SCOPERTA DI NUOVE PROTEINE RESPONSABILI DELLA CASSE PROTEICA "NATURALE" NEI VINI BIANCHI E ROSATI

CALEGARI Giovanni[1], MANTEAU Sébastien[2], POINSAUT Philippe[2], SCOTTI Barbara[1]

[1]ENARTIS, Via S. Cassiano 99, 28069 San Martino Trecate (NO) Italia
[2]Martin Vialatte Oenologie, 79 av Thévenet BP 1031 Magenta 51319 Epernay cedex, France
Autore (Email: smanteau@sofralab.com)

INTRODUZIONE

Le proteine contenute nel vino possono avere varia origine: l'uva, da cui proviene la maggior parte (Dambrouck *et al.*, 2003), i lieviti, i batteri e i trattamenti enologici, come nel caso di un surcollaggio.
Nonostante le proteine siano dei composti minoritari del vino, la stabilità proteica dei vini bianchi e rosati è un problema reale e molto diffuso. Le proteine infatti, possono essere responsabili della comparsa di intorbidamenti e precipitati in bottiglia che rappresentano una perdita economica importante per il produttore. Per prevenire il problema, gli enologi trattano quasi sistematicamente tutti i vini con bentonite.

Fig 1

Fig 2

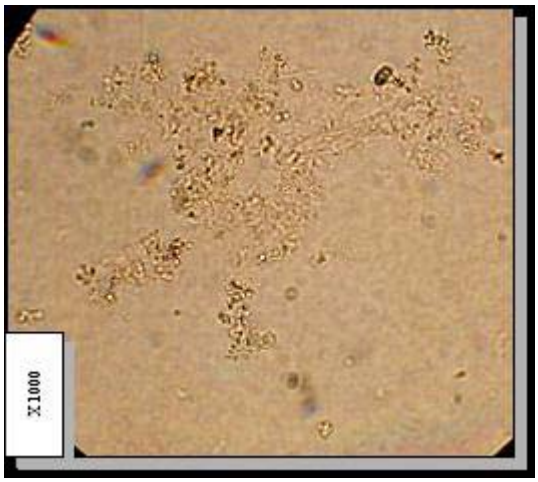


Fig. 1: *casse spontanea in bottiglia: dopo qualche mese a temperatura ambiente, un vino ricco in proteine (bottiglia a sinistra) presenta una casse proteica spontanea. Il vino che non contiene proteine invece (bottiglia a destra) resta limpido.*
Fig. 2: osservazione al microscopio ottico (1000 ingrandimenti) di una cassa proteica spontanea. Il torbido proteico si presenta molto spesso sotto forma di ammasso amorfo e translucido.

La bentonite è un'argilla capace di adsorbire le proteine ma purtroppo asporta dal vino anche molte sostanze aromatiche e coloranti (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).
La letteratura scientifica (Ribéreau-Gayon *et al*., 1998) e l'esperienza di cantina indicano che la casse proteica è influenzata da numerosi fattori: favorevoli (polifenoli, Fe2+, Cu2+, calore ecc.) e inibenti (mannoproteine, colloidi, ecc.). Oltre alle proteine, i principali fattori necessari alla casse proteica sono i polifenoli. In presenza di un tappo sughero che rilascia tannini ad esempio, un vino bianco o rosato ricco in proteine quasi sempre sviluppa una casse proteica.
Alcuni lavori realizzati qualche anno fa, mostrano che le proteine di difesa del grappolo - chitinasi e taumatina-simili - sono implicate nel fenomeno di intorbidamento causato dall'esposizione al calore (Waters *et al.*, 1996).

Utilizzando delle tecniche d'analisi come l'elettroforesi SDS-PAGE ed il Western blot (Manteau *et al.*, 2003), si è voluto indagare quali proteine sono coinvolte nella precipitazione proteica che si produce spontaneamente (senza riscaldamento) in bottiglia.

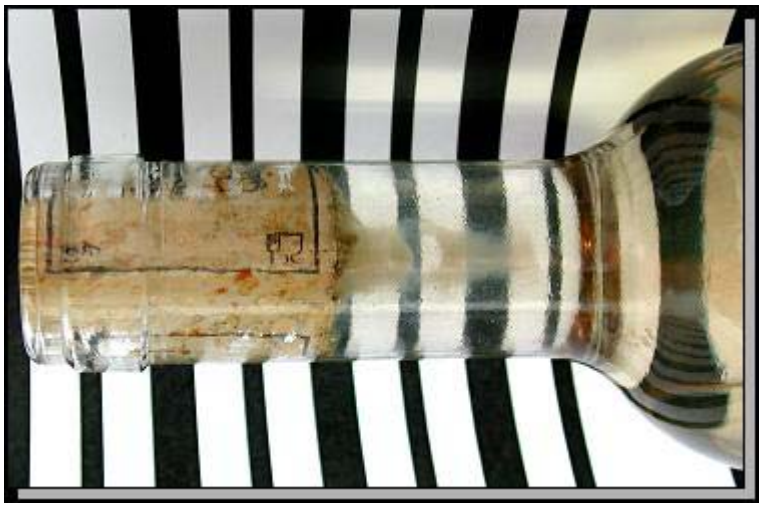


Fig. 3: Casse proteica causata da un tappo sughero che cede tannini in un vino ricco in proteine.

MATERIALI E METODI

Elettroforesi SDS-PAGE & colorazione specifica delle proteine

Prima di essere depositato sul gel elettroforetico in poliacrilamide (PAGE), l'estratto proteico è mescolato al tampone di Laemmli. Quest'ultimo contiene un tensioattivo anionico negativo, il sodio dodecil solfato (SDS), che permette di caricare negativamente tutte le proteine. Il gel d'elettroforesi SDS-PAGE forma una rete che agisce come un setaccio molecolare. Sotto l'azione di un campo elettrico, le proteine caricate negativamente sono trascinate verso il polo positivo. Una proteina di massa molecolare ben precisa formerà una banda ben definita in fase di rivelazione mediante colorazione o Western blot.

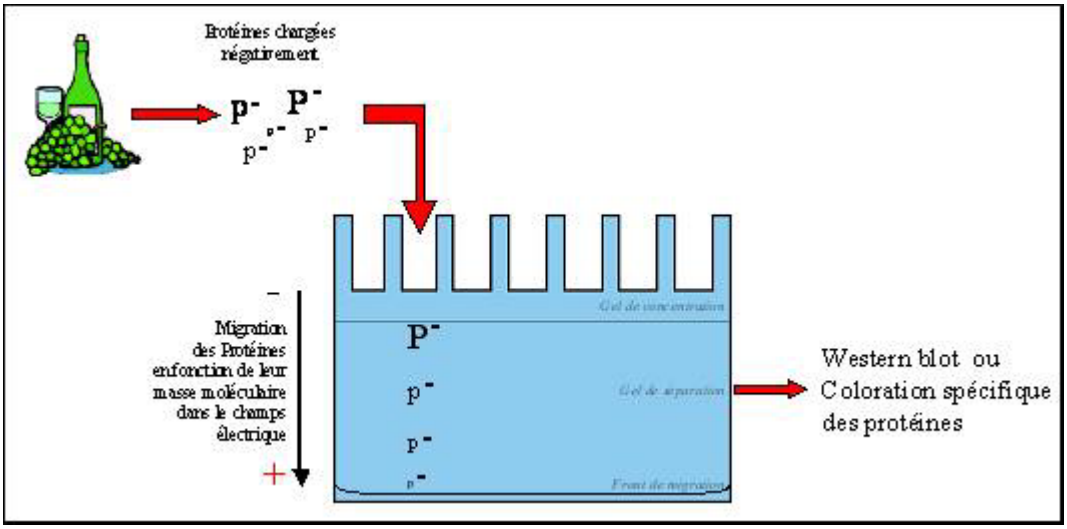
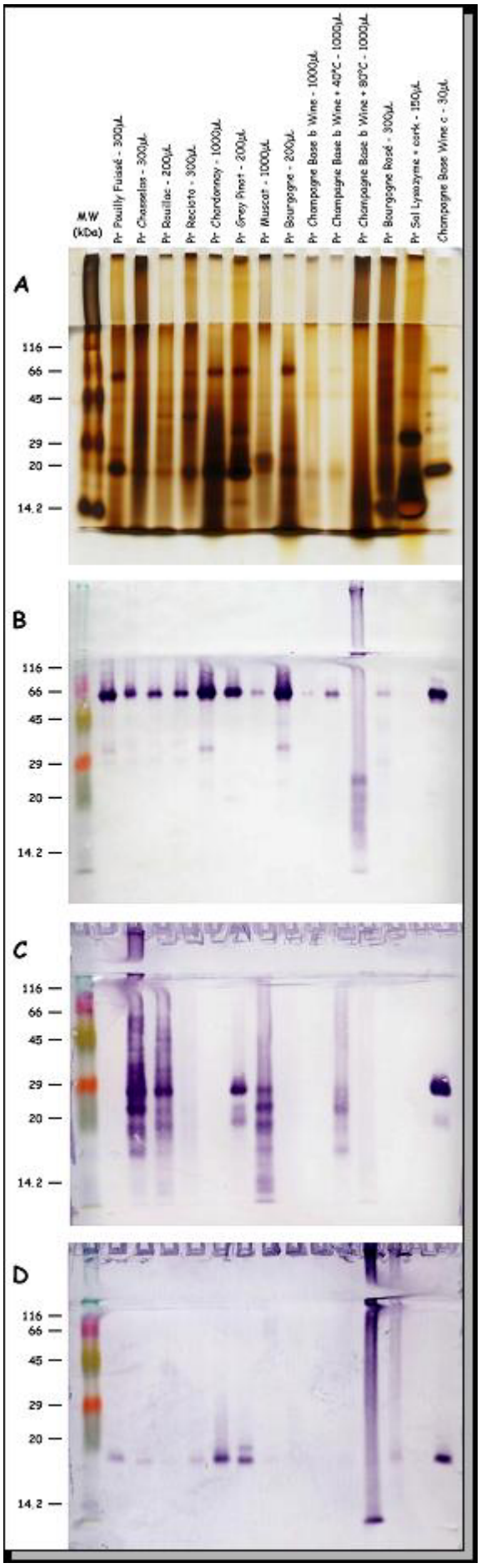


Fig. 4: schema dell'elettroforesi SDS-PAGE



RISULTATI & DISCUSSIONE

L'elettroforesi SDS-PAGE è la tecnica più utilizzata dai laboratori di ricerca per evidenziare le proteine. Il gel forma una specie di settaccio molecolare e la proteina, in funzione delle sue dimensioni, migra più o meno a lungo sotto l'azione di un campo elettrico. Una proteina di massa molecolare ben precisa quindi forma una banda ben definita.

Per la rivelazione delle bande proteiche sono state utilizzate due tecniche: colorazione con nitrato d'argento e Western blot. La colorazione dell'elettroforesi SDS-PAGE con nitrato d'argento evidenzia non solo le proteine ma anche i polifenoli. Quest'ultimi sono in realtà una miscela di composti di diversa massa e dimensioni che formano una scia continua (smear) lungo il percorso di migrazione delle proteine. Il ricorso alla la tecnica del Western blot e l'uso di anticorpi specifici invece, permettono di evidenziare in modo specifico invertasi, chitinasi e taumatina-simili.

In questo studio, sono stati analizzati più di 70 vini di varia origine. Dopo elettroforesi SDS-PAGE si possono osservare fino a 12 proteine differenti sia nei vini bianchi che nei rosati (dati non pubblicati). Nessuno dei vini analizzati ha evidenziato la presenza di batteri o lieviti nel precipitato proteico. Questo campione quindi, si può considerare rappresentativo delle casse proteiche spontanee in bottiglia.

Fig. 5: profilo SDS-PAGE di proteine coinvolte nella casse proteica
Profilo proteico dopo elettroforesi SDS-PAGE di un vino base Champenois e di alcuni precipitati proteici ottenuti in diversi vini.
A: elettroforesi SDS-PAGE e colorazione al nitrato d'argento; B: Western blot con anticorpi specifici dell'invertasi dell'uva; C: Western blot con anticorpi specifici della chitinasi dell'uva; D: Western blot con degli anticorpi specifici di taumatina-simili dell'uva.
Dopo centrifugazione del vino, il precipitato viene recuperato, lavato con una soluzione idroalcolica a pH 3 e solubilizzato in tampone di Laemmli. Il "volume equivalente in vino" è indicato in alto nella figura.
Vengono confrontate anche la casse proteica spontanea di un vino base Champenois (Champagne Base Wine b) con quelle indotte per riscaldamento a 40°C (Champagne Base Wine b + 40°C) e 80°C (Champagne Base Wine b + 80°C).
La penultima colonna a destra corrisponde al profilo di un precipitato proteico ottenuto dopo contatto tra una soluzione di lisozima e un tappo sughero. Mentre, l'ultima colonna a destra è il profilo di vino base Champenois (Champagne Base Wine c).

Come si può vedere nella foto dell'elettroforesi, per ottenere una colorazione simile con nitrato d'argento, sono stati utilizzati precipitati corrispondenti a volumi diversi di vino. Ciò significa che i vari vini che hanno fatto la casse non contengono la stessa quantità di precipitato.

L'uso del calore per indurre la casse denatura e modifica considerevolmente il profilo delle proteine presenti nel precipitato. Dopo riscaldamento a 80°C infatti, le bande proteiche non sono così ben delimitate e l'invertasi e la chitinasi formano delle scie continue o smear.

L'osservazione dei profili proteici mostra anche che nella casse proteica naturale sono implicate diverse proteine.

Contrariamente a ciò che viene indicato dalla letteratura scientifica (Waters *et al*., 1996), le proteine di difesa dell'acino d'uva, chitinasi e taumatina-simili, non sono sistematicamente coinvolte nella casse proteica in bottiglia. Nel corso di questo lavoro, abbiamo potuto mostrare che proteine come il lisozima (vino non chiarificato) e più di una decina di altre proteine possono essere coinvolte nel fenomeno della casse proteica in bottiglia (oltre 10 bande di diversa massa molecolare sono osservabili all'elettroforesi SDS-PAGE trattata con nitrato d'argento). E' importante anche notare che in tutte le casse proteiche esaminate in questo studio, il Western blot ha sempre rivelato la presenza dell'invertasi, solitamente considerata una mannoproteina "stabilizzante".

Ulteriori indagini sono necessarie per definire il ruolo di tutte le proteine individuate, ed in particolare delle mannoproteine come l'invertasi, nella casse proteica dei vini bianchi e rosati.

Bibliografia

- Dambrouck, T., Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., Parmentier, M., Maujean, A. & Jeandet, P. (2003). *Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(9), 2727-2732.
- Manteau, S., Lambert, B., Jeandet, P. & Legendre, L. (2003). *Changes in chitinase and thaumatin-like PR-proteins of grape berries during the Champagne winemaking process.* American Journal of Enology and Viticulture, 54(4), 267-272.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (1998). *Les traitements de clarification et de stabilisation - Le collage des vins.* In « Traité d'œnologie. 2. Chimie du vin, stabilisation et traitement », Vol. 2, Dunod. Paris, pp. 343-381.
- Waters, E. J., Shirley, N. J. & Williams, P. J. (1996). *Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1), 3-5.

Ringraziamenti

Si ringraziano il laboratorio d'Enologia e di Chimica Applicata e il laboratorio di Difese da Stress e Riproduzione delle Piante dell'Università di Reims per l'omaggio degli anticorpi utilizzati in questo studio.