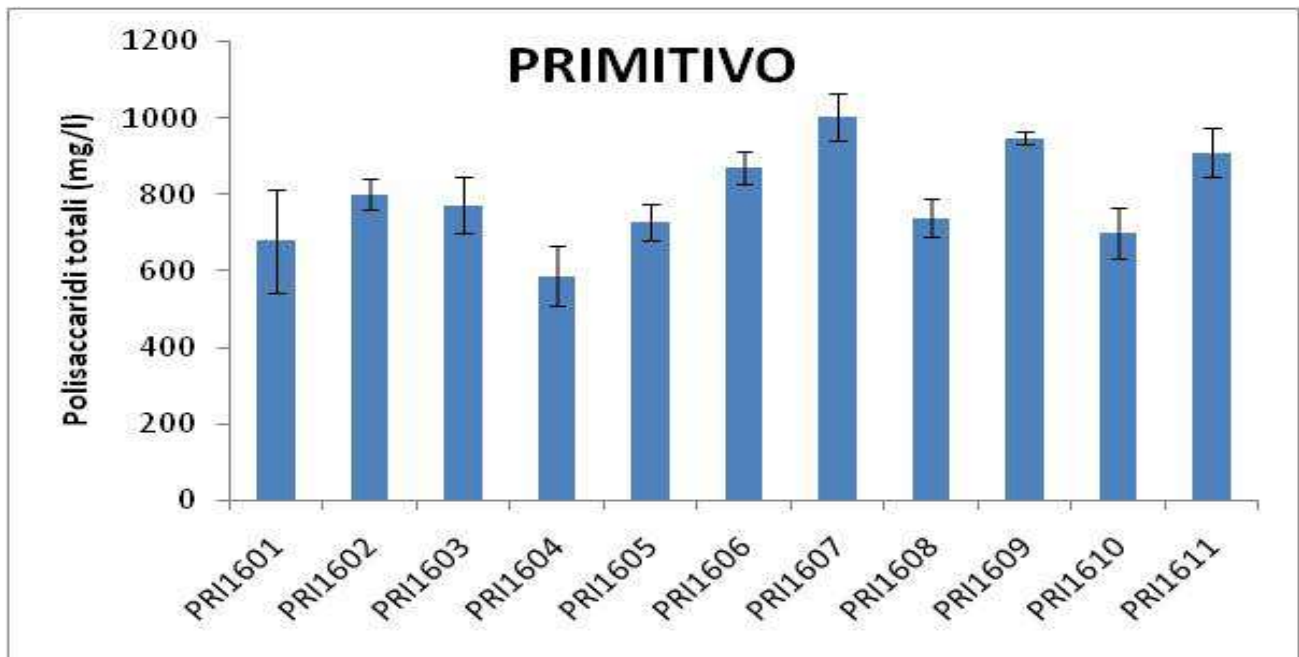


Figura 7.4 - 08. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Primitivo (mg/l).

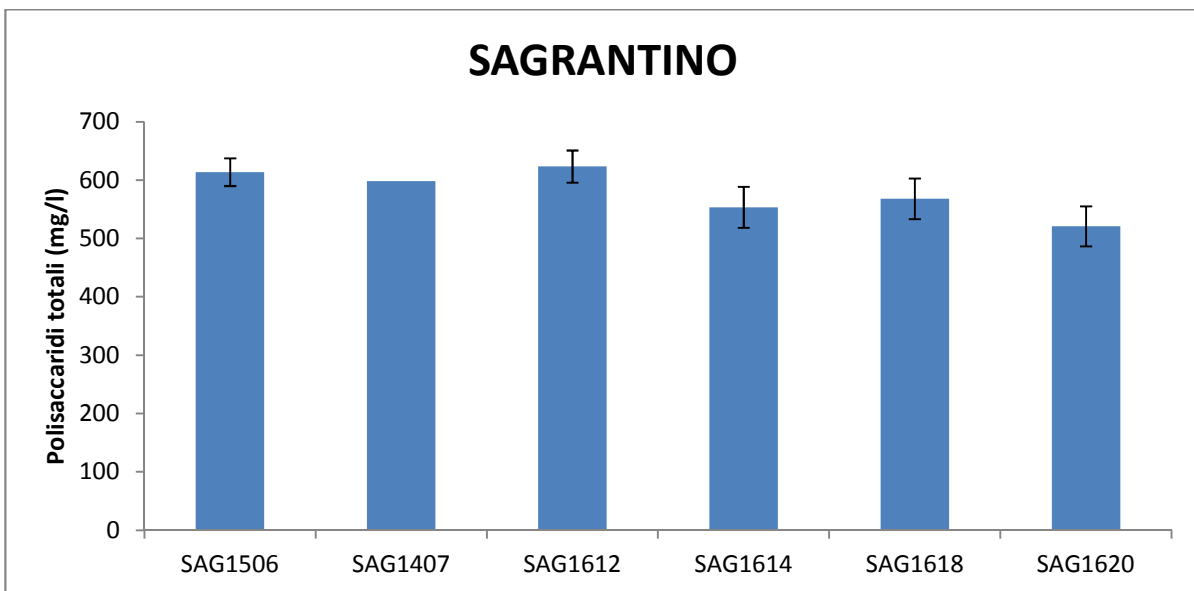


Figura 7.4 - 09. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Sagrantino (mg/l).

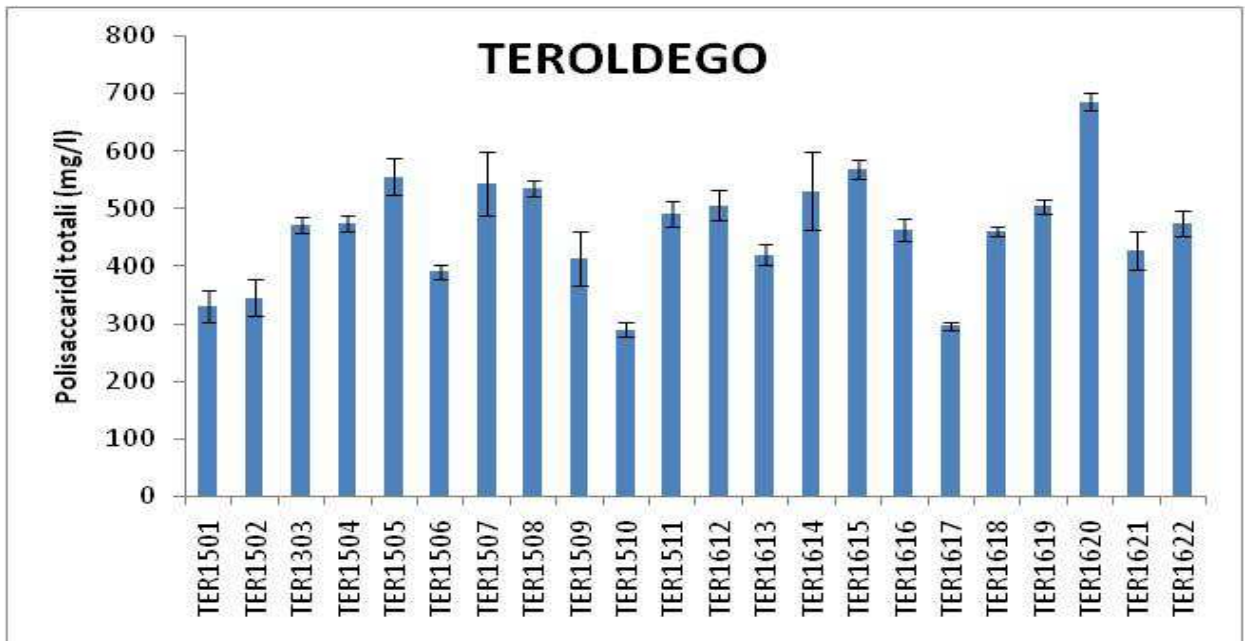


Figura 7.4 - 10. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Teroldego (mg/l).

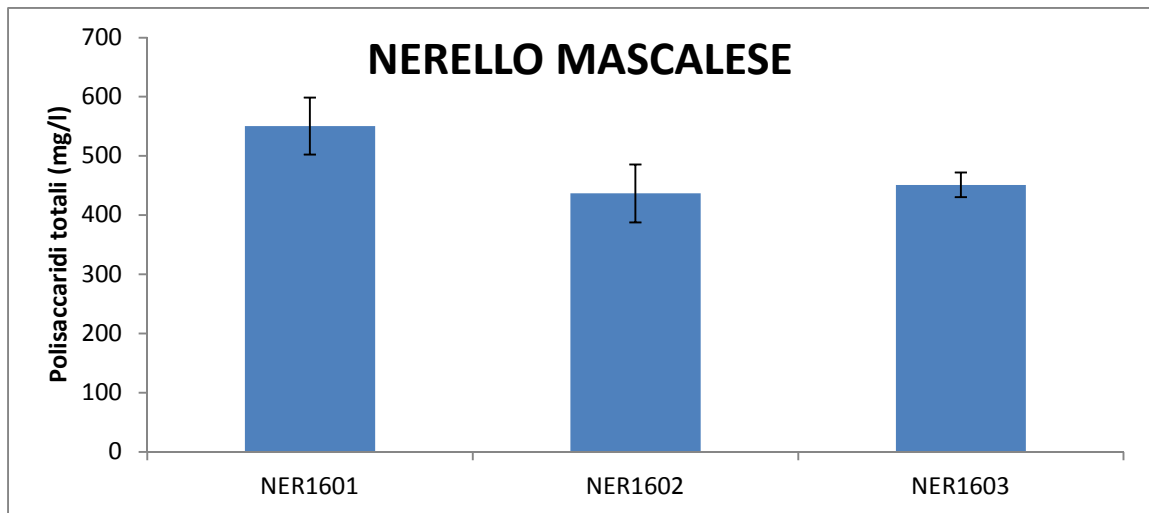


Figura 7.4 - 11. Diagramma a barre che riporta i valori medi dei polisaccaridi totali rilevati nei campioni di Nerello Mascalese (mg/l).

Dai grafici individuali a barre, viene evidenziato che il Primitivo (**Figura 7.4 - 08**) presenta i valori medi di polisaccaridi più alti in soluzione, attestandosi intorno a 800 mg/l, mentre un campione raggiunge una concentrazione di 1 g/l, che è un valore di concentrazione polisaccaridica notevole da ritrovare in un vino.

Il vino Nebbiolo (**Figura 7.4 - 07**) invece presenta dei valori di polisaccaridi medi, intorno a 490 mg/l.

Nel vino Corvina infine (**Figura 7.4 - 02**), si trova una concentrazione polisaccaridica bassa, intorno a 351 mg/l, tuttavia all'interno del set è stato individuato anche un campione che in soluzione raggiunge valori di polisaccaridi pari a 500 mg/l.

7.5) INDICE DI BSA

Di seguito vengono riportati i valori ottenuti dal test della BSA messo a punto in questa tesi (**Fig. 7.5 – 01**). A valori più elevati corrisponde una maggiore presenza in sostanza in grado di legarsi ad una proteina standard (BSA) e quindi una maggiore astringenza dovuta ad un maggiore contenuto in tannini, ovvero le sostanze reattive alla BSA.

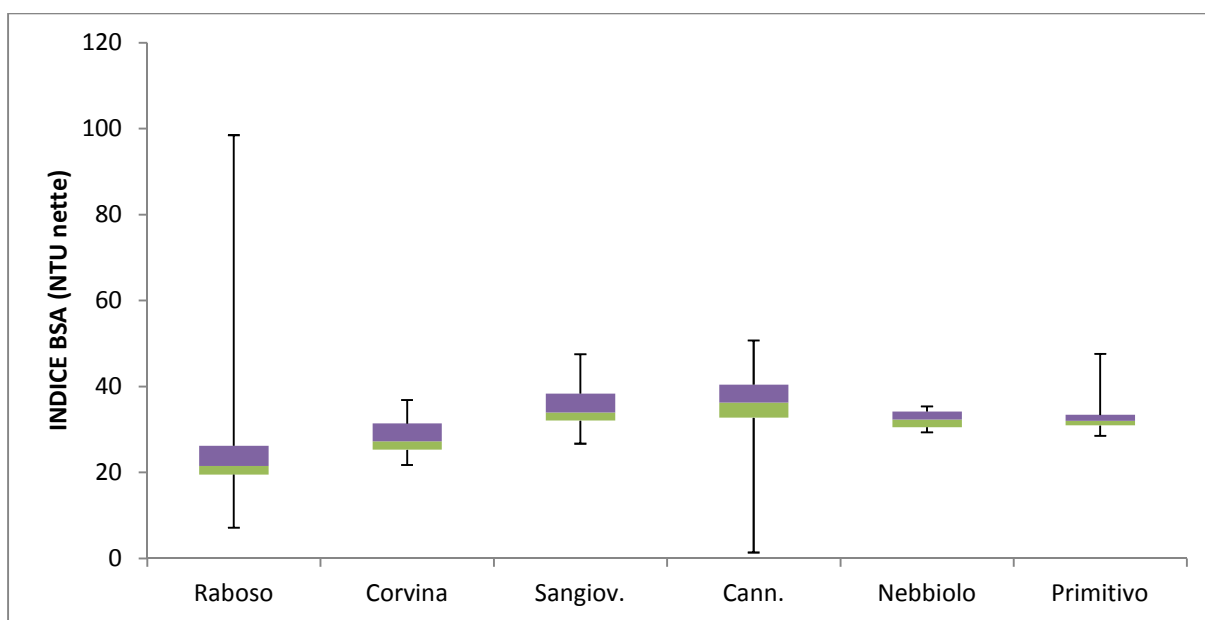


Figura 7.5 - 01 Grafico aggregato (Box Plot) che riporta i dati medi della reattività dei tannini alla BSA, espressi come Indice BSA (NTU nette), rilevati nei campioni di vino rosso italiano. NTU nette: Unità Nefelometriche Turbidimetriche Nette.

Dal Box Plot (**Figura 7.5 - 01**), si può notare che il Raboso Piave è il vino che raggiunge il valore di torbidità più alta dopo aggiunta di BSA (98,5 NTU per un campione), ma che mediamente ha presentato i valori più bassi. In media il vino che presenta valori più alti è il Cannonau (33 NTU). La media complessiva

di tutti i vini analizzati ha indicato una torbidità pari a 31,3 NTU, quindi con una variabilità fra campioni abbastanza contenuta rispetto agli parametri analizzati in questa tesi. Osservando il grafico risulta chiara la marcata variabilità nei valori massimi dei vini Raboso Piave e Primitivo, mentre una speculare differenza si nota nel caso dei campioni di Cannonau per i valori minimi. Altri vini quali il Corvina, il Sangiovese e il Nebbiolo al contrario, hanno mostrato un'evidente simmetria tra gli estremi nel Box Plot (**Figura 7.5 - 01**), fatto che indica un comportamento molto simile dei campioni testati e quindi una scarsa variabilità intra-varietale per questo parametro.

Queste diversità verranno approfondite in maniera più specifica analizzando i grafici individuali a barre dei vini nel paragrafo successivo.

7.6) GRAFICI INDIVIDUALI INDICE BSA

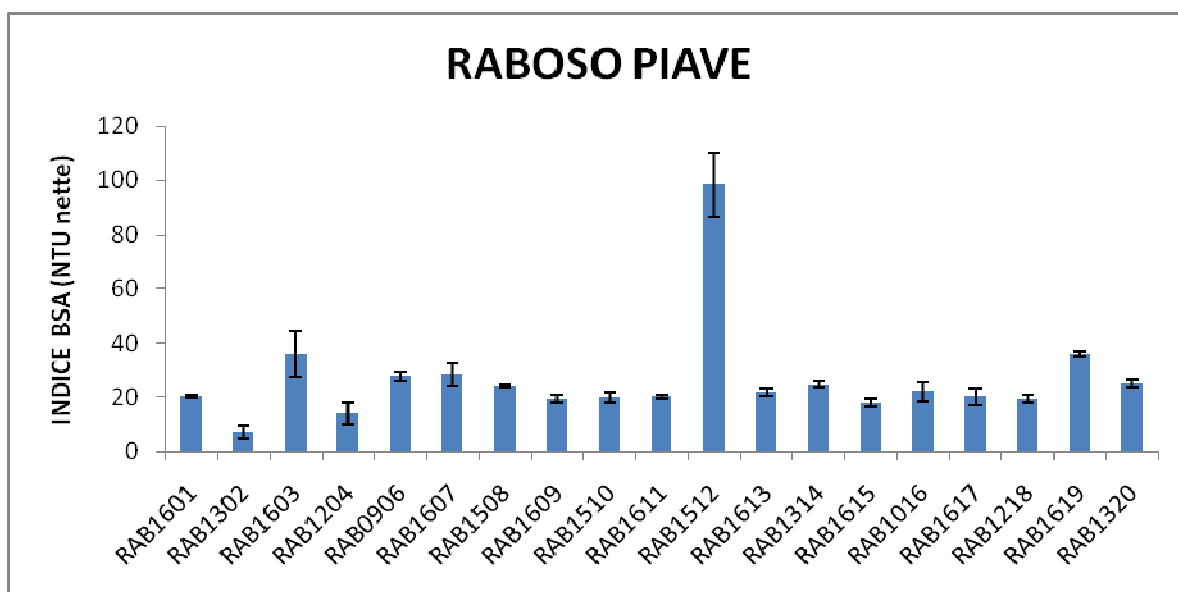


Figura 7.6 - 01. Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Raboso Piave.

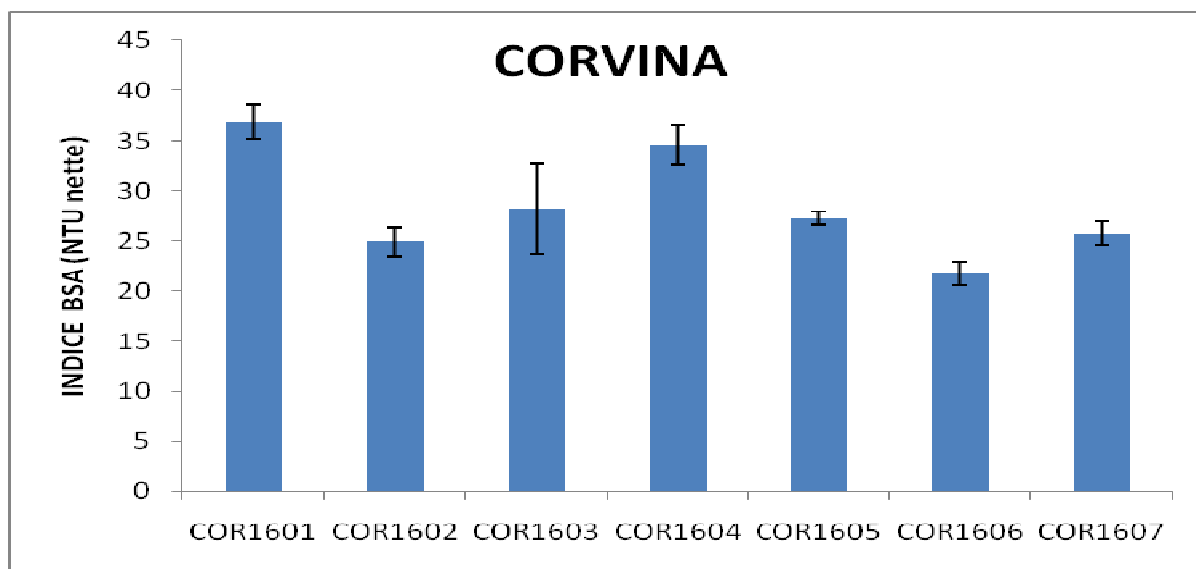


Figura 7.6 - 02. Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Corvina.

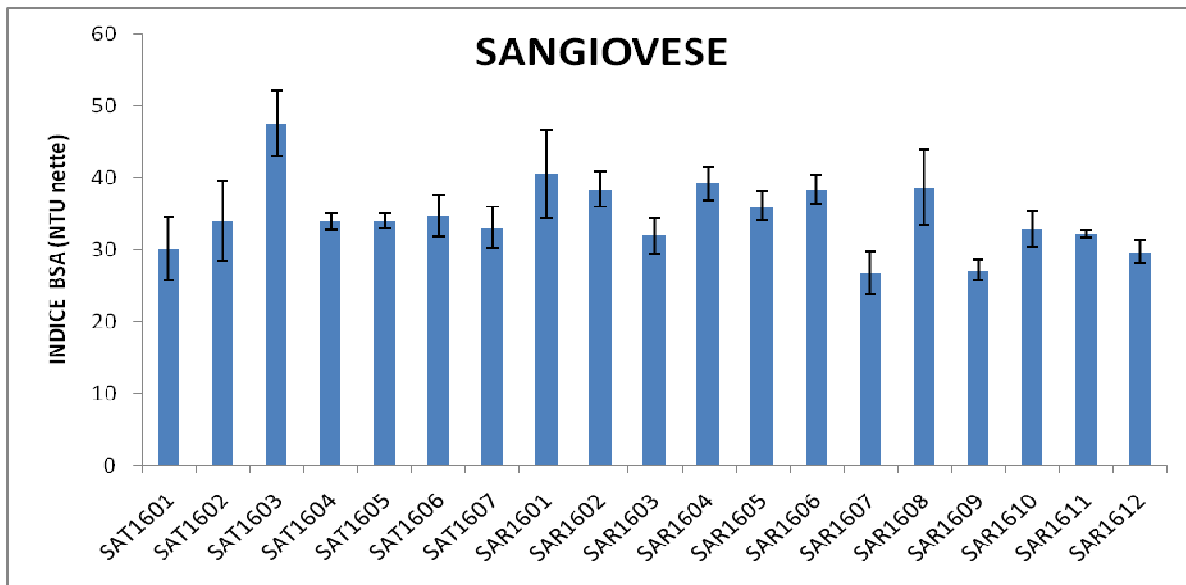


Figura 7.6 - 03. Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Sangiovese.

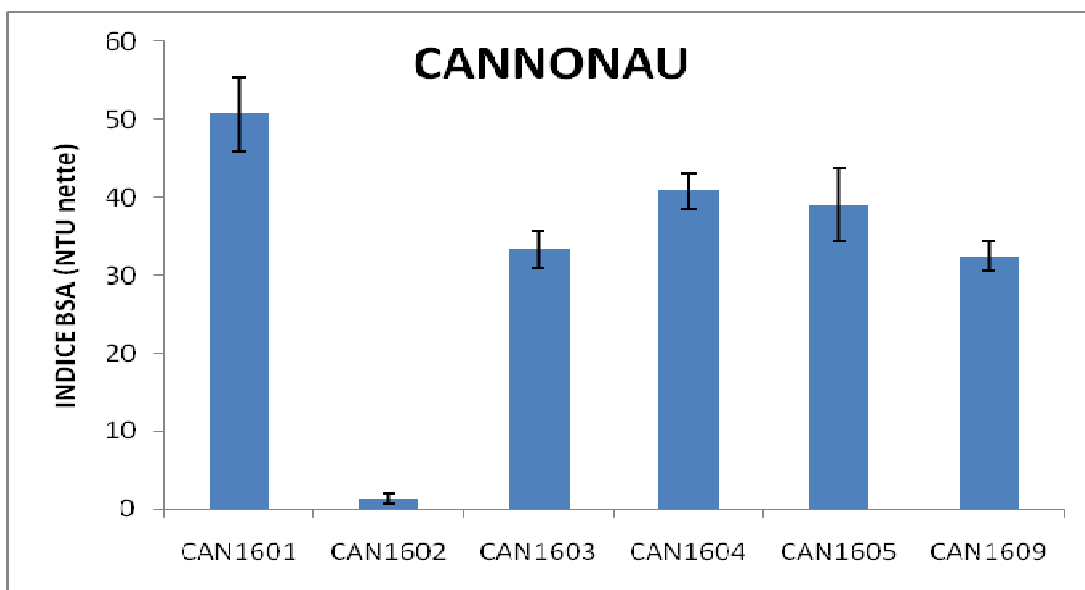


Figura 7.6 - 04. Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Cannonau.

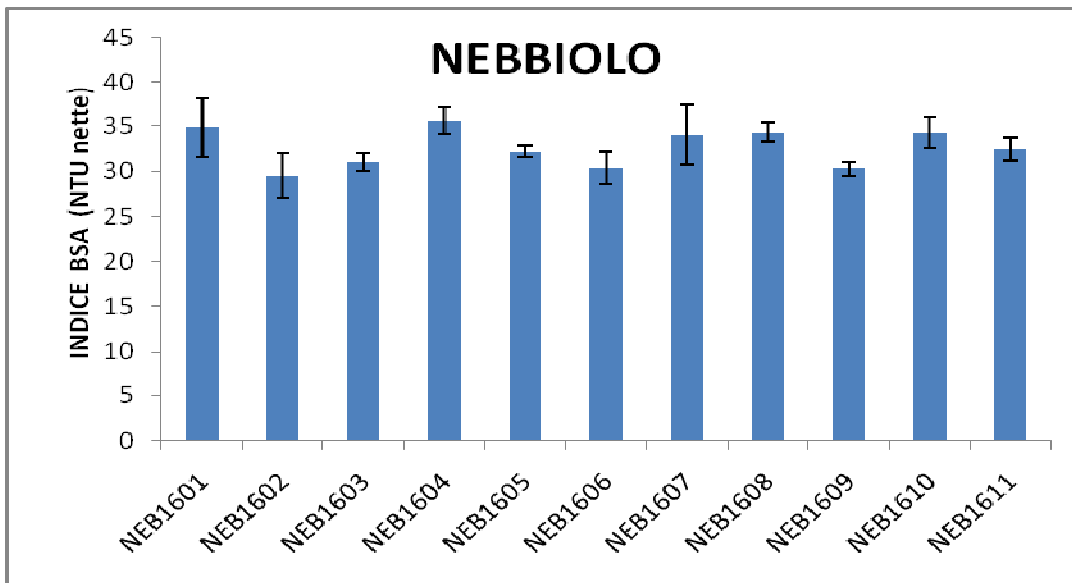


Figura 7.6 - 05. Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Nebbiolo.

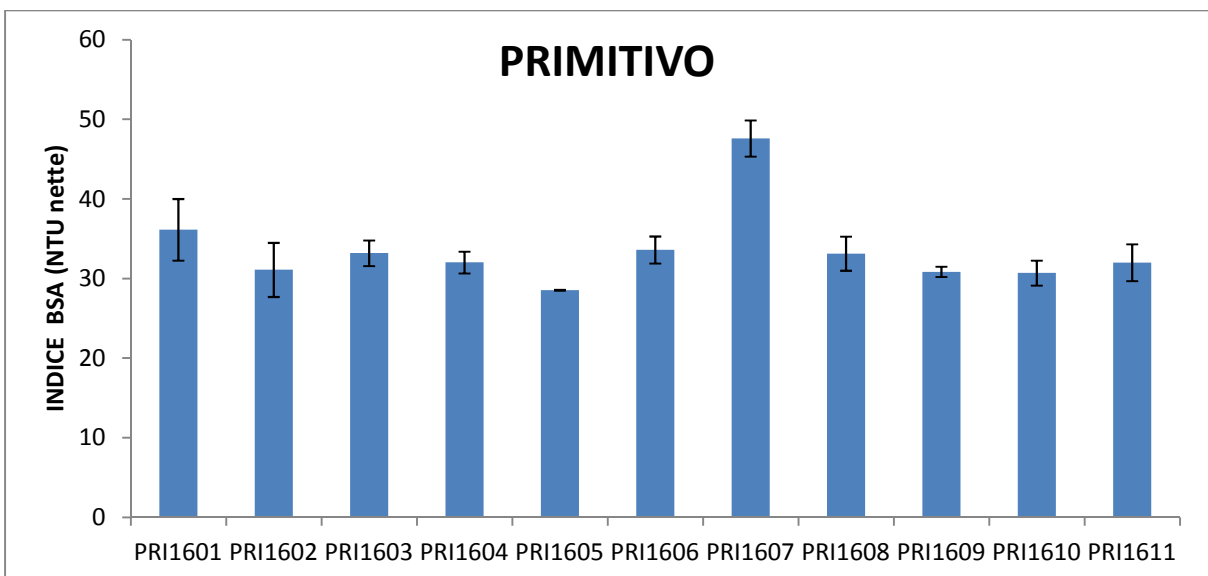


Figura 7.6 - 06 Diagramma a barre che riporta i valori medi di reattività dei tannini alla BSA (Indice BSA - NTU nette), rilevati nei campioni di Primitivo.

Dai grafici individuali si può subito notare come i valori di torbidità del Raboso Piave (Figura 7.6 - 01) si concentrino in una fascia di valori intorno ai 20 - 40

NTU, con un massimo di 98,5 NTU che fa aumentare sensibilmente la differenza nei valori massimi.

Il Primitivo (**Figura 7.6 - 06**) si comporta in maniera simile al Raboso, in quanto la media si attesta tra 30 e 36 NTU, tuttavia si riscontra un valore massimo di 47,6 NTU che amplia il range di variabilità tra le torbidità maggiori.

Nel caso del Cannonau (**Figura 7.6 - 04**), come accennato dal Box Plot (**Figura 7.5 - 01**), si nota invece una grande differenza nei valori, con un minimo pari a 1,4 NTU e una media che invece varia tra 40 e 50 NTU.

Per quanto riguarda i campioni di vino che hanno mostrato valori di torbidità simili tra loro, sono stati individuati il Corvina (**Figura 7.6 - 02**), con una media di 28,4 NTU, il Sangiovese (**Figura 7.6 - 03**) con un contenuto medio di 34,6 NTU e il Nebbiolo (**Figura 7.6 - 05**) con una media di 32,6 NTU.

7.7) CORRELAZIONI

In questo paragrafo verranno analizzati i grafici sulla correlazione tra Proteine e Polisaccaridi Totali e Indice BSA, che esprime la reattività dei tannini con la proteina BSA nei vini rossi considerati nella tesi, allo scopo di verificarne il livello d'interazione in soluzione.

7.7.1) Correlazione Proteine totali (mg/l) - Polisaccaridi Totali (mg/l)

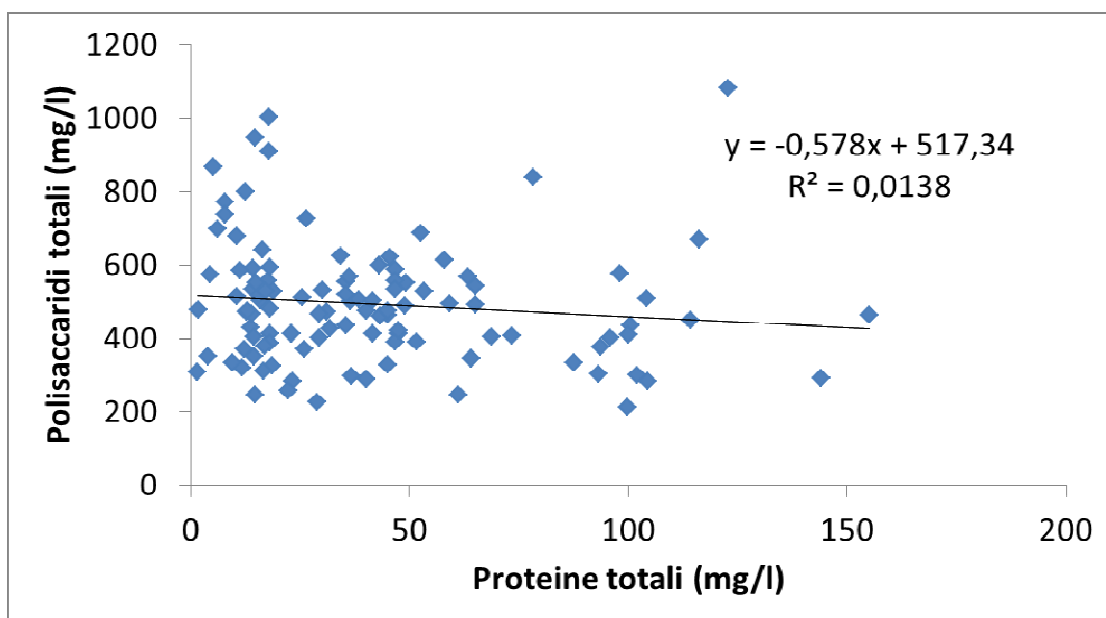


Figura 7.7.1 - 01 Correlazione tra Proteine Totali (mg/l) e Polisaccaridi Totali (mg/l) vini rossi italiani

Dal grafico che mette in relazione le Proteine Totali (mg/l) in ascissa e i Polisaccaridi Totali (mg/l) in ordinata (**Figura 7.7.1 - 01**), si nota innanzitutto un basso coefficiente di correlazione pari a $R^2 = 0,0138$ e un'elevata dispersione dei dati. La retta interseca un limitato range di valori e presenta una pendenza

negativa, ad indicare chiaramente che tra proteine e polisaccaridi, considerati nel loro complesso, esiste una debole interazione in soluzione.

7.7.2) Correlazione Proteine totali (mg/l) - Indice BSA (NTU nette)

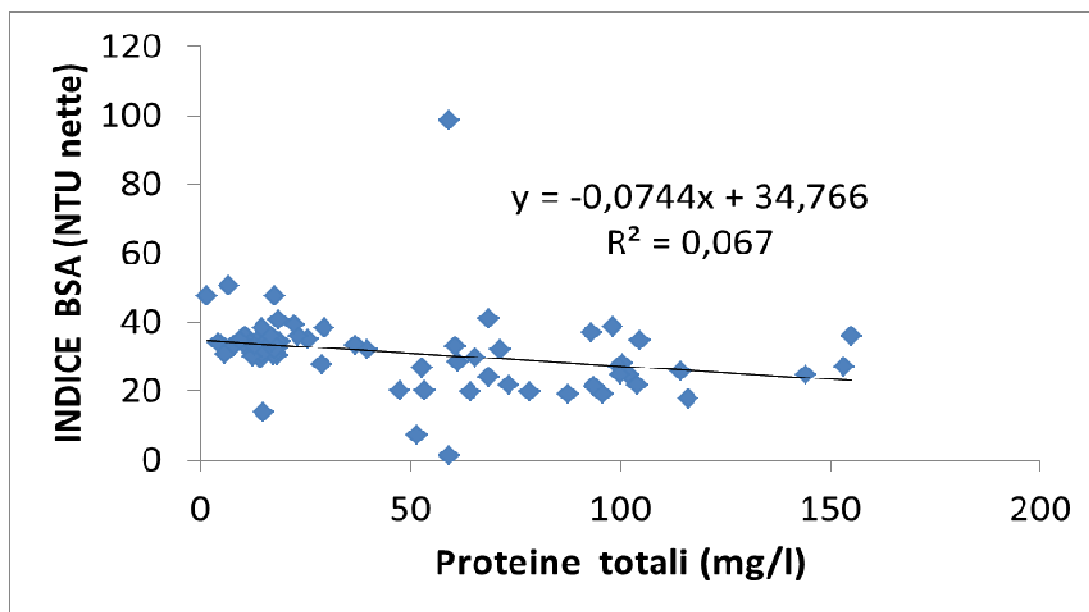


Figura 7.7.2 - 01 Correlazione tra Proteine Totali (mg/l) e Indice BSA (NTU nette) vini rossi italiani

Nel caso della correlazione tra Proteine Totali (mg/l) in ascissa e Indice BSA (NTU nette) in ordinata (**Figura 7.7.2 - 01**), si osserva una minore dispersione dei dati dei campioni rispetto al grafico precedente. Tuttavia il coefficiente di correlazione rimane basso, pari a $R^2 = 0,067$ e la pendenza anche in questo contesto si mostra negativa, confermando l'assenza di interazioni stabili tra proteine e polifenoli totali in soluzione.

7.7.3) Correlazione Polisaccaridi Totali (mg/l) - Indice BSA (NTU nette)

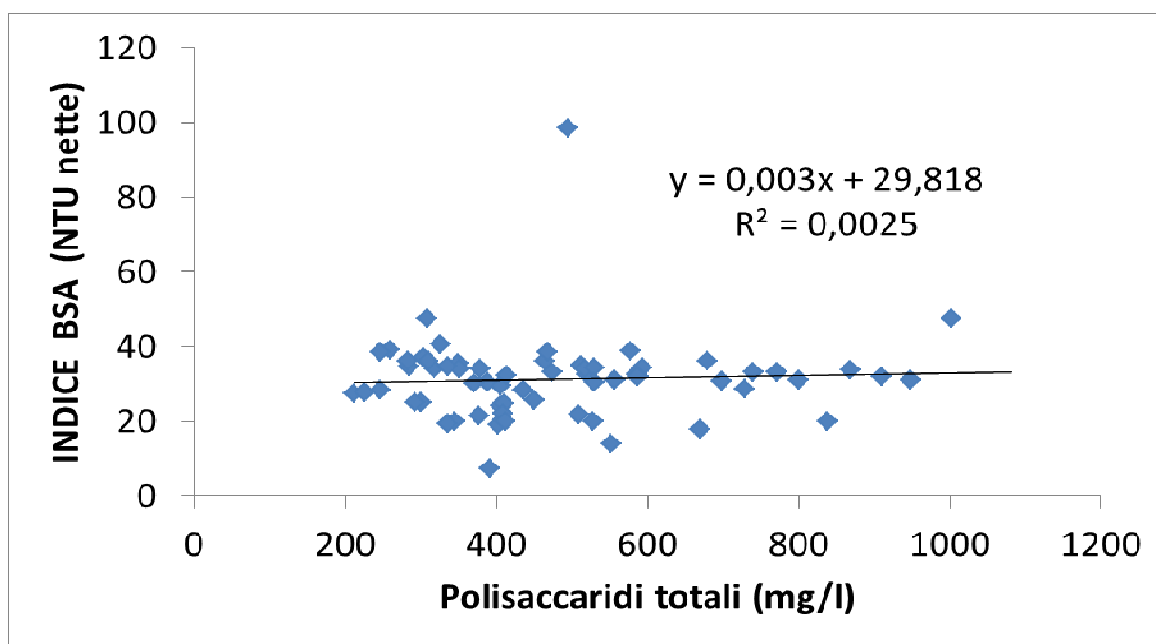


Figura 7.7.3 - 01 Correlazione tra Polisaccaridi Totali (mg/l) e Indice BSA (NTU nette) vini rossi italiani

Interazioni ancora meno significative si osservano dal grafico che relaziona i Polisaccaridi Totali (mg/l) in ascissa con l'Indice BSA (NTU nette), in ordinata (**Figura 7.7.3 - 01**). Infatti, anche se la pendenza della retta è positiva e i valori si distribuiscono in maniera più uniforme nell'intervallo considerato in confronto alle correlazioni precedenti, il coefficiente di correlazione si presenta estremamente basso, precisamente uguale a $R^2 = 0,0025$.

Dalle considerazioni esposte sopra, si può concludere che relazionare i quantitativi totali di proteine e polisaccaridi e l'Indice di BSA, ha permesso di affermare che non sussistono interazioni significative in termini di forza e stabilità tra le principali categorie di macromolecole del vino rosso nell'ambito dei campioni analizzati nel progetto PRIN. Rimangono comunque da indagare le

modalità con cui queste molecole, considerate nell'insieme, entrano in contatto con le proteine salivari al momento dell'assaggio del vino e modulano l'astringenza percepita da parte dei consumatori. È possibile che alcune delle correlazioni che, secondo alcuni autori (Quijada-Morín et al., 2014) dovrebbero sussistere, possano essere trovate quantificando separatamente le classi di macromolecole anziché il loro contenuto totale. Infatti, alcune classi quali una determinata proteina o una classe polisaccaridica potrebbero correlare con parametri legati all'astringenza quali l'indice di BSA o altri. È stato dimostrato da Quijada-Morín et al. 2014, che tutte le classi di polisaccaridi hanno la capacità di diminuire l'astringenza percepita, con un effetto maggiore da parte ramnagalatturonani di tipo II e delle mannoproteine, due dei composti che dovranno essere quantificati in futuro nel set di vini analizzati in questa tesi.

7.8) STABILITÀ COLLOIDALE

L'equilibrio colloidale dei vini rossi è determinato principalmente dalla presenza in soluzione di concentrazioni di tannini più o meno elevate, i quali nel tempo tendono a reagire sia con altre molecole della stessa origine, venendo quindi coinvolti in un fenomeno di auto - aggregazione, sia con gli altri componenti macromolecolari del vino, come ad esempio le proteine e i polisaccaridi. Questo fenomeno d'interazione è complesso e porta alla graduale formazione di torbidità e precipitati che possono diminuire nel tempo la qualità e l'accettabilità del prodotto finito.

Nell'ambito della tesi, per verificare l'instabilità colloidale nei vini rossi italiani, sono stati scelti i campioni di Raboso Piave come riferimento in quanto su

questo vino si è evidenziata una grande variabilità sia nei valori di concentrazione proteica e polisaccaridica (**Figure 7.1 - 01; 7.3 -01**).

Per le proteine totali in soluzione sono stati riscontrati valori che vanno da 15 a 155 mg/l (**Figura 7.2 - 01**). Per quanto riguarda i polisaccaridi totali invece, si va da un minimo di 225,4 ad un massimo di 838,9 mg/l (**Figura 7.4 - 01**).

Alla luce di queste notevoli differenze, dal diagramma a barre (**Figura 7.8 - 01**) che mostra i risultati dell'Heat Test (NTU nette) ottenuti sul Raboso Piave, si evidenziano campioni che hanno sviluppato una torbidità molto elevata e altri che hanno dato instabilità minima.

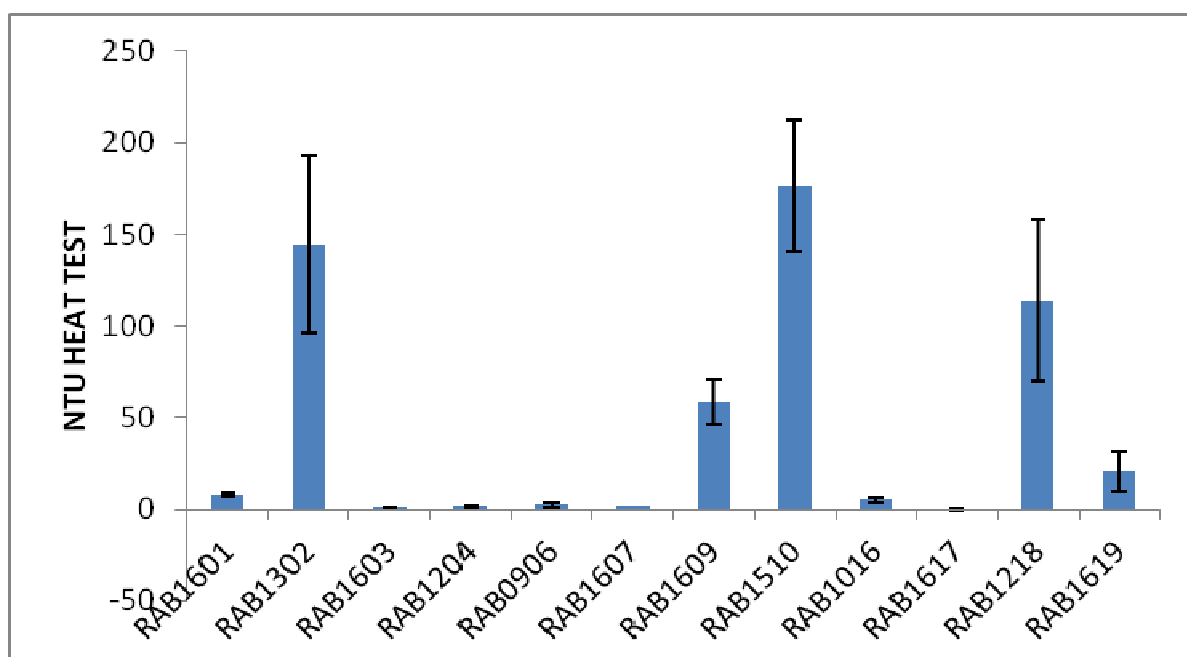


Figura 7.8 -01 Diagramma a barre che mostra i risultati dell'Heat Test svolto sul Raboso Piave (NTU).

Tuttavia, non necessariamente tutti i campioni che possiedono elevate concentrazioni di proteine e polisaccaridi corrispondono ad un'elevata formazione di torbidità in seguito al riscaldamento.

Inoltre, la variabilità nella stabilità colloidale dei campioni non può essere spiegata attraverso la correlazione con le proteine totali. Se si analizza il grafico che descrive la correlazione tra le Proteine Totali (mg/l) e la torbidità dopo l'Heat Test (NTU) eseguito sul Raboso Piave (**Figura 7.8 - 02**), si nota infatti come la correlazione tra queste due variabili sia molto bassa, con un coefficiente R^2 pari a 0,046.

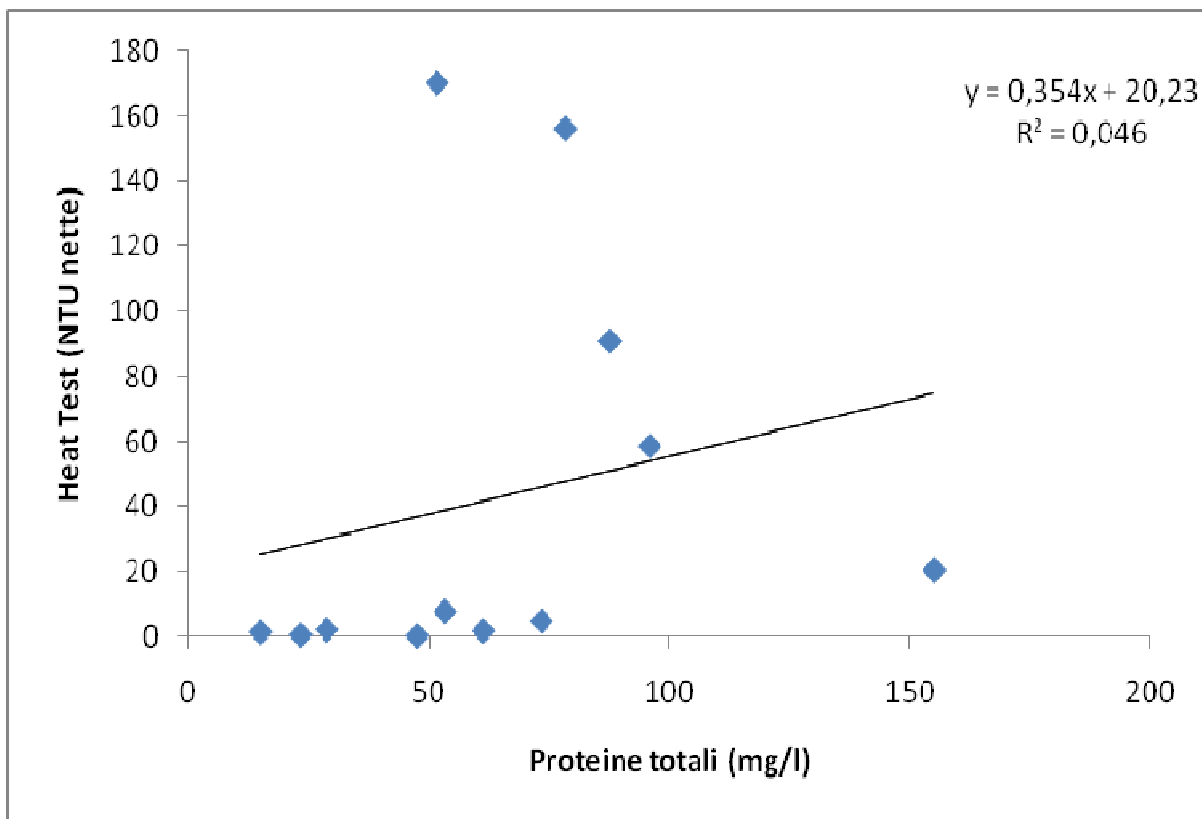


Figura 7.8. - 02. Correlazione Proteine Totali (mg/l) e Heat Test (NTU) Raboso Piave

Questo dato indica che la conoscenza del contenuto proteico totale non è un elemento sufficiente per poter prevedere con sicurezza l'andamento dell'instabilità proteica nei vini rossi italiani, perciò, per comprendere meglio quali fattori stiano alla base dell'instabilità colloidale, si è voluto approfondire anche il ruolo di altri componenti del vino quali i polisaccaridi.

Come si può notare dal grafico (**Figura 7.8 - 03**), anche la correlazione tra i Polisaccaridi Totali (mg/l) e l'Heat Test effettuato sul Raboso Piave (NTU), è piuttosto bassa. Infatti, il coefficiente R^2 raggiunge il valore di 0,196 e i dati presentano una grande dispersione.

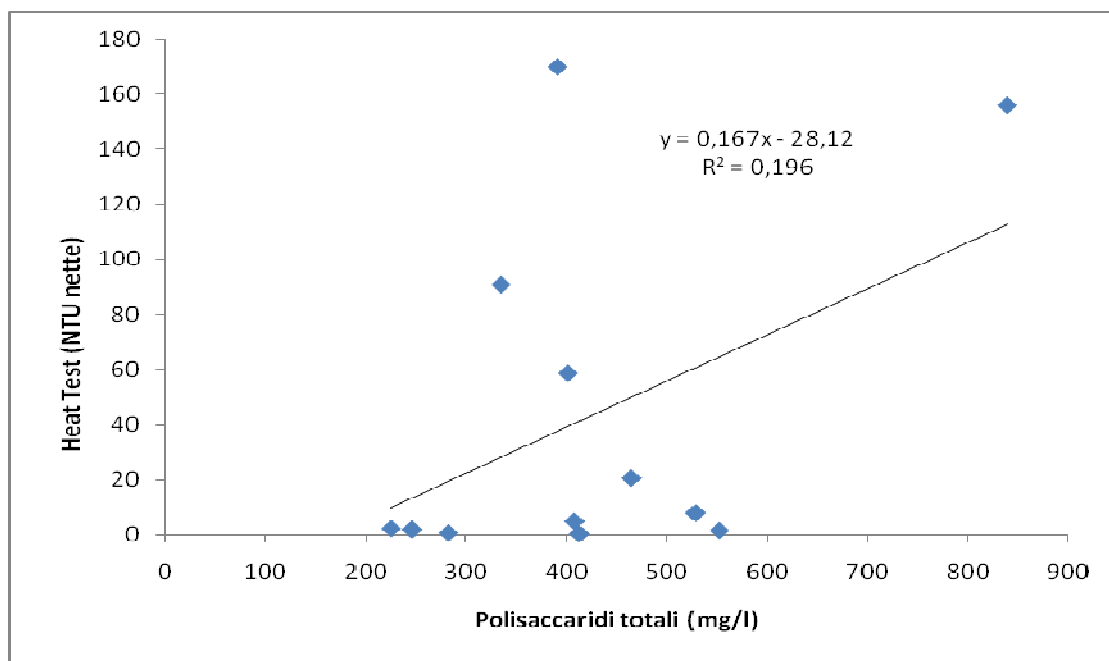


Figura 7.8 - 03 Correlazione tra Polisaccaridi Totali (mg/l) e Heat Test (NTU) Raboso Piave

Questa evidenza conferma la scarsa rappresentatività dei risultati ottenuti dal confronto delle quantità totali dei principali componenti presenti in soluzione nello stimare con sicurezza i reali meccanismi con cui essi provocano i fenomeni d'instabilità colloidale che diminuiscono nel tempo la qualità del vino rosso.

8) CONCLUSIONI

L'obiettivo del lavoro descritto in questa tesi, era quello di andare a verificare il livello d'interazione delle principali macromolecole presenti nel vino rosso e le possibili conseguenze sulla sua stabilità colloidale. A questo scopo è stata analizzata la composizione chimica di oltre cento campioni di vino rosso italiano, provenienti dalle regioni che possiedono il più ampio patrimonio viticolo ed enologico sul territorio nazionale. Inizialmente è stata quantificata la concentrazione totale di proteine e polisaccaridi e misurata la reattività dei tannini con la Sieroalbumina Bovina (BSA) in soluzione, poi, per analizzare l'equilibrio colloidale, i campioni sono stati sottoposti all'Heat Test, che prevedeva fasi di riscaldamento e successivo raffreddamento in grado di portare allo sviluppo di torbidità come indice di potenziale instabilità del vino.

Dal confronto dei risultati di quantificazione ottenuti sui vini rossi italiani, con le concentrazioni totali delle macromolecole rilevate in vini rossi di provenienza estera di varietà Merlot, Moscato Bailey, Carignan Nero, Cabernet Sauvignon, Shiraz e Tempranillo, riportate in bibliografia (Brillouet et al., 1991, Vidal et al., 2004; Quijada - Morin et al., 2014), si evince che i campioni italiani presentano contenuti in linea con i valori riportati in altre nazioni per le proteine e superiori per i polisaccaridi totali.

Un risultato importante è l'aver evidenziato, per la prima volta, che anche i vini rossi italiani contengono quantitativi importanti di proteine solubili. Infatti, la media delle proteine ottenuta per le varietà italiane si presenta intorno a 43,4 mg/l, in linea con i dati della letteratura in cui si riportano quantitativi medi intorno ai 50 mg/l delle varietà estere (Vidal et al., 2004). È interessante notare

come per alcuni campioni si siano raggiunte punte di concentrazione triple rispetto alla media.

Nel caso dei polisaccaridi totali invece, i vini italiani mostrano una concentrazione media di 495 mg/l con punte massime fino a 1081 mg/l, mentre le varietà estere presentano una media di 180 mg/l fino ad un massimo di 525 mg/l (Quijada - Morin et al., 2014). Tuttavia, i dati riportati nella tesi sono stati ottenuti con metodi diversi e quindi il confronto diretto con i valori riportati in bibliografia non è sempre appropriato.

La grande variabilità riscontrata tra le concentrazioni proteiche e polisaccaridiche di diverse varietà di vino rosso italiane ed estere, ha confermato la notevole influenza che le caratteristiche genetiche delle cultivar di vite, la loro localizzazione geografica, le condizioni di coltivazione e quelle di vinificazione, possono avere sulla composizione chimica finale di un vino.

L'elaborazione dei dati ottenuti sui vini rossi italiani è avvenuta correlando tra loro le variabili considerate secondo il modello di regressione lineare, che ha evidenziato scarsa correlazione sia tra le concentrazioni totali di proteine e polisaccaridi (mg/l), sia tra proteine (mg/l) e polisaccaridi totali (mg/l) e Indice BSA(NTU). Le stesse considerazioni possono essere avanzate per il confronto tra proteine (mg/l), polisaccaridi totali (mg/l) e i risultati dell'Heat Test (NTU), dove il coefficiente di correlazione ha mantenuto valori bassi.

Tali evidenze hanno portato a concludere che lo studio della composizione complessiva del vino non permette di avanzare considerazioni certe sul meccanismo d'interazione e sulle conseguenze nella stabilità colloidale delle maggiori classi di macromolecole, se analizzate nel loro insieme.

Tuttavia, i dati raccolti durante questo lavoro di tesi in futuro potrebbero essere rielaborati seguendo l'esempio degli studi effettuati sui vini rossi esteri

per caratterizzare, quantificare e correlare tra loro singole classi di composti all'interno delle principali categorie di proteine, polisaccaridi e polifenoli.

Questo approccio potrebbe fornire degli interessanti elementi per indagare il ruolo individuale delle molecole presenti in soluzione, nell'interazione con altri componenti e nell'equilibrio dello stato colloidale del vino rosso, che infine potrebbero integrare i dati ottenuti e interpretati dalle altre Unità di Ricerca coinvolte nel progetto PRIN e rappresentare un ulteriore importante contributo per il miglioramento della valutazione dell'astringenza nei campioni selezionati.

9) BIBLIOGRAFIA

- **Baxter N.F., Lilley T.H., Haslam E., Williamson M.P. 1997**

Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline - rich protein repeat results in complexation and precipitation, *Biochemistry*, (36), 5566 - 5577;

- **Berg H.W., Akiyoshi M., 1961**

Determination of protein stability in wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, (12), 107 - 110;

- **Breslin P.A.S., Gilmore M.M., Beauchamp G.K., Green B.G., 1993**

Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation, *Chemical Senses*, (18), 405 - 417;

- **Brillouet J.M., Bosso C., Moutounet M., 1990**

Isolation, purification and characterization of an arabinogalactan from a red wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, (41), 29 - 36;

- **Brillouet J.M., Belleville M.P., Moutounet M., 1991**

Possible protein - polysaccharide complexes from red wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, (42), 150 - 152;

- **Calderon P., Van Buren J., Robinson W.B., 1968**

Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolysable tannins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (16), 479 - 482;

- **Clamp J.R., Allen A., Gibbons R.A., Roberts G.P., 1978**

Chemical aspects of mucus, *British Medical Bulletin*, (34), 25 - 41;

- **Christensen C.M., Brand J.G., Malamud D., 1987**

Salivary changes in solution pH: A source of individual differences in sour taste perception, *Physiology and Behavior*, (40), 221 - 227;

- **Critchley H.D., Rolls E.T., 1996**

Responses of primate taste cortex neurons to the astringent tastant tannic acid, *Chemical Senses*, (21), 135 - 145;

- **Condelli N., Dinnella C., Cerone A., Monteleone E., Bertuccioli M., 2006**

Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples, *Food Quality and Preferences*, (17), 96 - 107;

- **Cohen R.E., Levine M.J., 1989**

Salivary glycoproteins, *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*, Ed. J.Tenovuo (CRC: Press: Boca Raton), 101 - 130;

- **Davies C., Robinson S.P., 2000**

Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening: Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins, *Plant Physiology*, (12), 803 – 812;

- **Dawes C., Wood C.M., 1973**

The contribution of the oral minor mucous gland secretions to the volume of whole saliva in man, *Archives of Oral Biology*,(18), 337 - 342;

- **Dawes H., Boyes S., Keene J., Heatherbell D., 1994**

Protein instability in wines: influence of protein isoelectric point, *American Journal of Enology and Viticulture*, (45), 319 – 326;

- **Dizy M., Bisson L.F., 1999**

White wine protein analysis by capillarity zone electrophoresis, *American Journal of Enology and Viticulture*, (50), 120 – 127;

- **Dorrestein E., Ferreira R.B., Laureano O., Teixeira A.R., 1995**

Electrophoretic and FPLC analysis of soluble proteins in four Portuguese wines, American Journal of Enology and Viticulture, (46), 235 – 242;

- **Ferreira R. B., Picarra - Pereira M. A., Monteiro S., Loureiro V. B., Teixeira A. R., 2002**

The wine proteins, Trends in Food Science and Technology, Elsevier, (12), 230 - 239;

- **Ferreira R.B., Monteiro S., Picarra – Pereira M.A., Taganho M.C., Loureiro V.B., Teixeira A.R., 2000**

Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods, American Journal of Enology and Viticulture, (51), 2 – 28;

- **Ferguson D.B.,1975**

Salivary glands and saliva, Applied Physiology of the Mouth, Ed. C.L.B. Lavelle (John Wright and sons: Bristol), 145 - 179;

- **Ferguson D.B., 1991**

Genetic control and structure of the proline - rich proteins of human saliva, Aspect of Oral Molecular Biology, Ed. D.B. Ferguson (S. Karger: Basel), 95 - 116;

- **Feuillat M., Brillant G., Rochard J., 1980**

Mise en evidence d'une production de proteases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin, Connaiss. Vigne Vin, (14), 37 – 52;

- **Fischer U., Noble A.C., 1994**

The effect of ethanol, catechin concentration and pH on sourness and bitterness of wine, American Journal of Enology and Viticulture,(45), 6 - 10;

- **Fischer U., Boulton R.B., Noble A.C., 1994**

Physiological factors contributing to the variability on sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli, *Food Quality and Preference*, (5), 55 - 64;

- **Fox P.C., Bodner L., Tabak L.A., Levine M.J., 1985**

Quantification of total human salivary mucins, *Journal of Dental Research*, (64), 327;

- **Gawel R., 1998**

Red wine astringency: a review, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (4), 74 - 95;

- **Gawel R., Oberholster A., Francis I. L., 2000**

A "Mouth - feel Wheel": terminology for communicating the mouth - feel characteristics of red wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (6), 203 - 207;

- **Guinard J.X., Pangborn R.M., Lewis M.J., 1986**

Time course of astringency in wine upon repeated ingestion, *American Journal of Enology and Viticulture*, (37), 184 - 189;

- **Gerbaud V., Gabas N., Laguerie C., Blouin J., Vidal S., Moutounet M., Pellerin P., 1996**

Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions, *Trans. I. Chem. E.*, (74), 782 - 790;

- **Gerken T.A., 1993**

Biophysical approaches to salivary mucin structure, conformation and dynamics, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, (4), 261 - 270;

- Green D.R.J., Embery G., 1985

The chemistry and biological proprieties of the minor salivary gland secretions, Oral Interfacial Reactions of Bone, Soft Tissue and Saliva, Eds. P.O., Glantz S.A., Leach and T. Ericson (IRL Press: Oxford), 75 - 81;

- Haslam E., 1981

Vegetable tannins in "The Biochemistry of Plants", Vol. 7, Ed E.E. Conn. (Academic Press: London), 327 - 361;

- Hay D.I., Bennick A., Schlesinger D.H., Minaguchi K., Madapallimattam G., Schluckebier S.K., 1988

The primary structure of six human salivary proteins (PRP -1, PRP - 2, PRP - 3, PRP - 4, PIF- s, PIF - f), Biochemical Journal, (255), 15 - 21;

- Hensten - Pettersen A., 1975

Biological activities in human labial and palatine secretions, Archives of Oral Biology, (20), 107 - 110;

- Hoffmann - Sommergruber K., 2002

Pathogen - Related - (PR) - proteins identified as allergens, Biochem. Soc. Trans.,(30), (Part 6), 930 - 935;

- Hsu J.C., Heatherbell D.A., 1987

Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice and wine, American Journal of Enology and Viticulture, (38), 6 – 10;

- Kallithraka S., Bakker J., Clifford M.N., 1997

Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid, Journal of Food Science,(62), 416 - 420;

- Kauffman D.L., Keller P.J.,1979

The basic proline - rich proteins in human parotid saliva from a single subject, Archives of Oral Biology, (24), 249 - 256;

- **Kennedy J.A., Ferrier J., Harbertson J.F., Gachons C.P.D., 2006**

Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency, *American Journal of Enology and Viticulture*, (57), 481 - 485;

- **Koch J., Sajak E., 1959**

A review and some studies on grape protein, *American Journal of Enology and Viticulture*, (10), 114 - 123;

- **Krug K., 1968**

Die ursachen der eiweissnachtrubungen bei wein des ausfall der eiweisschonungen, *Wein - Wiss*, (23), 8 - 29;

- **Lamkin M.S., Oppenheim F.G., 1993**

Structural features of salivary function, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, (4), 251 - 259;

- **Lawless H.T., Corrigan C.J., Lee C.B., 1994**

Interactions of astringent substances, *Chemical Senses*, (19), 141 - 154;

- **Lamikanra O., Inyang I.D., 1988**

Temperature influence on Muscadine wine protein characteristics, *American Journal of Enology and Viticulture*, (39), 113 - 116;

- **Llaudy M.C., Canals R., Canals J. M., Rozés N., Arola L., Zamora F., 2004**

New method for evaluating astringency in Red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry (J. Agric. Food Chem.)*, (52), 742 - 746;

- **Ledoux V., Dulau L., Dubourdieu D., 1992**

Interpretation de l'amélioration de la stabilité proteique des vins au cours de l'élevage sur lies, *J. Intern. Sci. Vigne Vin.*, (26), 239 - 251;

- **Lofdahl C.G., Odeblad E., 1980**

Biophysical variables relating to visco - elastic proprieties of mucus secretions, with special reference to NMR - methods for viscosity measurement, European Journal of Respiratory Diseases, Supplement No.110, (61), 113 - 127;

- **Luck G., Liao H., Murray N.J., Grimmer H.R., Warminski E.E., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E., 1994**

Polyphenol, astringency and proline rich proteins, Phytochemistry, (37), 357 - 371;

- **Mandel I.D., 1987**

The functions of saliva, Journal of Dental Research, (66), 623 - 627;

- **Martin M.M., Rockholm D.C., Martin J.C., 1985**

Effects of surfactants, pH and certain cations on precipitation of proteins by tannins, Journal of Chemical Ecology, (11), 485 - 494;

- **McArthur C., Sanson G.D., Beal A.M., 1995**

Salivary proline - rich proteins in mammals: Roles in oral homeostasis and counteracting dietary tannin, Journal of Chemical Ecology, (21), 663 - 691;

- **McManus J.P., Davis K.G., Lilley T.H., Haslam E., 1981**

The association of proteins with polyphenols, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (7), 309 - 311;

- **MacManus J.P., Davis K.G., Beart J.E., Gaffne S.H., Lilley T.H., Haslam E., 1985**

Polyphenol interactions, Part 1: Introduction: some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides, Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions, (2), 1429 - 1438;

- **Mercurio M. D., Smith P. A., 2008**

Tannin quantification in Red grapes and wine: Comparison of Polysaccharide and Protein - Based Tannin Precipitation Techniques and their ability to model

wine astringency, Journal of Agricultural and Food Chemistry (J. Agric. Food Chem.), (56), 5528 - 5537;

- **Moretti R.H., Berg H.W., 1965**

Variability among wines to protein clouding, American Journal of Enology and Viticulture, (16), 69 - 78;

- **Monteiro S., Picarra - Pereira M.A., Tanganho M.C., Rente J.P., Loureiro V.B., Teixeira A.R., Ferreira R.B., 1999**

Preparation of polyclonal antibodies specific for wine proteins, Journal of Science and Food Agriculture, (79), 772 - 778;

- **Nieuw Amerongen A.V., Bolscher J.G.M., Veerman E.C.I., 1995**

Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity, Glycobiology (5), 773 - 780;

- **Noble A.C., 1990**

Bitterness and astringency in wine, Bitterness in Foods and Beverages, Ed. R.L. Rouseff (Elsevier Science: Amsterdam), 145 - 158;

- **Oh H.I., Hoff J.E., Armstrong G.S., Haff L.A., 1980**

Hydrophobic interaction in tannin - protein complexes, Journal of Agricultural and Food Chemistry, (28), 394 - 398;

- **Pellerin P., Waters E., Brillouet J.M., 1993**

Characterization of two arabinogalactan - proteins from red wine, Carbohydrate Polymers, (22), 187 - 192;

- **Poncet - Legrand C., Doco T., Williams P., Vernhet A. 2007**

Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: effect of polysaccharide molecular weight, American Journal of Enology and Viticulture, (58), 87 - 91;

- Pueyo E., Dizy M., Polo M.C., 1993

Varietal differentiation of must and wines by means of protein fraction, American Journal of Enology and Viticulture, (44), 255 - 260;

- Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M., 1994

Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, Phytochemistry, (36), 781 - 784;

- Quijada - Morin N., Williams P., Rivas - Gonzalo J. C., Doco T., Escribano - Bailon M. T., 2014

Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency, Food Chemistry, Elsevier, (154), 44 - 51;

- Reddy M.S., Levine M.J., Tabak L.A., 1982

Structure of the carbohydrate chains of the proline - rich glycoprotein from human parotid saliva, Biochemical and Biophysical Research Communications, (104), 882 - 888;

- Remy S., Fulcrand H., Labarbe B., Cheynier V., Moutounet M., 2000

First confirmation in red wine of products resulting from direct antocyanin - tannin reactions, Journal of the Science of Food and Agriculture (J. Sci. Food Agric.), (80), 745 - 751;

- Ricardo da Silva J.M., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M., 1991

Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining, Journal of the Science of Food and Agriculture, (57), 111 - 125;

- Riou V., Vernhet A., Doco T., Moutounet M., 2002

Aggregation of grape seed tannins in model wine, Effect of Wine Polysaccharides, (16), 17 - 23;

- **Robichaud J.L., Noble A.C., 1990**

Astringency and bitterness of selected phenolics in wine, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (53), 343 - 353;

- **Robinson S.P., Davies C., 2000**

Molecular biology of grape berry ripening, *Australian Journal of Grape Wine Research*, (6), 175 - 188;

- **Santoro M., 1995**

Fractionation and characterization of must and wine proteins, *American Journal of Enology and Viticulture*, (46), 250 - 254;

- **Sarneckis C., Damberg R.G., Jones P., Mercurio M., Herderich M.J., Smith P., 2006**

Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis, *Aust. J. Grape. Wine Res.*, (12), 39 - 49;

- **Saucier C., Bourgeois G., Vitry C., Roux D., Glories Y., 1997**

Characterization of (+) - Catechin - Acetaldehyde Polymers: A model for colloidal State of Wine Polyphenols, *Journal of Agriculture and Food Chemistry (J. Agric. Food. Chem.)*, (45), 1045 - 1049;

- **Somers T.C., 1966**

Wine tannins: Isolation of condensed flavonoids pigments by gel - filtration, *Nature*, (209), 368 - 370;

- **Scollary G. R., Pàsti G., Kàllaby M., Blackman J., Clark A. C., 2012**

Astringency response of red wines: Potential role of molecular assembly, *Trends in Food Science and Technology*, (27), 25 - 36;

- **Siebert K. J., Carrasco A., Lynn P. Y., 1996**

Formation of Protein - Polyphenol Haze in Beverages, *Journal of Agriculture and Food Chemistry (J. Agric. and Food Chem.)*, (44), 1997 - 2005;

- **Smith A.K., June H., Noble A.C., 1996**

Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin, *Food Quality and Preference*, (7), 161 - 166;

- **Smith M.R., Penner M. H., Bennet S. E., Bakalinsky A. T., 2011**

Quantitative colorimetric assay for total protein applied to the Red wine Pinot Noir, *Journal of Agricultural and Food Chemistry (J. Agric. Food Chem.)*, (59), 6871 - 6876;

- **Singleton V.L., Noble A.C., 1976**

Wine flavor and phenolic substances, *Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compounds in Food Flavors*, Eds Charalambous G., Katz I. (ACS: Washington DC), 47 - 70;

- **Singleton V.L., Trousdale E.K., 1992**

Anthocyanin - tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, (43), 63 - 70;

- **Singleton V.L., Zaya J., Trousdale E.K., 1986**

Caftaric and coumaric acids in fruit of *Vitis*, *Phytochemistry*, (25), 2127;

- **Swain T., Bate - Smith E.C., 1962**

Flavonoid compounds in "Comparative Biochemistry" Eds M. Florkin and H.S. Mason (Academic Press: London), 755 - 809;

- **Tattersall D.B., Heeswijck R., Hoj P.B., 1997**

Identification and characterization of a fruit - specific, thaumatin - like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes, *Plant Physiology*, (114), 759 - 769;

- **Tyson P.J., Luis E.S., Day W.R., Walker B., Lee T.H., 1981**

Research note on estimation of soluble protein in must and wine by high - performance liquid chromatography, *American Journal of Enology and Viticulture*, (32), 241 - 243;

- **Van der Reijden, W.A., Van der Kwaak H., Vissink A., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V., 1996**

Treatment of Xerostomia with polymer based saliva substitutes in patients with Sjogren's Syndrome, *Arthritis and Rheumatism*, (39), 57 - 63;

- **Vérette E., Noble A.C., Somers T.C., 1988**

Hydroxy - cinnamates of *Vitis vinifera*: Sensory assessment in relation to bitterness in white wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (45), 267 - 272;

- **Vernhet A., Pellerin P., Prieur C., Osmianski I., Moutounet M., 1996**

Charge proprieties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions, *American Journal of Enology and Viticulture*, (47), 25 - 29;

- **Vidal S., Williams P., Doco T., Moutounet M., Pellerin P., 2003**

The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization, *Science Direct, Elsevier, Carbohydratepolymers*, (54), 439 - 447;

- **Vidal S., Francis L., Williams P., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E.J., 2004**

The mouth - feel proprieties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium, *Food Chemistry*, (85), 519 - 525;

- **Vincenzi S., Mosconi S., Zoccatelli G., Dalla Pellegrina C., Veneri G., Chignola R., Rizzi C., 2005.**

Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 56,(2), 182-187;

- **Waters E.J., Wallace W., Williams P.J., 1991**

Heat haze characteristics of fractionated wine proteins, *American Journal of Enology and Viticulture*, (42), 123 - 127;

- **Waters E.J., Wallace W., Tate M.E., Williams P.J., 1993**

Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (41), 724 - 730;

- **Waters, E. J., Pellerin, P., Brillouet, J. M., 1994**

A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze, *Carbohydrate Polymers*, 23,(3), 185-191;

- **Waters E.J., Hayasaka Y., Tattersall D.B., Adams K.S., Williams P.J., 1998**

Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46), 4950 - 4957;

- **Wigand P., Tenzer S., Schild H., Decker H., 2009**

Analysis of protein composition of Red wine in comparison with Rosé and White wines by Electrophoresis and High - Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (HPLC - MS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry (J. Agric. Food Chem.)*, (57), 4328 - 4333;

- **Wu A.M., Csako G., Herp A., 1994**

Structure, biosynthesis and function of salivary mucins, *Molecular and Cellular Biochemistry*, (137), 39 - 55;

- **Yan Q., Bennik A., 1995**

Identification of histadins as tannin - binding proteins in human saliva, *Biochemical Journal*, (311), 341 - 347;

- Yokotsuka K., Singleton V.L., 1995

Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine - like model solutions: Turbidity, particle size and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration, *American Journal of Enology and Viticulture*, (46), 329 - 338;

- Yokotsuka K., Ebihara T., Sato T., 1991

Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu juice, *Journal of Fermentation Technology*, (71), 248 - 253;

- Zanchi D., Poulain C., Konarev P., Tribet C., Svergun D. I., 2008

Colloidal stability of tannins: astringency, wine tasting and beyond, *Journal of Physics: Condensed Matter (J. Phys: Condens. Matter)*, (20), 494224 - 494230;

- Zanchi D., Vernhet A., Poncet - Legrand C., Cartalade D., Tribet C., Schweins R., Cabane B., 2007

Colloidal Dispersions of Tannins in Water - Ethanol Solutions, *Langmuir*, (23), 9949 - 9959.