



## **MANNOPROTEINE STATO DELL'ARTE: struttura molecolare ed effetti enologici**

Le mannoproteine rappresentano uno degli argomenti di maggiore spessore enologico, considerando la loro presenza nei vini, la loro forte partecipazione durante i processi di vinificazione e di affinamento, in più la forte presenza sul mercato di prodotti ottenute dall'estrazione di mannoproteine dalla parete cellulari dei lieviti.

Innumerevoli sono le fasi e le motivazioni di utilizzo, vediamo ora nello specifico dove si trovano, come vengono rilasciate e le loro funzioni.

Nelle pareti cellulari dei lieviti è possibile distinguere diversi polisaccaridi e, in quantità apprezzabili, avremmo:

- **β – GLUCANI**
- **CHITINA**
- **MANNOPROTEINE**

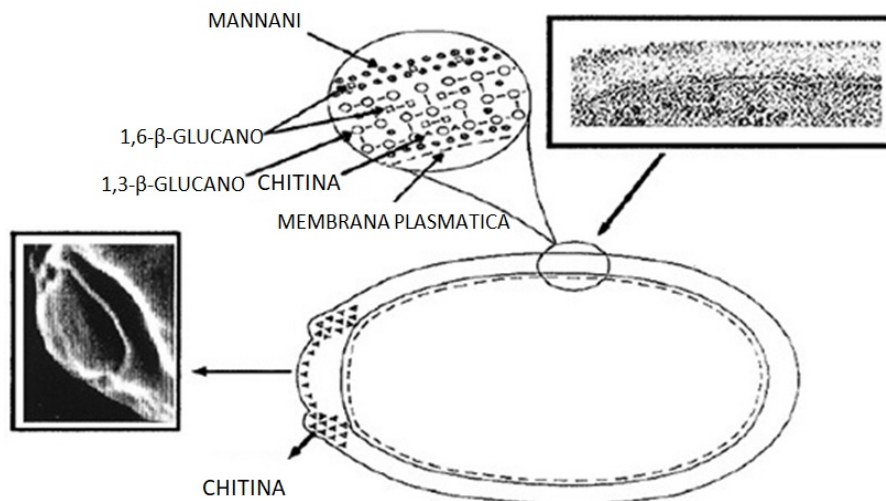


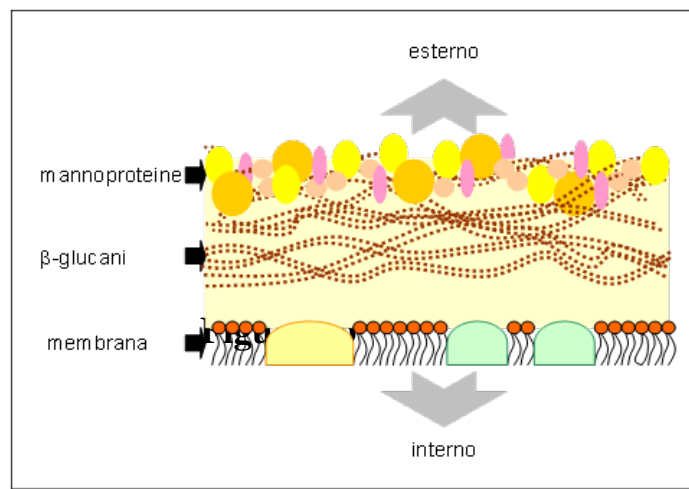
Figura 1a

### **Dove sono collocate le mannoproteine?**

La parete di *S. cerevisiae* comprende uno strato esterno di mannoproteine associato ad una matrice di β-1,3 glucano in forma amorfa che ricopre uno strato interno di β-1,3 glucano in forma fibrosa associato a piccole quantità



di chitina (1-2%).



*Figura 1b*

Il  $\beta$ -1,6 glucano funge da cementante tra i due strati (figura 1a).

La chitina svolge il ruolo di recettore di tossine killer, contribuisce al mantenimento dell'integrità osmotica e morfologica ed è il maggior costituente delle cicatrici che si formano nei punti in cui avviene la gemmazione.

Le mannoproteine, parte più superficiale della parete, ne rappresentano dal 25 al 50%. Hanno pesi molecolari compresi tra 20.000 e oltre 450.000 daltons. Tra di loro possono presentare dei legami crociati mediati da interazioni idrofobiche e/o da ponti disolfuro, sono legate alle sottostanti microfibrille di glucano mediante legami covalenti.

Possono avere un grado di glicosilazione variabile oltre il 90% di mannosio per solo 10% di peptidi nel caso di mannoproteine definite ipermannosilate. La diversità nella composizione e nella struttura ne comporta differenti proprietà. Alcune risultano essere molecole con funzione enzimatica come l'invertasi (enzima che serve al lievito per idrolizzare il saccarosio del mosto in glucosio e fruttosio) o la fosfatasi acida (serve per rimuovere i gruppi fosfato).

La parete dei lieviti contiene anche delle  $\beta$ -glucanasi di tipo 1-3 ed 1-6 che, nel corso della conservazione sulle fecce, sono implicate nei fenomeni di autolisi.



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

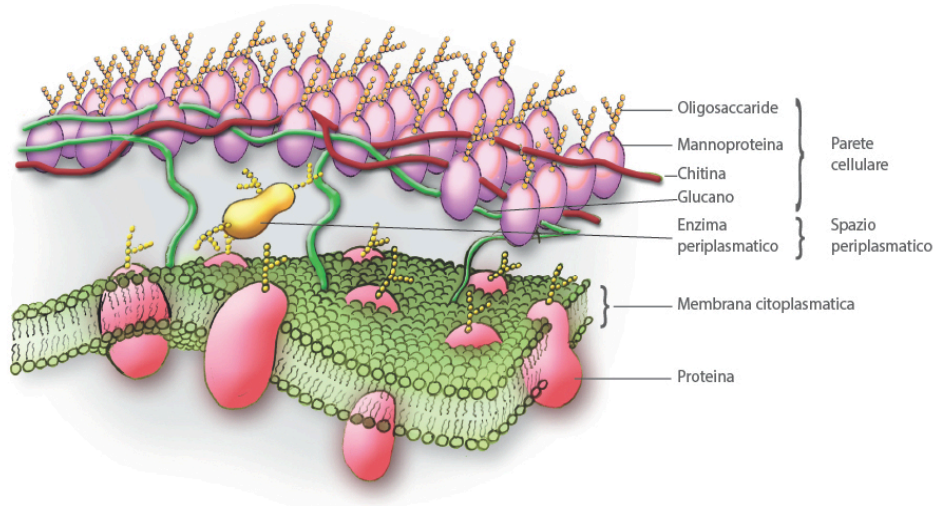


Figura 1c

In questo scenario la scoperta dell'imprescindibile e fondamentale **ruolo specifico che le mannoproteine giocano nel connotare il profilo qualitativo dei grandi vini** è patrimonio dell'enologia da almeno trent'anni, e da allora si sono succedute via via nel tempo nuove acquisizioni scientifiche e tecniche che hanno consentito di approfondire caratteristiche, effetti e peculiari proprietà. Nella tradizionale pratica enologica è indicato appunto come “*élevage sur lies*” il processo mediante il quale, dopo il termine del decorso fermentativo, le cellule di lievito non più vitali vengono mantenute nel vino e periodicamente rimesse in sospensione, in modo che le varie componenti secondarie all'autolisi vi vengano liberate ed agevolmente diffuse nel mezzo. In questo processo spontaneo sono coinvolti numerosi agenti enzimatici cellulari (fra i quali possiamo ricordare la  $\beta$ -glucanasi parietale e la Proteasi A vacuolare) che degradano le diverse strutture della cellula - comprese le pareti - sorgenti, fra l'altro, di mannoproteine.

In particolare le frazioni mannoproteiche contraddistinte da masse attorno ai 20 kDa e comprese fra i 30 ed i 40 kDa, e da un elevato grado di



**ASOENOLOGI**

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

glicosilazione (addizione di gruppi glicidici per raggiungere un ripiegamento corretto, quindi per poter esplicitare al meglio la propria funzione e per proteggerle dall'attacco delle proteasi) si sono rivelate essere tra le più attive, nel vino, nell'inibizione delle precipitazioni del bitartrato di potassio (Lubbers et al., 1993; Moine-Ledoux et al., 1997), spiegando il miglioramento spontaneo della stabilità proteica e tartarica dei vini bianchi nel corso della conservazione a confronto con le fecce (Moine e Debourdieu, 1995). Quindi è stato confermato che le mannoproteine, oltre a migliorare la stabilità tartarica, presentano delle proprietà stabilizzanti nei confronti delle precipitazioni proteiche (Ledoux et al., 1992; Waters et al., 1993).

IL miglioramento della stabilità proteica dei vini bianchi nel corso della loro conservazione sulle fecce è dovuto ad una mannoproteina di peso molecolare pari a 31,8 Kdaltons denominata MP32, anch'essa estraibile per digestione enzimatica dalle pareti dei lieviti utilizzando una preparazione industriale di  $\beta$ -glucanasi.

Numerose mannoproteine parietali sono state descritte in letteratura (Klis, 1994), ma in questo articolo cerchiamo di approfondire la MP32. Per fare ciò, un frammento di questa mannoproteina, ottenuto per digestione utilizzando l'endoproteasi Lys C, è stato sequenziato.



La sequenza peptidica definita è la seguente: **VFWYEPSQK** (Val-Phe-Trp-Tyr-Glu-Pro-Ser-Gln-Lys). Essa è stata confrontata con quella di frammenti di diverse proteine. È stata riscontrata l'omologia al 100% con una glicoproteina parietale di *S. cerevisiae*, l'invertasi, ove corrisponde alla sequenza degli alfa-amminoacidi 174-182 (fig.2).

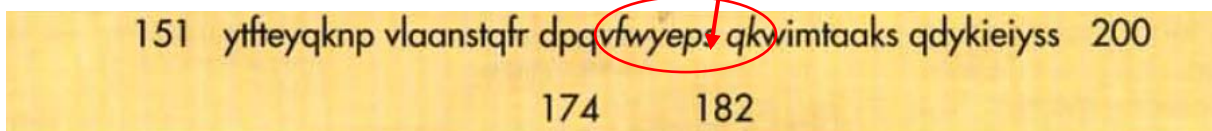


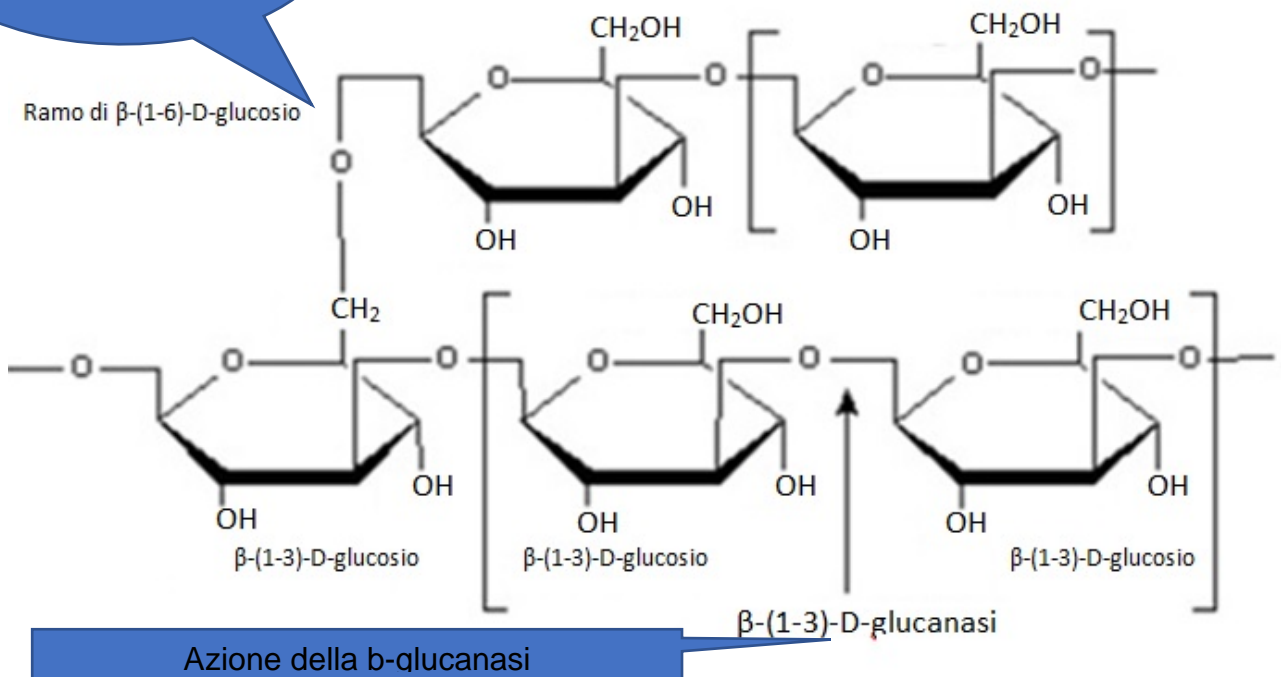
Figura 2

A questa sequenza segue una lisina, punto di rottura per l'endoproteasi Lys C utilizzata. Anche tenendo conto della lisina, MP32 e l'invertasi di *S. cerevisiae* possiedono una identica sequenza di 10 amminoacidi. La massa molecolare di MP32 è di 32 Kdaltons mentre quella dell'invertasi è di 270 Kdaltons (Newmann e Lampen, 1967). MP32 è dunque un frammento dell'invertasi. In effetti, nel corso dell'autolisi dei lieviti, nelle condizioni di maturazione sulle fecce, due proteasi del lievito possono teoricamente digerire l'invertasi: la proteasi A e la carbossipeptidasi Y, quindi la sua liberazione nel corso della maturazione sulle fecce è dovuta all'azione congiunta della  $\beta$ -glucanasi parietale che lo libera dal glucano, e dalla proteasi A vacuolare del lievito che libera i frammenti di invertasi che hanno un ruolo attivo nella stabilizzazione tartarica e proteica (MP32). Quindi le  $\beta$ -(1-3)-D-glucanasi agiscono a livello di legame covalente tra il glucano e la struttura glucidica della mannoproteina permettendo la liberazione nel mezzo vino.



Ramificazione che  
tiene unite le  
catene lineari del  
glucano

### B-Glucano del Lievito



Polimero di unità di  $\beta$ -(1-3)-D-glucosio con rami di unità di  $\beta$ -(1-6)-D-glucosio

Figura 3

La parete del lievito è fatta soprattutto da  $\beta$ -glucani (3 tipologie) e da mannoproteine (mannosio + proteina) che sono ancorate allo strato  $\beta$ 1-3 glucano amorfo. Possono lavorare al di fuori della cellula, come le invertasi, mannoproteine che scindono il saccarosio in fruttosio e glucosio.

I polisaccaridi di evidente interesse enologico provenienti dai lieviti sono essenzialmente due:

- **MANNOPROTEINE:** che comprendono l'80% del totale e sono molecole formate da circa il 90% di mannosio e 10% di proteine. Questa è una divisione in percentuali in grandi linee visto che mannoproteine, come le invertasi, presentano una quantità equamente divisa tra parte



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

zuccherina e proteica (lo zucchero protegge dall'ambiente acido del vino e stabilizza la parte proteica).

- **GLUCOMANNOPROTEINE:** che sono circa il 20% dei polisaccaridi totali e sono leggermente diverse dalle mannoproteine (struttura simile). Innanzitutto, hanno una composizione che si divide in 25% glucosio, 25% mannosio e 50% proteine e presentano catena peptidica con catene corte, attaccata con legami O-glicosidici sulla serina e treonina, di 4 unità di mannosio e un mannano ad alto peso molecolare, Sono ramificate con legami N-glicosidici sull'asparagina.

### **MANNOPROTEINE**

Sono questi i polisaccaridi del lievito che meritano menzione particolare visto gli effetti importantissimi nel vino. Innanzitutto, bisogna ricordare che parliamo di molecole che contengono un'alta quantità di zucchero che "protegge" una proteina, la quale avrà diversa funzione, composizione e ripiegamento. Per via di questa peculiarità (zuccheri + proteina) sono chiamate **PROTEOGLICANI**, diversamente dalle glicoproteine dove si ha una proteina con uno zucchero attaccato (qua, praticamente, è il contrario).

Hanno, di base, questa struttura:

*-(mannosio, 1→6, 1→2 e 1→3) come N-(asn) o O-(thr o ser) glucosidi*

Le mannoproteine sono molto solubili e rimangono nel vino.





**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Frazione attiva  
della struttura  
glicosidica che  
dà carica (-)

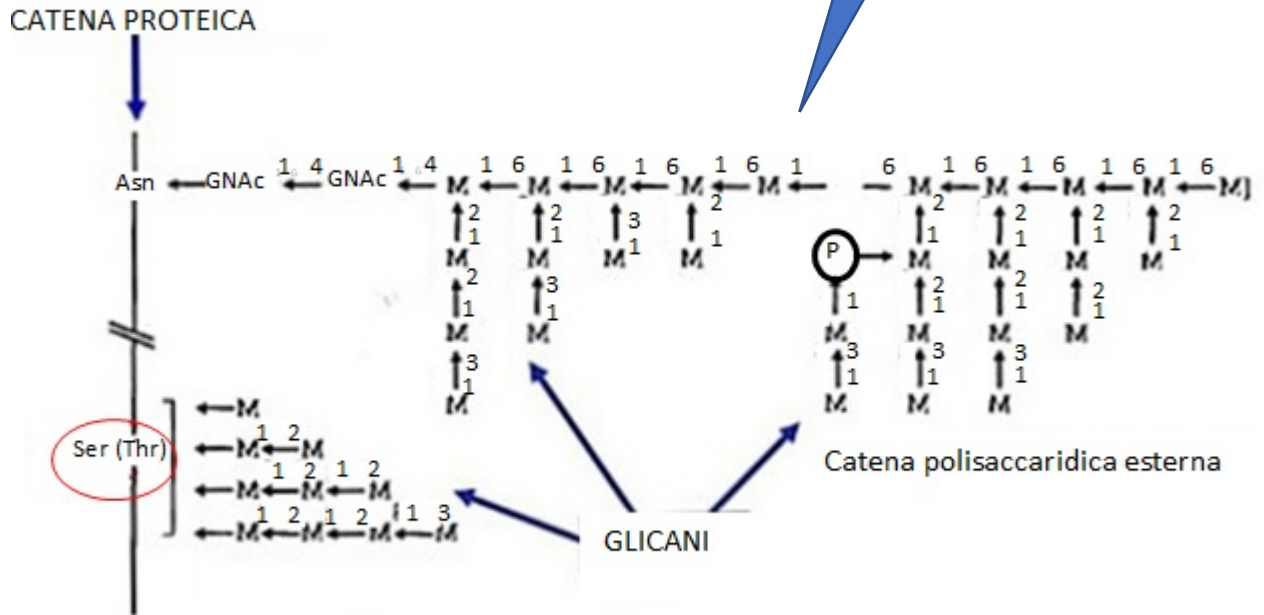


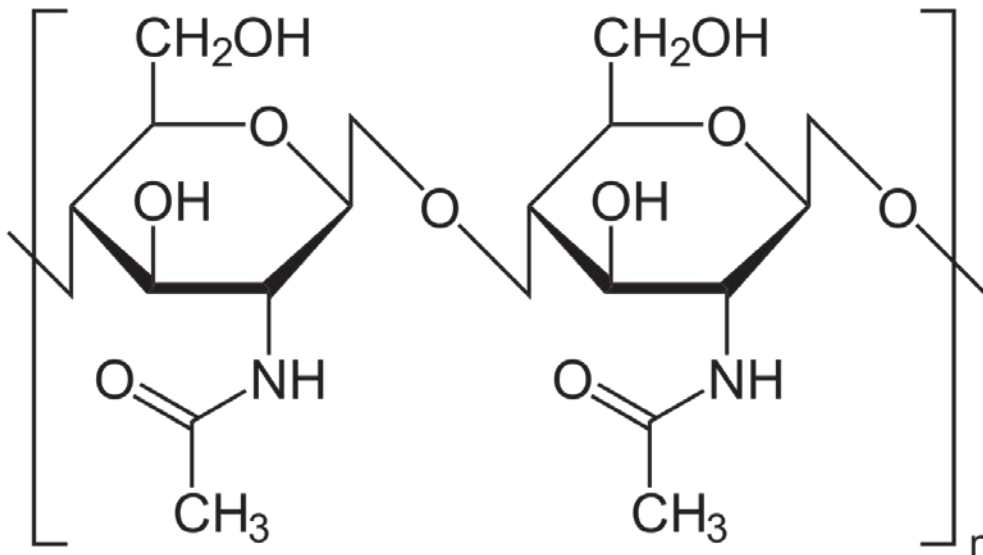
Figura 4

In figura 4 è possibile apprezzare la complessa struttura di queste catene, formate per lo più da una catena lineare di mannosio che, nel finale, presenta due residui di N-acetilglucosammina (Figura 5) ai quali è attaccato un residuo di asparagina. È proprio sul residuo di asparagina che si ha una ramificazione di mannosio, il quale potrà a sua volta ramificarsi.





**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE



*Figura 5 Struttura di base di due unità di N-acetilglucosammina a cui si lega l'asparagina*

Sui residui di serina, in queste catene formate a partire dall'asparagina, si possono legare strutture lineari di mannosio. Si vede quindi che le mannoproteine da lievito contengono sia O-glicani (legati alla serina) che N-glicani (legati a residui di asparagina): mentre gli O-glicani sono generalmente neutri (privi di gruppi con cariche elettriche), gli N-glicani possiedono cariche negative dovute alla presenza di fosfato, glucuronato o piruvato. La percentuale di N-glicani (soprattutto contenenti gruppi mannosilfosfato) dipende dal ceppo di lievito. Sono questi i gruppi che riescono a stabilire interazioni elettrostatiche ioniche con i diversi componenti del vino. Quindi è la presenza dei gruppi di fosfato  $-P$  che conferiscono una carica negativa alla molecola. Nel vino, queste molecole sono molto presenti e derivano dal materiale di parete in eccesso non utilizzato dal lievito per la costruzione di nuove cellule e nuova parete, oltre che da prodotti di attività enzimatiche parietali. Esistono infatti degli enzimi specifici chiamati endo-glucanasi, i quali sono coinvolti nei processi di autolisi e che quindi possono distruggere la matrice glucanica della parete liberando le mannoproteine (che sono legati a pezzi di glucano). Grazie a questo processo autolitico i vini che vengono lasciati riposare a contatto con le fecce fini (fecce del lievito) nel metodo classico



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

si arricchiscono di mannoproteine, migliorando le caratteristiche organolettiche (profumi e stabilità schiuma).

### **EFFETTI MANNOPROTEINE**

Come detto in precedenza, le mannoproteine, hanno effetti importantissimi dal punto di vista organolettico e effetti generali sul vino. Gli effetti che più improntanti sono:

- **DIMINUZIONE DELL'ASTRINGENZA:** anche in questo caso si legano ai polifenoli (tannini) permettendo alla saliva di non legare con queste particolari sostanze che creano astringenza;
- **STABILITÀ DELLA SCHIUMA:** negli spumanti sono fondamentali in quanto rimangono a pelo della soluzione facendo sì che, quando sale la bolla di CO<sub>2</sub>, questa non venga liberata immediatamente ma sia trattenuta per aumento della tensione (grazie alle mannoproteine) stabilizzando, così, la schiuma;
- **PROBLEMI DI FILTRABILITÀ:** non solo aspetti positivi quindi, ma anche un aspetto negativo (intasamento filtri) che, tuttavia, è trascurabile se la quantità di queste molecole è trascurabile;
- **STABILIZZAZIONE DELLE PROTEINE:** soprattutto nei bianchi; saranno attive solo quelle prodotte dopo la fermentazione;
- **STABILIZZAZIONE DEL COLORE:** nei vini rossi per interazioni elettrostatiche con la frazione colorante instabile fungendo da colloide protettore;
- **STABILITÀ TARTARICA:** significativa sia nei rossi che nei bianchi.

Sono così improntanti che possono essere usati degli additivi preparati industrialmente, appositamente per l'utilizzo in vinificazione, tramite un processo di estrazione enzimatica dalla parete dei lieviti. Durante la fermentazione si possono calcolare 100 mg/L nel vino (tutti i vini)



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

rilasciate naturalmente e senza proprietà protettive, mentre dopo la fermentazione la percentuale di polisaccaridi protettivi (ed in generale la quantità totale rilasciata) si alzerà. I lieviti, quindi, rilasciano polisaccaridi nel vino che, oltre agli effetti positivi portati dalle mannoproteine ed escluse queste ultime, possono dare problemi, come i polisaccaridi colloidali calcolabili a concentrazioni fino a parecchie centinaia di mg/l.

I polisaccaridi possono essere rilasciati in momenti differenti durante la FA e, a seconda del momento di rilascio, possiamo verificare diverse proprietà:

1. Durante la fermentazione: sono rilasciati fin dall'inizio della crescita e si attestano sui 100 mg/L in tutti i vini; sono rilasciati naturalmente e NON hanno proprietà selettive (20% proteina);
2. Dopo la fermentazione: sono rilasciati quando il vino sta a contatto con le fecce di lievito grazie a processi di autolisi e, in questo caso, hanno proprietà protettive.

In questi casi il rilascio dipende da diversi fattori quali:

- Ceppo di lievito;
- Condizioni di fermentazione;
- Tempo e condizione di permanenza dei lieviti (temperatura, agitazione...)

Piccolo appunto sul Battonage, tecnica che riporta i lieviti in sospensione permettendo un rilascio più uniforme e consistente dei polisaccaridi (mannoproteine, ecc.)



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

Tabella 1: Polisaccaridi

<b>Impatto dell'agitazione sulla produzione di polisaccaridi <u>esocellulari</u></b>		
<b>TSP* contenuti (mg/L)</b>		
	<b>Agitazione Media</b>	<b>Senza Agitazione</b>
	200	117
	250	123
<b>*TSP: Polisaccaridi solubili totali</b>		

Ma quali sono gli EFFETTI ENOLOGICI dei PS nel vino? I PS hanno moltissimi effetti sia positivi che negativi, che sono, purtroppo, poco conosciuti.

Ma quindi, cosa dobbiamo fare?

## **PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE**

Hanno differenti proprietà riassunte in:

1. *Conformazione*
2. *Volumi Idrodinamici*
3. *Pesi Molecolari*
4. *Idrofobicità/Idrofilicità*: sono considerati come tensioattivi alle interfacce liquido – gas agendo, così, sulla stabilità delle schiume, la quale diminuirà con la filtrazione.
5. *Carica Elettrica*: vale la pena ricordare che i PS possono avere interazioni elettrostatiche e ioniche con gli altri componenti del vino. Infatti PS come le mannoproteine, presenteranno un gruppo fosfato che darà una carica negativa alla molecola, mentre i PS acidi avranno cariche diverse a diversi pH dei vini, proprietà conferita dai gruppi carbossilici.



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

## **PROPRIETÀ ORGANOLETTICHE**

Grazie alle varie proprietà chimico – fisiche hanno poi effetti più o meno positivi sul vino:

1. *Morbidezza*: anche se ci sono ancora opinioni controverse. Tuttavia, si possono legare ai polifenoli come i tannini riducendo l'astringenza;
2. *Viscosità*: hanno comunque un effetto trascurabile se non si considerano i prodotti della botrite e dei batteri, PS da controllare per questo problema;
3. *Aroma*: gli effetti sull'aroma possono essere portati per via di probabili interazioni con le molecole aromatiche (eliminazione macromolecole = eliminazione di una parte degli aromi). Le mannoproteine, per esempio, possono interagire con alcuni tipi di aromi (ex acetato di isoamile, esanoato di etile, i  $\beta$ -iononi, esteri) legandoli e fungendo da "serbatoi" di aromi.

È provato, poi, che la presenza di PS aumenta la stabilità del vino nei confronti degli intorbidamenti e delle precipitazioni che altrimenti avverrebbero, per esempio, in bottiglia. Hanno quindi azione di "COLLOIDI PROTETTORI", caratteristica che porta sia aspetti positivi che negativi: positivi perché si mantiene la stabilità impendendo la flocculazione delle sostanze, negativi perché si rallenta / ritarda la chiarifica.

C'è poi da chiarire che nel mosto avvengono dei processi spontanei che possono essere attivati o interagire con i PS presenti. Vediamo ora i processi che conoscono delle interazioni con i PS.



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

## **POLISACCARIDI E PREVENZIONE DELLE PRECIPITAZIONI TARTARICHE**

Prima di affrontare nel dettaglio questa peculiare azione dei PS è bene sapere che l'acido tartarico tende a cristallizzare e precipitare sotto forma di bitartrato di potassio[1] (KHT), elemento con solubilità limitata in alcol e a bassa temperatura. Questo processo prevede due fasi fondamentali, ossia (1) la formazione dei nuclei di condensazione e (2) l'accrescimento dei cristalli. È su questi processi che agiscono i PS inibendo i fenomeni (soprattutto nei rossi).

## **PREVENZIONE DAGLI INTORBIDIMENTI PROTEICI**

Le proteine, nel corso di mesi e di anni, possono precipitare conferendo una certa torbidità al vino in bottiglia, difetto grave per la qualità (avviene soprattutto nei bianchi). Alcuni polisaccaridi riescono ad inibire questo fenomeno anche se vanno distinti in base alla loro natura (cambia l'effetto). I PS ad effetto basso sono:

- AGProteina con il 13% di parte proteica;
- Mannoproteine ad alto PM (420 kDa) con il 30% di parte proteica;

Mentre i PS che hanno un effetto molto più importante sono:

- Mannoproteine a basso PM (30 kDa) provenienti dall'autolisi dei lieviti e quindi rilasciate spontaneamente in vini affinati sui lieviti.

## **Studio dell'effetto inibente sulla precipitazione tartarica di due tipi di estratti mannoproteici**

Le mannoproteine possono essere di peso molecolare compreso tra 20 e oltre 450 Kda, e possono avere dei gradi di glicosilazione anche molto differenti. Tra le mannoproteine alcune sono responsabili delle interazioni cellulari (unione sessuale, flocculazione, fattore Killer, ...) altre



possiedono attività enzimatiche (invertasi, glucosidasi, esterasi). Le mannoproteine costituiscono dunque una famiglia di macromolecole in cui ogni elemento strutturale conferisce attività o proprietà differenti.

Esistono principalmente due metodologie industriali per l'estrazione delle mannoproteine: metodi chimici e metodi enzimatici. Il metodo chimico è quello descritto da Peat et al., consiste nell'estrazione delle mannoproteine a caldo in un mezzo tampone citrato (MEC). I metodi enzimatici consistono nell'idrolizzare i glucani della parete con  $\beta$ -glucanasi, questo induce la liberazione nel mezzo di mannoproteine (MEE).

Il metodo di idrolisi che è stato messo a punto consiste nel digerire la parete dei lieviti con una preparazione industriale di  $\beta$ -glucanasi. Il suo impiego è autorizzato in enologia per l'idrolisi dei glucani della *Botrytis* e per facilitare la filtrazione dei vini.

L'effetto di questi due tipi di preparazioni nei confronti della stabilità tartarica dei vini è valutata con un test a freddo (Tabella 2).

*Tabella 2 – Confronto dell'effetto stabilizzante di mannoproteine estratte a caldo (MEC) e di mannoproteine estratte enzimaticamente (MEE)*

vini	non trattati	MEC 25 g/hl	MEE 25 g/hl
Bianco 1	***	***	0
Bianco 2	***	***	0
Rosato	***	***	0
Rosso 1	***	***	0
Rosso 2	***	***	0

\*\*\*\* : cristallizzazione

0 : nessuna cristallizzazione





Tabella 3 – Composizione dei 2 tipi di mannoproteine

Modalità di estrazione	Calore	digestione enzimatica
Proteine %	4,2	15
Polisaccaridi %	93,8	83,2
Mannosio %	92	100
Glucosio %	8	0

Le mannoproteine estratte enzimaticamente sono più ricche in proteine e la loro frazione polisaccaridica contiene solo mannosio.

Analizzate per HPLC ad esclusione molecolare (Figura 6) le mannoproteine estratte per digestione enzimatica presentano un picco supplementare (P2) corrispondente ad una massa molecolare media compresa tra 30 e 50 Kda.

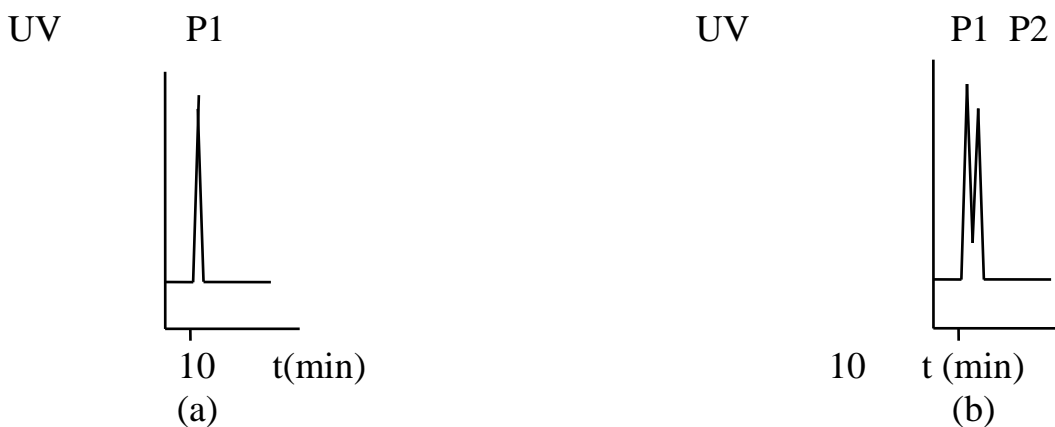


Figura 6 – Analisi HPLC ad esclusione molecolare di mannoproteine estratte con il calore (a) e per digestione enzimatica (b)

A partire da mannoproteine estratte enzimaticamente abbiamo quindi cercato di isolare la frazione dotata di attività inibente nei confronti delle precipitazioni tartariche.

**Isolamento e caratterizzazione delle mannoproteine responsabili della stabilità tartarica.**



Per fare ciò, in un primo tempo, sono state separate le mannoproteine secondo la loro dimensione, per cromatografia liquida di esclusione molecolare ad alta prestazione, in due frazioni indicate con P1 e P2 (Figura 7).

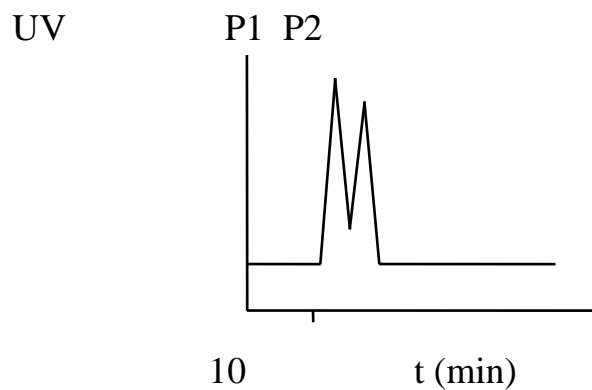


Figura 7: Frazionamento per esclusione molecolare delle mannoproteine estratte per via enzimatica dalla parete dei lieviti

Le due frazioni isolate sono addizionate, a dosi crescenti, ad un vino che viene sottoposto in seguito ad un test a freddo (figura 8).

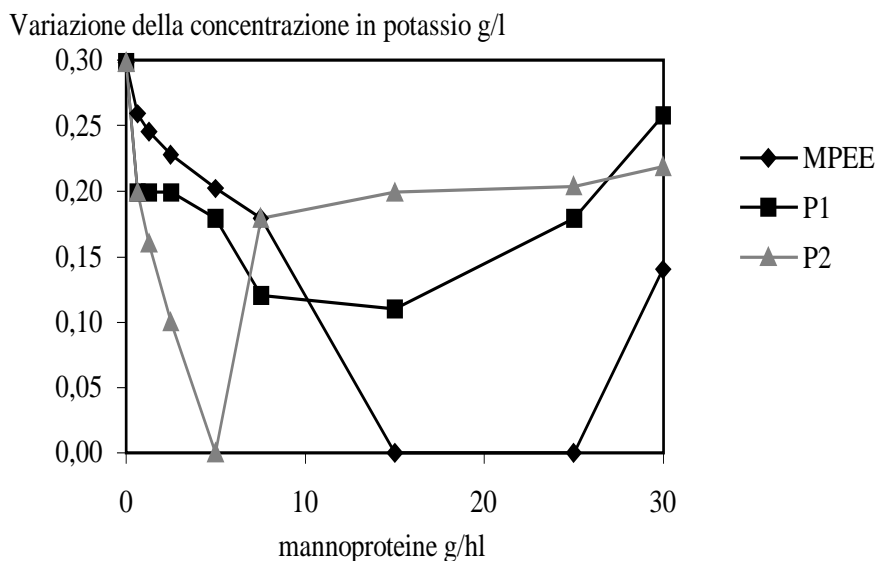


Figura 8: Influenza dell'aggiunta di MPEE, P1 e P2 sulla stabilità tartarica di un vino bianco



La frazione P1 non inibisce la cristallizzazione. Per contro la frazione P2, corrispondente a molecole con peso molecolare compreso tra 30 e 50 Kdaltons, è già attiva alla dose di 5 g/hl (50 mg/l). Infatti a questa dose la differenza di concentrazione in potassio prima e dopo il trattamento, utilizzata come parametro di valutazione dell'inibizione della precipitazione di bitartrato di potassio a freddo, è praticamente nulla. Bisogna notare che l'aggiunta al vino di mannoproteine in quantità eccessiva, >30 g/hl, induce un effetto di surdosaggio, il che significa che il vino risulta nuovamente instabile.

La frazione P2 viene ulteriormente purificata per cromatografia di affinità molecolare su un gel di Concanavalina A (figura 9). Si ottiene una frazione non trattenuta (Con A FNR), poco glicosidata, ed una frazione trattenuta (Con A FR) fortemente glicosidata, eluita con una soluzione 0,5 M di  $\alpha$ -D-metilmannoside.

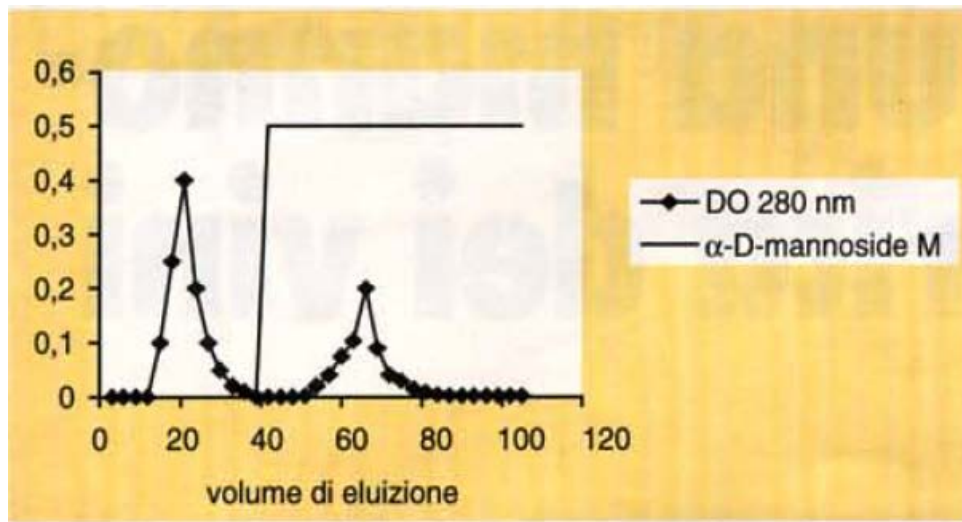
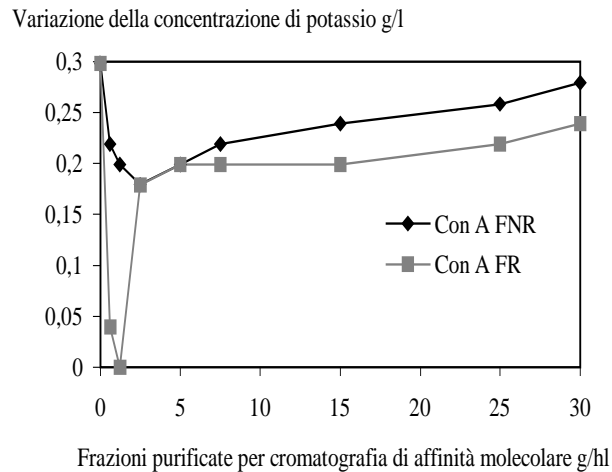


Figura 9: Frazionamento di P2 su Concanavalina A.

Le 2 frazioni così separate sono addizionate ad un vino che viene in seguito sottoposto ad un test a freddo (Figura 10).



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

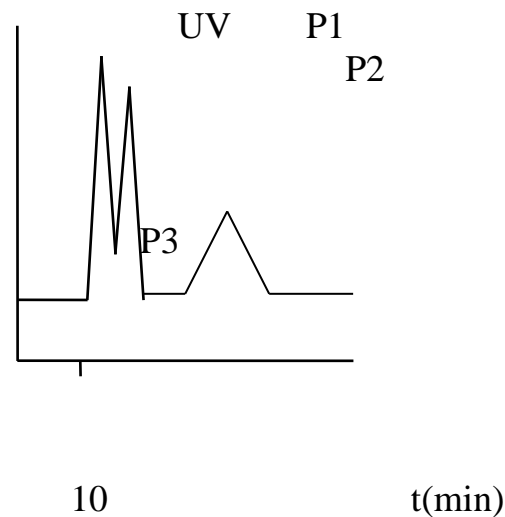


*Figura 10 – Influenza dell'aggiunta delle frazioni separate per cromatografia d'affinità sulla stabilità tartarica di un vino bianco.*

Solo la frazione trattenuta (quella più glicosilata) previene la cristallizzazione già a partire da una dose molto bassa (12,5 mg/l). Questa frazione che possiede un potere inibitore elevato, è composta da mannoproteine fortemente glicosilate di massa molecolare compresa tra 30 e 40 Kdalton. La necessità di impiegare delle glucanasi per estrarre queste mannoproteine dalla parete dei lieviti, lascia supporre che esse siano legate con legame covalente al glucano. Infatti esse sono presenti nelle pareti cellulari trattate con SDS e con  $\beta$ -mercaptoetanololo (Figura 11).



**ASOENOLOGI**  
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE



*Figura 11: Analisi per HPLC di esclusione molecolare di un estratto di mannoproteine ottenuto per via enzimatica da pareti di lievito, trattate su SDS e  $\beta$ -mercaptoetanolo.*

agenti chimici che non agiscono affatto sui legami osidici. La presenza del picco 2, corrispondente all'eluizione della mannoproteina responsabile della stabilità tartarica conferma che il legame è covalente.

Tra le mannoproteine legate con legame covalente al glucano, alcune possiedono inoltre un tipo di glicosidazione particolare, con un legame glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) (Klis,1994). L'utilizzazione di un ceppo mutante (FBYII) deficitario in mannoproteine con legame GPI se allevato a temperatura di 37°C (FBYII-37), permette di dimostrare che le mannoproteine responsabili della stabilizzazione tartarica possiedono questo tipo di glicosidazione. Due tipi di estratti mannoproteici sono ottenuti per idrolisi enzimatica della parete di lieviti (FBYII) fatti sviluppare a 24°C o a 37°C.



L'analisi per HPLC dei due estratti (Figura 12)

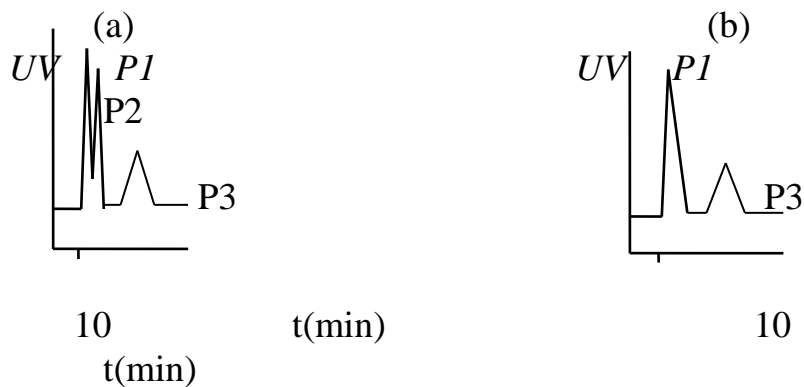


Figura 12: Analisi per HPLC ad esclusione molecolare degli estratti mannoproteici ottenuti per idrolisi enzimatica della parete di lieviti FBYII-24 (a) e FBYII-37 (b).

mostra che il picco numero 2 é assente nel caso in cui la parete sia ottenuta a partire da lieviti fatti sviluppare a 37°C, ossia deficitari in mannoproteine con legame GPI. Questi risultati mostrano da un lato che le mannoproteine responsabili della stabilizzazione tartarica sono mannoproteine con legame GPI, e permette d'altro canto di dimostrare che questo tipo di mannoproteine non è estraibile che per via enzimatica.

L'applicazione degli estratti di mannoproteine ottenuti per digestione enzimatica della parete dei lieviti allo scopo di stabilizzare i vini dalle precipitazioni tartariche é stata oggetto di un brevetto francese ed internazionale il cui depositario é la Facoltà di Enologia di Bordeaux II (Moine e Deubourdiu, 1994; 1996). Questo prodotto è stato sperimentato nel corso delle vendemmie 1997-1998 su circa 2000 hl di vino. Il livello di stabilità tartarica ottenuto per addizione del preparato di mannoproteine è visibile in tabella 4.



Tabella 4

**Tab. 3 - Tempo di comparsa di cristalli di tartrato nel corso della conservazione del vino a -4 °C.**

Vini controllati	Non trattato	Trattamenti di stabilizzazione		
		Freddo	Ac. metatartrico	Preparato di mannoproteine
VDT rosso	3 giorni	8 giorni	–	> 23 mesi
spumante	4 giorni	–	–	> 23 mesi
VDT rosso	3 giorni	4 giorni	4 giorni	> 22 mesi
VDC rosso	3 giorni	4 settimane	–	> 21 mesi
VDT rosso	5 giorni	–	1 mese	> 17 mesi
VDP rosso	5 giorni	> 3 mesi	–	> 17 mesi
VDT bianco	3 giorni	> 17 mesi	1 mese	> 17 mesi
Bx bianco 97	4 giorni	–	–	> 18 mesi
Bx bianco 97	4 giorni	> 16 mesi	–	> 16 mesi
Bx rosso 97	4 giorni	> 15 mesi	–	> 15 mesi
Bx rosso 97	4 giorni	> 15 mesi	–	> 15 mesi

VDT: vino da tavola. – VDC: vino con indicazione del vitigno. – VDP: Indicaz. Geografica Tipica – Bx: vino denominazione Bordeaux.

Per valutare l'efficacia della stabilizzazione tartarica delle mannoproteine ci sono vari test tra cui il test del minicontatto e il test a freddo da valutare con delle prove in piccolo preliminari.





**ASOENOLOGI**

IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

## **BIBLIOGRAFIA**

Debourdieu D., Moine V. (1995) – In: Oenologie 95, Lavoisier TEC et DOC Ed., 385-390.

Debourdieu D., Moine V. – Produit biologique pour la stabilisation physico-chimique d'un vin. Brevet française n. 94 13261.

Debourdieu D., Moine V. Produit de stabilisation proteique des vins, Brevet français n. 96 08187.

Dulau D. (1990) – These de Doctorat de l'Université de Bordeaux II.

Feuillat M., Peyron D., Berger J.L. (1987) – Bull. O.I.V., 673-674.

Feuillat M., Freyssinet M., Charpentier C.(1989) – Vitis, 28, 161-176.

Klis F.M. (1994)-Yeast, 10, 851-869.

Ledoux V., Dulau L., Deubordieu D. (1992)- J. Int. Sci. Vigne Vin, 26, 239-251.

Neumann B., Lampen J.O. (1967) – Biochemistry, 6, 468.

Ribereau-Gayon J. (1933)- Bull Soc. Chim., 53, 1162.

Waters E.J., Wallace W., Tate M.E., Williams P. (1993)- J. Agric Food. Chem., 41, 724-730.

Vino&Viticoltura Novembre 26, 2017.