



I costituenti chimici dell'uva e del mosto



L'unica uva vinificabile per doc e docg è quella della *Vitis vinifera*, in tutte le sue varietà (Pinot, Barbera e Chardonnay ecc.). La coltivazione degli ibridi per la produzione di uva da vino è vietata in Italia dal 1931 (Legge 376/31) salvo per autoconsumo.

Le parti costitutive del frutto sono: raspo, acino, che a sua volta comprende il pedicello, i vinaccioli, la buccia, la polpa e i fasci fibrovascolari.

1. Raspo o Raspo

Convogliano le sostanze nutritive dalla pianta agli acini. Questi sono composti da acqua (50-80%), cellulosa e lignina (15-40%), ceneri (2-3%), sostanze azotate (1-2%), acidi organici (1-1,5%), tannini (1,3-5%) e tracce di zuccheri. L'eccessiva presenza di tannini, che provoca effetto astringente (allappante), dato dalla reazione con enzimi presenti nella saliva, rende necessaria la separazione dei raspi attraverso la diraspatura.



2. Acino



Buccia

E' composta da acqua, cellulosa, polifenoli, sostanze azotate, sali minerali, acidi organici.

Nella zona cerosa superficiale, chiamata **pruina**, sono presenti i lieviti indigeni responsabili della fermentazione spontanea dei mosti. (Lieviti selezionati).

Al microscopio elettronico la pruina si presenta come una serie di foglietti impilati ed ha una composizione complessa: per una parte, circa un terzo, è formata da acido oleanolico che attiva la fermentazione, per il resto è costituita da una serie di composti che vanno dagli alcoli agli acidi, dagli esteri alle aldeidi. La pruina, oltre ad avere un effetto protettivo sull'acino, impedisce l'evaporazione di acqua.



Pigmenti polifenolici (antociani e flavoni):

sostituiscono i carotenoidi e la clorofilla durante la fase di invecchiamento.

Gli antociani sono i pigmenti più importanti nell'uva rossa conferendone il colore. Gli antociani, che prendono anche il nome di antocianine, sono molecole complesse che possono dare luogo a derivati privi di zucchero, le antocianidine: la presenza negli acini di antociani con caratteristiche lievemente diverse consente di raggruppare le varietà di *Vitis vinifera* in famiglie simili per composizione antocianica.

I flavoni sono pigmenti gialli, simili per struttura agli antociani. Sono presenti sia in uve rosse che bianche. Il colore tipico dei vini bianchi non è dato unicamente dai flavoni ma anche dai polifenoli tannici lievemente ossidati.



Tannini (colloidi a carica negativa)

- ◊ Tra le sostanze polifenoliche ricordiamo i tannini, i quali formano complessi insolubili con le proteine e altri composti. Per la maggior parte i tannini sono contenuti nel raspo, nelle bucce e nei vinaccioli.



◊ **Enzimi:** catalizzatori biologici, modificano la velocità delle reazioni biochimiche senza prendere parte attivamente ad esse. Sono sensibili alle variazioni di temperatura e dimostrano diminuzione dell'attività di azione in funzione del tempo trascorso. Gli enzimi sono costituiti da proteine e la maggior parte delle proteine, ma non tutte, sono enzimi.

Gli enzimi si trovano per lo più nella buccia.

Ricordiamo i più importanti.

Invertasi: idrolizza il saccarosio in glucosio e fruttosio
Al momento dell'ammostamento il saccarosio è presente in piccole quantità.

Polifenolossidasi: sono gli enzimi che ossidano i polifenoli nell'uva (**tirosinasi e laccasi**).



Tirosinasi: non viene rilasciata molto nel mosto e catalizza l'ossidazione dei gruppi fenolici. È un enzima ossidativo naturalmente presente nell'uva la cui sintesi aumenta notevolmente in presenza della Botritis cinerea.

Laccasi: è un enzima secreto dalla Botritis ed è quindi presente nelle uve colpite da questa muffa grigia. Si diffonde nel mosto ed è responsabile della casse ossidativa. Questo enzima è molto solubile, stabile al pH del mosto. Attacca in presenza di ossigeno una grande varietà di polifenoli.

Entrambe portano alla formazione di **chinoni** (derivano dall'ossidazione dei polifenoli, **tannini compresi**) responsabili della sensazione di amaro.



Enzimi proteolitici: scindono le proteine.

Enzimi pectolitici: Le pectine (polimeri dell'acido galatturonico) presenti nella parete cellulare.

1) Le **metilesterasi pectiniche** idrolizzano i gruppi metossilici delle sostanze pectiche.

2) **Poligaratturonidasi:** demolizione delle catene polimeriche delle pectine.

Sostanze azotate

Sono necessarie per il nutrimento dei lieviti interessati alla fermentazione alcolica. Queste sostanze sono localizzate per la maggior parte nella buccia. Si trovano sotto forma di proteine, amminoacidi liberi, ammine glicosilate (legate con uno zucchero) e libere.



3. Vinaccioli

I vinaccioli sono composti da: lipidi, lignina, cellulosa, amido, fosfati di calcio e potassio. La loro importanza è dovuta alla presenza di tannini, che possono essere rilasciati nel mosto in quantità eccessiva durante la macerazione.



4. Polpa

La polpa è composta da: acqua per il 70-85%, principale componente perché senza di essa non avverrebbero le reazioni. Gli zuccheri (glucosio e fruttosio) sono il substrato della fermentazione (18-25%).

Pur considerando che l'acino all'inizio del suo sviluppo contiene clorofilla e può svolgere la fotosintesi gli zuccheri vengono portati dalle foglie all'acino sotto forma di saccarosio che, successivamente, si scinderà in glucosio e fruttosio.



Alterazioni del vino

Possono riguardare il colore e la limpidezza dei vini.

Le cause che determinano i difetti sono di origine diversa: microbiche, chimiche, fisiche.

Spesso queste tre cause si combinano tra loro in una combinazione molto pericolosa per le caratteristiche del vino imbottigliato.

CASSES: Le casses possono essere di diversi tipi, ovvero ferrica, rameica, proteica e ossidatica, si manifestano con intorbidamento del vino.



ALTERAZIONI CHIMICHE E FISICHE

Casse Ferrica

Alterazione che determina intorbidimento e precipitati di colore bluastrò, soprattutto nei vini rossi, causata da un eccesso di presenza di ferro che, legandosi ai tannini presenti può formare i **tannati ferrici**.

Fosfato-ferrica: è favorita dall'aggiunta di fosfato ammonico per lo sviluppo dei lieviti.



Casse rameosa:

Il vino s'intorbidisce formando dei depositi rosso-bruni dovuti alla reazione del rame in eccesso con lo zolfo o con altri composti solforati presenti nell'ambiente ridotto della bottiglia.



Casse proteica:

La **casse proteica** si presenta in seguito a vari fattori come le variazioni di temperatura e di pH nel vino: in questi casi si manifesta un intorbidimento, dovuto alle proteine presenti nel vino che si legano ai tannini formando dei fiocchi biancastri.

Le precipitazioni possono avvenire durante la fermentazione e la stabilizzazione, ma le più preoccupanti sono quelle dopo l'imbottigliamento.

Le proteine nel vino sono colloidali elettropositivi allo stato di sol a causa del loro punto isoelettrico (pI) superiore al pH del vino.

In seguito a variazioni del pH, quando arrivano al loro punto isoelettrico si ha precipitazione delle proteine.



Fattori che favoriscono od ostacolano la **casse proteica**:

Effetto del freddo: con il raffreddamento diminuisce l'energia cinetica delle micelle colloidali creando più instabilità e facilità di coagulazione, così si aggregano facilmente in complessi colloidali insolubili.

Effetto del calore: i colloidali proteici sono resi stabili dall'alta percentuale di acqua che hanno legata; con il calore, l'acqua viene parzialmente rimossa, agevolandone la coagulazione.



Tannini: nelle soluzioni acquose contenenti tannini e proteine si possono formare complessi tanno-proteici, di facile coagulazione, dato che i tannini disidratano le proteine e ne possono neutralizzare le cariche superficiali, dato che le proteine a pH acidi sono elettropositive e i tannini hanno cariche negative.



ALTERAZIONI ENZIMATICHE

Casse ossidativa:

Alterazione del colore del vino dovuta all'azione di enzimi che, in presenza di ossigeno determinano imbrunimento dei vini. Si manifesta principalmente a carico di vini ottenuti da uve ammuffite (ricche di polifenossidasi).

Segue casse ossidativa:

L'ossidazione è creata dalle polifenolossidasi, tra le più importanti ricordiamo:
La tirosinasi proveniente direttamente dalle uve,
La laccasi, derivante dalla botrytis cinerea.



Sebbene proteine e peptidi siano i costituenti minori del vino contribuiscono in modo significativo alla sua qualità.
Le proteine possono causare vari problemi tecnologici durante la vinificazione e possono essere responsabili della torbidità del vino in bottiglia influenzando l'immagine del prodotto e la sua accettazione da parte del consumatore.

Le proteine giocano un ruolo importante in differenti operazioni che vengono svolte in cantina quali la filtrazione, la chiarificazione e la stabilità.

Alcuni autori attribuiscono qualità favorevoli alla frazione proteica:

Favoriscono la stabilizzazione tartarica, proteggendo dalle precipitazioni di sali di tartrato

L'analisi delle proteine del mosto è utile alla caratterizzazione varietale di Vitis vinifera

Peptidi e proteine hanno ricevuto scarsa attenzione in letteratura per le difficoltà che si possono incontrare nella loro purificazione.



La stabilizzazione tartarica dei vini è un problema con il quale si devono confrontare tutte le cantine.

Gioca infatti un ruolo importantissimo nella presentazione dei vini al consumo. Infatti se nell'uva il Potassio e l'acido Tartarico sono presenti in compartimenti separati, e non danno origine a fenomeni di precipitazione, a partire dal momento della pigiatura dell'uva il potassio e l'acido tartarico si trovano presenti insieme, nella stessa soluzione.

La loro concentrazione non viene sostanzialmente modificata dall'attività dei lieviti e quindi durante la conservazione del vino danno origine a evidenti fenomeni di precipitazione di bitartrato di potassio.



Vini conservati per lunghi periodi a contatto con le fecce di fermentazione, fanno registrare a fine periodo di maturazione un miglioramento della stabilità proteica e tartarica.

Le mannoproteine (glicoproteine presenti nella parete cellulare dei lieviti) cedute dai lieviti al vino durante il periodo di affinamento sono le responsabili di questa stabilizzazione. In particolare i polisaccaridi favoriscono la

stabilità proteica e tartarica.

Il miglioramento

della stabilità proteica dei

vini conservati sulle fecce è essenzialmente

imputabile a MP32,

una particolare mannoproteina,

corrispondente ad un frammento di invertasi, con peso

molecolare pari a 31,8 Kdalton,

idrolizzata dalle proteasi vacuolari

nel corso della lisi della cellula

(Moine-Ledoux e Dubourdieu, 1996).



Il miglioramento della stabilità tartarica è invece da imputare ad un altro frammento di mannoproteina, MP 40, che ha un effetto durevole nel tempo.

Essa, per un meccanismo non ancora del tutto accertato, ha la capacità di impedire sia la formazione del germe di cristallizzazione che il suo accrescimento, evitando di fatto le precipitazioni tartariche.

L'efficacia sulla stabilità tartarica per aumento delle mannoproteine è pari a quella di un trattamento a freddo e la loro azione è durevole nel tempo.

La possibilità di utilizzare un colloide protettore biologico che è già un componente del vino stesso suscita grande interesse a livello tecnologico.



L'affinamento sulle fecce conferisce al vino maggiore finezza e stabilità grazie alla liberazione di polisaccaridi e mannoproteine durante la così detta autolisi del lievito.

Per favorire l'arricchimento dei vini della frazione polisaccaridica originata dai lieviti, è possibile ricorrere all'ausilio di preparati enzimatici.

Beta glucanasi: enzima naturale di molte specie di lieviti. E' una glicoproteina attiva durante l'autolisi naturale del lievito responsabile della liberazione nel vino di mannoproteine durante la conservazione del vino sulle fecce.



La β -Glucanasi esplica la sua azione a temperature comprese tra 12° e 50° C ed il suo pH ottimale è compreso tra 3.0 e 4.0.

Inoltre, non ha problemi di inibizione a gradazioni alcoliche superiori a

14%vol e per concentrazioni di SO₂ fino a 500 mg/l.

L'aggiunta di β -glucanasi esogene non apporta dunque nulla di estraneo ai vini; rafforza solo un'attività enzimatica già esistente, alla base dei fenomeni naturali di lisi cellulare.

Questo ha per conseguenza che, in tempi di conservazione relativamente brevi, è possibile ottenere risultati altrimenti perseguibili in tempi molto lunghi di maturazione o, a parità di tempo, di ottenere risultati più interessanti.



Studi recenti (Moreno-Arribas et al. 1999, J. Agric. Food Chem.) hanno dimostrato come l'analisi elettroforetica delle proteine totali del mosto rappresenti una facile tecnica per la caratterizzazione di cultivars di *Vitis vinifera*.

Differenti varietà di vite sono infatti caratterizzate da differenti profili elettroforetici.

E' stata mostrata corrispondenza con i metodi ampelografici usati per l'identificazione varietale.

I risultati ottenuti hanno confermato la possibilità di identificare le varietà di vite da cui i mosti derivano mediante analisi elettroforetica.

Queste analisi possono essere associate agli studi di identificazione varietale con marcatori molecolari (Analisi Microsatelliti, AFLP).

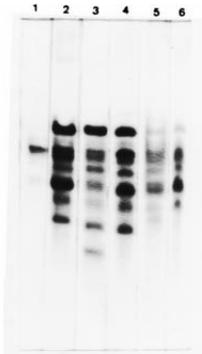


Figure 2. PAGE profiles obtained for proteins from the grape mutants. Lane 1, PAR-G26; lane 2, PAR-H13; lane 3, VIN-1116; lane 4, MAR-G28; lane 5, MAC-H130; lane 6, VLU-002.

(Moreno-Arribas et al. 1999, *J. Agric. Food Chem.*)

4046 *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4046-4053

Environmental Conditions during Vegetative Growth Determine the Major Proteins That Accumulate in Mature Grapes

SARA MONTEIRO †, MARIA A. PIC, ARRÁ-PEREIRA †, §, ARTUR R. TEIXEIRA †, VIRGÍLIO B. LOUREIRO †, AND RICARDO B. FERREIRA †, ‡, #
 Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 1549-017 Lisboa, Portugal; Escola Superior Agrária de Castelo Branco, 6001 Castelo Branco Codex, Portugal; and Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Apartado 127, 2781-901 Oeiras, Portugal

Le condizioni ambientali influenzano l'accumulo di proteine negli acini maturi di cultivar di *Vitis vinifera*



Le piante attivano diversi meccanismi di difesa contro stress ambientali o da patogeni. Tra queste la sintesi di appropriate proteine sembra essere essenziale per sopravvivere.

Un esempio ben documentato è la sintesi di "heat shock proteins" per tollerare gli stress termici.

Le infezioni fungine sono usualmente combattute con la produzione di proteine correlate a patogeni (Pathogenesis-Related proteins).

Normalmente queste proteine sono espresse a bassi livelli all'interno delle cellule ma si accumulano come risposta di difesa ad attacchi fungini o in seguito ad altri induttori.

La produzione di PR proteine aumenta notevolmente durante la maturazione dell'acino, e le due principali proteine identificate nella risposta all'attacco di patogeni fungini sono chiamate:

Chitinase e Thaumatin like protein.

Le **thaumatin like protein** sembra siano in grado di inibire l'infezione da patogeni facilitando la formazione di pori nella membrana plasmatica dei funghi incrementando la loro permeabilizzazione.

Le **chitinase** sembrano in grado di degradare la parete cellulare dei funghi patogeni idrolizzando la chitina, la principale componente di tale parete.



4046 *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4046-4053

Le proteine che appartengono alla famiglia delle PR proteins sono tipicamente stabili a pH acidi e molto resistenti ai fenomeni di proteolisi.

Questo significa che durante la produzione di vino vengono selezionate le proteine PR dell'acino d'uva.

La combinazione di un pH basso con l'elevata attività proteolitica presente durante la fermentazione assicura che solo le proteine resistenti a queste condizioni (come le PR proteins) possano sopravvivere durante il processo di vinificazione.

Secondo gli autori le proteine PR presenti nei vini sono tecnologicamente importanti in quanto possono provocare torbidità abbassando così il valore commerciale del prodotto. Sia le chitinases che le thaumatin-like proteins persistono attraverso il processo di vinificazione causando intorbidimento e formazione di sedimenti nel vino.

È stato osservato che alcune delle proteine presenti negli acini sono espressi in risposta a stress biotici e/o abiotici suggerendo che la componente proteica presente nell'uva matura può dipendere da precise condizioni ambientali e patologiche che si verificano durante la crescita vegetativa.



4046 *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4046-4053

Per studiare questo fenomeno uva matura (*Vitis vinifera* cv. Moscatello) è stata raccolta dalla stessa vigna in due anni consecutivi (1999 e 2000). Il vino ottenuto da quest'uva è risultato possedere differenti proporzioni di proteine e soprattutto di proteine appartenenti alla famiglia delle PR.

Questo può essere dovuto alle diverse situazioni che si possono originare durante le procedure di vinificazione ma anche all'importante ipotesi per cui diverse condizioni ambientali (stress) possono portare ad un'espressione differenziale e all'accumulo di proteine nell'uva matura.

Le analisi consistono in elettroforesi bidimensionali. In particolare sono state analizzate le proteine presenti nell'uva matura raccolta nel 1999 e nel 2000.

Il risultato è stato il seguente: mentre l'uva matura del 2000 possedeva un più elevato contenuto proteico, l'uva del 1999 conteneva una più elevata eterogeneità di polipeptidi.

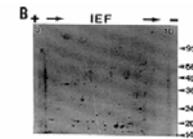
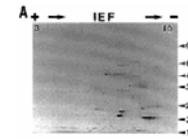
Considerando che l'uva era stata raccolta nella stessa vigna in due anni consecutivi è risultato sorprendente come le condizioni ambientali e patologiche potessero influenzare il pattern proteico.



4046 *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4046-4053

1999

2000



L'uva matura con un più alto contenuto di proteine (Moscatello 2000) possiede più alta eterogeneità di polipeptidi correlati a patogeni che diventano proteine fastidiose nel vino, cosa che non accade per l'uva con un più basso contenuto proteico (Moscatello 1999).

È stato osservato che il 1999 è stato un anno particolarmente piovoso il che non favorisce lo sviluppo di muffe polverose (uno dei patogeni più diffusi in Palmela, Portogallo), e di conseguenza l'uva raccolta nel 1999 ha mostrato un più basso contenuto proteico.

Nel 2000 le condizioni climatiche (alta umidità e alta temperatura durante la primavera) hanno favorito lo sviluppo di tali muffe e di conseguenza l'uva era caratterizzata da un più alto contenuto di proteine PR.

4046 *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 4046-4053

Plant Physiol. (1998) 117: 465-472

Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a Developmentally Controlled Defense Response during Fruit Ripening in Grape

Ron A. Salzman, Irina Tikhonova, Bruce P. Bordelon, Paul M. Hasegawa, and Ray A. Bressan*
Center for Plant Environmental Stress Physiology, Purdue University, 1165 Horticulture Building, West Lafayette, Indiana 47907-1165

Le chitinase e le thaumatin like protein sono in grado di agire contro due principali patogeni fungini della vite, *Guignardia bidwellii* and *Botrytis cinerea*.



Guignardia bidwellii



Botrytis cinerea



È stato evidenziato che l'accumulo di proteine antifungine può essere accompagnato in alcuni casi dall'accumulo di zuccheri durante la maturazione dell'acino, ed entrambi i fenomeni sembrano correlati con lo sviluppo di resistenza ai patogeni che si verifica nei frutti durante la maturazione.

L'accumulo di queste proteine in combinazione con lo zucchero costituisce un ulteriore meccanismo di difesa contro fitopatogeni nei frutti in fase di maturazione.

Moderati livelli di zuccheri possono incrementare la velocità di colonizzazione di alcuni patogeni fungini probabilmente perché rappresentano un'importante fonte di C per i microbi.

Tuttavia elevati livelli di zuccheri possono far invertire questo effetto e dare origine al fenomeno della "high-sugar resistance", in quanto l'eccessiva quantità di zucchero sembra indurre cambiamenti osmotici nei funghi e sopprimere la loro colonizzazione della pianta.

Plant Physiol. (1998) 117: 465-472

E' stato ipotizzato che gli zuccheri possano agire come molecole segnale in grado di regolare l'espressione di geni che codificano per proteine antifungine.

Si sa che la quantità di zuccheri presenti nell'uva influenza la percentuale di alcool che si forma.
Un più basso contenuto zuccherino porta ad un vino con una più bassa percentuale di alcool.

Plant Physiol. (1998) 117: 465-472



Use of Electrospray Mass Spectrometry for Mass Determination of Grape (*Vitis vinifera*) Juice Pathogenesis-Related Proteins: A Potential Tool for Varietal Differentiation
Yoji Hayasaka et al.
J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 1830-1839



I grandi vini del mondo sono prodotti da un numero relativamente piccolo di cultivar appartenenti ad una singola specie di vite (*Vitis v.*)
Questo implica che queste cultivar siano evolutivamente correlate.
Molte delle attuali viti da vino sono il prodotto di incroci accidentali tra varietà cresciute vicine le une alle altre nella stessa vigna, metodo diffuso nel periodo medioevale.

Esempi tipici:

Cabernet Sauvignon

Chardonnay



Souvignon Blanc X Cabernet franc

Pinot Noir X Gouais Blanc



Circa 5000 cultivar di vite



Metodi di identificazione:
150 tratti ampelografici

→ Vitigni sconosciuti devono essere cresciuti nelle stesse condizioni ambientali di vitigni noti per identificazione con un alto grado di certezza.
Non applicabili a succhi o vino

Marcatori molecolari come MS

→ Ottima e sicura tecnologia oggi ampiamente utilizzata sia su DNA estratto da tessuti vegetali che da mosto.

Difficilmente applicabile al vino alcuni giorni dopo fermentazione in seguito al rilascio di nucleasi dai lieviti durante la fermentazione stessa.



Negli ultimi anni è stato evidenziato che tutte le cultivar di vite sintetizzano un set di proteine PR successivamente all'invaiaura (cioè all'inizio della maturazione) e che queste proteine sono identiche a quelle responsabili di formare precipitazioni nel vino.



Queste proteine a differenza del DNA sono stabili nel vino anche dopo un prolungato periodo di stoccaggio ed è ormai accertato che un certo numero di isoforme esistono all'interno di diverse varietà.
Le masse molecolari di queste isoforme differiscono nelle diverse varietà grazie a piccole differenze di sequenza dei loro rispettivi geni.



Poiché piccole ma individuabili quantità di queste stabili PR proteine in particolare PR-5 (Thaumatococcus) e PR-3 (Chitinasi) possono persistere nel vino anche in seguito alla stabilizzazione proteica mediante bentonite, le "grape protein" potrebbero costituire un "tag" molecolare per l'identificazione varietale dei vitigni che sono stati usati per produrre quel dato vino.

La spettrometria di massa ha un potere risolutivo maggiore delle tecniche elettroforetiche.



Proteine con massa compresa tra i 13 e 33 kDa sono state trovate succhi di 19 diverse varietà di viti (*Vitis vinifera*) e sono state identificate principalmente come proteine PR-5 (Thaumatococcus-like) e PR-3 (Chitinases). Piccole ma consistenti differenze nelle masse molecolari sono state osservate paragonando proteine identiche ma provenienti da cultivar diverse. Queste differenze persistono in frutti raccolti in anni diversi e da piante provenienti da luoghi diversi. Definendo 4 diverse masse per le proteine PR-5 (range 21239-21272 Da) e nove diverse masse per le proteine PR-3 (range 25330-25631 Da), ed usando l'analisi statistica il metodo sviluppato è utile per l'identificazione varietale di vitigni cresciuti in luoghi diversi sulla base della composizione delle PR protein del succo di uva.

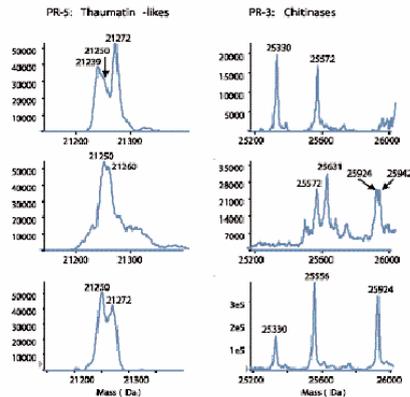


Figure 1. A typical example of the mass-patterns obtained by electropray mass spectrometry of juice from from three different grape varieties.

