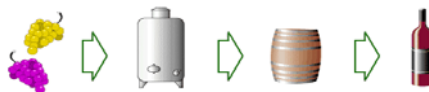




# LAFFORT - INFO

NUMERO  
20  
FEBBRAIO  
2002



## MANNOPROTEINE E STABILITÀ TARTARICA DEI VINI

Virginie MOINE-LEDOUX  
Ricercatore SARCO distaccato presso  
la Facoltà di Enologia di Bordeaux  
relazione presentata a UDINE,  
il 25 Gennaio 2002

**Le mannoproteine costituiscono una famiglia di macromolecole in cui ogni elemento strutturale conferisce attività e proprietà differenti. Le metodologie industriali per l'estrazione sono 2: metodi chimici e metodi enzimatici. Essi portano all'ottenimento di preparazioni con caratteristiche differenti. In questo lavoro si è cercato di caratterizzare i due tipi di preparati, in riferimento al loro effetto sulla stabilità tartarica.**

### Introduzione

L'effetto delle macromolecole definite "colloidi protettori" sulla stabilità dei vini è nota da lungo tempo (1). Negli anni scorsi la tendenza generale è stata piuttosto di eliminare con filtrazioni o chiarificazioni drastiche questi colloidali (2) che limitano l'efficacia dei trattamenti fisici di stabilizzazione. Tra le molecole colloidali alcune hanno per origine l'uva, si tratta di tannini, polisaccaridi pectici, proteine. Altri sono di origine fungina, come i glucani della *Botrytis cinerea* o le mannoproteine liberate dai lieviti nel corso della fermentazione alcolica (3) o dell'autolisi (4). Queste ultime presentano proprietà stabilizzanti nei confronti degli intorbidamenti proteici (5,6) e delle precipitazioni tartariche (7,8).

Alle concentrazioni abitualmente riscontrate nei vini, le macromolecole definite colloidali protettori hanno il potere solo di ritardare la cristallizzazione dei sali di

acido tartarico senza inibirli completamente. Fino ad oggi pochi autori hanno cercato di isolare dal vino questi composti inibitori della cristallizzazione per metterne in evidenza e sfruttarne le loro proprietà stabilizzanti.

### 1. Evoluzione della stabilità tartarica dei vini bianchi nel corso dell'affinamento sulle fecce.

I vini bianchi, conservati in fusti di legno sulle fecce totali, dopo diversi mesi acquisiscono la stabilità tartarica, il che li dispensa da ulteriori trattamenti a freddo. Si tratta di una osservazione empirica molto comune e nota, che fino ad oggi però, non è stata completamente sviscerata da studi mirati. Tuttavia in virtù di questo fatto, a Bordeaux, la maggior parte dei vini bianchi secchi che non risultano stabili al mese di Marzo, dopo il loro primo inverno di vita, lo divengono al mese di Giugno o Luglio senza bisogno di freddo supplementare (Tabella 1).

Tabella 1 – Evoluzione della stabilità tartarica dei vini nel corso della loro conservazione sulle fecce.

misura della stabilità tartarica	Campionamento di Marzo (6 mesi sulle fecce)		Campionamento di Luglio (10 mesi sulle fecce)	
	Test al freddo osservazione visiva	Temperatura saturazione	Test al freddo osservazione visiva	Temperatura saturazione
Graves 1-1994	***	16°C	0	16°C
Graves 2-1994	***	15°C	0	15°C
Bordeaux -1995	****	18°C	0	18°C
Graves 1995	***	18°C	0	18°C

\*\*\* : presenza di cristalli. 0 : assenza di cristalli

Se questi stessi vini non vengono conservati sulle fecce, devono essere trattati a freddo per raggiungere la stabilità tartarica. Questo miglioramento della stabilità nel corso della maturazione dei vini sulle fecce può essere messo in evidenza solo impiegando

test di cristallizzazione. Infatti la misura della temperatura di saturazione (Tsat) del vino resta più o meno costante nel tempo, ed anche nel vino conservato sulle fecce farebbe presupporre instabilità (Tsat > 12,5 °C).

Evidentemente, alcune macromolecole, verosimilmente mannoproteine, cedute dal lievito nel corso della maturazione sulle fecce, sono composti inibitori della cristallizzazione.

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

I due costituenti principali della parete cellulare dei lieviti sono il glucano e le mannoproteine. Queste ultime sono costituite da una frazione peptidica e da una frazione polisaccaridica rappresentata essenzialmente da mannosio. Esse 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 che noi abbiamo scelto è quello descritto da Peat et al (9), 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 noi abbiamo messo a punto (10) consiste nel digerire la parete dei lieviti con una preparazione industriale di  $\beta$ -glucanasi, (GLUCANEX Novozymes). Il suo impiego è autorizzato in enologia per l'idrolisi dei glucani della *Botrytis* e per facilitare la filtrazione dei vini (11).

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

Le preparazioni di mannoproteine ottenute in laboratorio per digestione della parete dei lieviti con Glucanex (MEE) inibiscono la cristallizzazione tartarica nei vini sia bianchi, rosati che rossi. La stabilità è valutata mantenendo il vino per 6 giorni a  $-4^{\circ}\text{C}$ . La stessa dose (25 g/hl) di mannoproteine estratte dal calore (MEC) non evidenzia alcun effetto stabilizzante.

L'analisi di questi 2 preparati sottolinea che esistono differenze compositive sostanziali (Tabella 3)

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



Figura 1 – Analisi HPLC ad esclusione molecolare di mannoproteine estratte con il calore (a) e per digestione enzimatica (b).

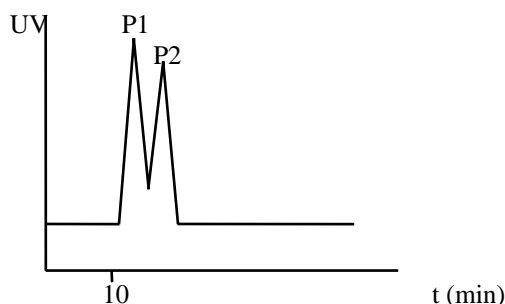


Figura 2 : Frazionamento per esclusione molecolare delle mannoproteine estratte per via enzimatica dalla parete dei lieviti.

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

### 3. Isolamento e caratterizzazione delle mannoproteine responsabili della stabilità tartarica.

Per fare ciò, in un primo tempo, abbiamo separato le mannoproteine secondo la loro dimensione, per cromatografia liquida di esclusione molecolare ad alta prestazione, in due frazioni indicate con P1 e P2 (Figura 2).

Le due frazioni isolate sono addizionate, a dosi crescenti, ad un vino che viene sottoposto in seguito ad un test a freddo (figura 3).

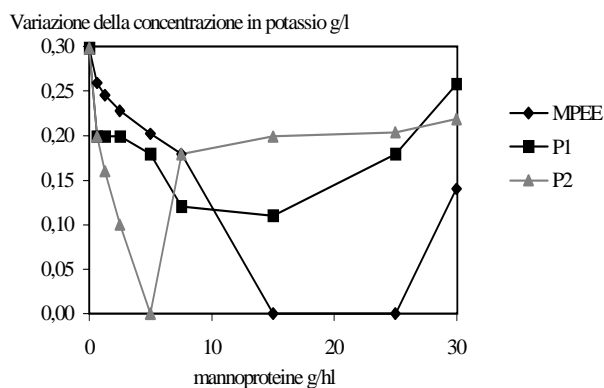


Figura 3 : Influenza dell'aggiunta di MPEE, P1 e P2 sulla stabilità tartarica di un vino bianco.

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. 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. 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 -D-metilmannoside. Le 2 frazioni così separate sono addizionate ad un vino che viene in seguito sottoposto ad un test a freddo (Figura 4).

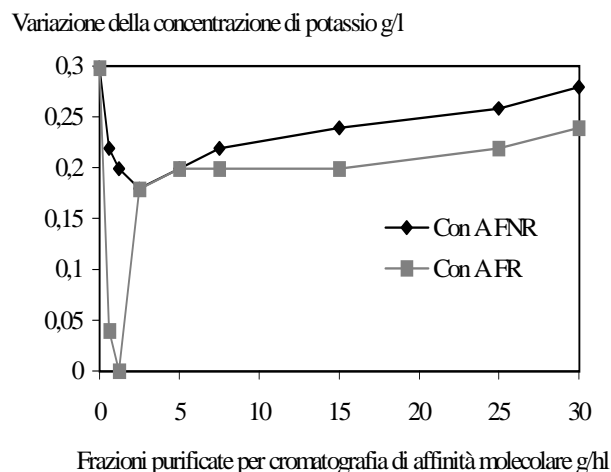


Figura 4 – Influenza dell'aggiunta delle frazioni separate per cromatografia d'affinità sulla stabilità tartarica di un vino bianco.

Solo la frazione trattenuta previene la cristallizzazione già a partire da una dose molto bassa

(12,5 mg/l). Questa frazione possiede un potere inibitore elevato, è composta da mannoproteine fortemente glicosidate 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  $\beta$ -mercaptoetanolo (Figura 5), 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) (12). 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 6) mostra che il picco numero 2 è 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.

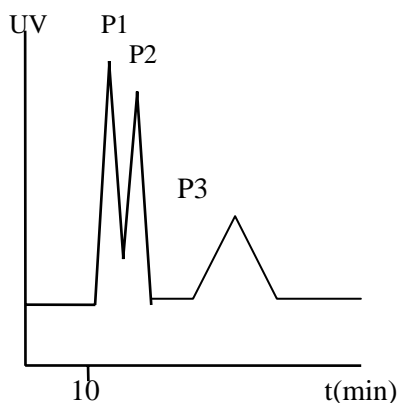


Figura 5 : Analisi per HPLC di esclusione molecolare di un estratto di mannoproteine ottenuto per via enzimatica da pareti di lievito, trattate su SDS e  $\beta$ -mercaptoetanolo.



Figura 6 : Analisi per HPLC ad esclusione molecolare degli estratti mannoproteici ottenuti per idrolisi enzimatica della parete di lieviti FBYII-24 (a) e FBYII-37 (b).

L'applicazione degli estratti di mannoproteine ottenuti per digestione enzimatica della parete dei lieviti allo scopo di stabilizzare i vini dalle

precipitazioni tartariche è stata oggetto di un brevetto francese ed internazionale il cui depositario è la Facoltà di Enologia di Bordeaux II (10). La società

Laffort Oenologie sviluppa l'industrializzazione di questo nuovo prodotto di stabilizzazione che si chiamerà Mannostab®.

#### 4. Risultati sperimentali su scala industriale di impiego di MANNOSTAB®.

La stabilizzazione tartarica indotta con l'aggiunta di Mannostab® può essere misurata solo con test di cristallizzazione, in quanto non si tratta di un metodo di stabilizzazione per eliminazione di ioni, ma di una protezione colloidale dovuta all'aggiunta di un inibitore della cristallizzazione. La quantità di Mannostab® necessario alla stabilizzazione, è variabile in funzione del grado di instabilità del vino (Tabella 4)

Tabella 4 – Stabilizzazione di differenti vini impiegando Mannostab®.

vini testati	Dose di Mannostab®		
	15 g/hl	20 g/hl	25 g/hl
vini bianchi (18)	5	9	4
vini rosati (11)	6	5	-
vini rossi (16)	7	9	-

Le mannoproteine sono stabili ed il loro effetto protettore nei confronti delle cristallizzazioni tartariche duraturo.

Ad esempio se uno stesso vino bianco viene trattato in parte con acido metatartrico ed in parte con Mannostab®, dopo 10 settimane di conservazione a

30 °C, l'esecuzione di un test di stabilità a freddo mostra che il campione trattato con acido metatartrico cristallizza, mentre quello addizionato di Mannostab® è perfettamente stabile. (Tabella 5).

Dal 1997 la società Laffort Oenologie ha ottenuto dalla DGCCRF l'autorizzazione alla sperimentazione del Mannostab® sul territorio francese. I risultati degli esperimenti (Tabella 6) mostrano che l'efficacia del trattamento con Mannostab® è uguale o superiore ai trattamenti classici di stabilizzazione (stabilizzazione a freddo, processi per contatto, aggiunta di acido metatartrico) ed anche per periodi di conservazione in bottiglia superiori a tre anni non si ha comparsa di precipitati tartarici.

Tabella 5 – Influenza sulla stabilità tartarica della conservazione a 30 °C per 10 settimane, di un vinodopo aggiunta di acido metatartrico o di Mannostab®.

	differenza in concentrazione di potassio (mg/l) dopo 6 giorni di conservazione a -4°C
Non trattato	200
Ac metatartrico 10 g/hl	260
Mannostab® 25 g/hl	0

Tabella 6 – Risultati di stabilità tartarica espressa come tempo di comparsa di cristalli di tartrato nel corso della conservazione del vino a -4°C (risultati al 15/07/2001)

Vini controllati	Non trattato	Trattamenti di stabilizzazione		
		Freddo	Ac. metatartrico	MANNOSTAB®
VDT rosso (26 hl)	3 giorni	8 giorni	-	> 41 mesi
Spumante (26 hl)	4 giorni	-	-	> 41 mesi
VDT rosso (128 hl)	3 giorni	4 giorni	4 giorni	> 40 mesi
VDT rosso (400 hl)	3 giorni	4 settimane	-	> 40 mesi
VDC rosso (64 hl)	5 giorni	-	1 mese	> 34 mesi
VDP rosso (128 hl)	5 giorni	> 34 mesi	-	> 34 mesi
VDT bianco (125 hl)	3 giorni	> 17 mesi	1 mese	> 35 mesi
Bx bianco 97 (100 hl)	4 giorni	-	-	> 36 mesi
Bx bianco 97 (100 hl)	4 giorni	> 34 mesi	-	> 34 mesi
Bx rosso 97 (250 hl)	4 giorni	> 33 mesi	-	> 33 mesi
Bx rosso 97(250 hl)	4 giorni	> 33 mesi	-	> 33 mesi

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

I vini trattati nel corso dell'ultima campagna di sperimentazione (2001) subiscono inoltre un particolare test di variazione di temperatura che

consiste nell'alternare 2 settimane a 25 °C e 2 settimane a -4 °C (Tabella 7). Dopo 4 mesi di conservazione i vini trattati con l'acido

metatartrico sono instabili, solo i vini trattati a freddo ed i vini trattati con Mannostab® non presentano precipitati cristallini.

### Conclusioni

Questi lavori spiegano molto chiaramente i meccanismi di stabilizzazione spontanea dei vini bianchi nel corso del loro affinamento sulle fecce in barriques. Le conoscenze così acquisite danno adito ad uno sviluppo tecnologico potenziale particolarmente importante per la stabilizzazione tartarica dei vini. Infatti, eccezion fatta per alcuni grandi vini da invecchiamento, la maggior parte dei vini, siano essi bianchi, rosati o rossi, risultano al termine del loro periodo di maturazione, instabili dal punto di vista delle precipitazioni tartariche. La possibilità di renderli stabili senza ricorrere a trattamenti fisici, solamente addizionando un colloide protettore biologico stabile, che fa già naturalmente parte della composizione del vino, sembra una soluzione percorribile a breve termine.

Tabella 7 – Risultati prove industriali di stabilizzazione tartarica con Mannostab®. La stabilità tartarica è espressa dal ritardo di comparsa dei cristalli di tartrato in seguito a conservazione a 25 °C (2 settimane) e -4 °C (2 settimane) alternate (risultati al 20/12/01).

Tipo di vino	Trattamento di stabilizzazione			
	non trattato	Mannostab®	Freddo	Ac. metatart.
Vin dolce DOC Jurançon	19 gg	>6 mesi	-	3 mesi
Vino bianco secco DOC Jurançon	17 gg	> 6 mesi	-	4 mesi
Vino bianco secco DOC Bordeaux	17 ggi	> 2 mesi	> 2 mesi	-

### Bibliografia

- (1) RIBEREAU-GAYON J., 1933. Vins et colloïdes protecteurs, in : Bull. Soc. Chim., 53, 1162.
- (2) FEUILLAT M, PEYRON D. et BERGER J. L., 1987. Influence de la microfiltration tangentielle des vins sur leur composition physico-chimique et leurs caractères sensoriels. Applications aux vins de Bourgogne, in : Bulletin O.I.V., 673-674.
- (3) LLAUBERES R. M., 1988. Les polysaccharides sécrétés dans les vins par *Saccharomyces cerevisiae* et *Pediococcus* sp. Thèse de doctorat es science, Université de Bordeaux II.
- (4) FEUILLAT M., FREYSSINET M., et CHARPENTIER C., 1989. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules : polysaccharides et protéines. Vitis, 28, 161-176.
- (5) LEDOUX V., DULAU L. et DUBOURDIEU D., 1992. Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies, in : J. Int. Sci. Vigne Vin, 26, 239-251.
- (6) WATERS E. J., WALLACE W., TATE M. E. et WILLIAMS P., 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine, in : J. Agric. Food. Chem, 41, 724-730.
- (7) LUBBERS S., LEGER B., CHARPENTIER C. et FEUILLAT M., 1994. Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution modèle in : J. Int. Sci. Vigne Vin, 27,n°1, 13-22.
- (8) DUBOURDIEU D. et MOINE V., 1995. In : *Oenologie* 95. Lavoisier TEC et DOC Ed., 385-390.
- (9) PEAT S., WHELAN W. J. et EDWARDS T. E., 1961. Polysaccharide of baker's yeast. Part IV. Mannan, in : J. Chem. Soc. London, 28-35.
- (10) DUBOURDIEU D. et MOINE-LEDOUX V., 1994. Produit biologique pour la stabilisation physico-chimique d'un vin. Brevet d'invention N° de publication 2 726 284.
- (11) DUBOURDIEU D., VILLETAZ J.C., DESPLANQUES C. et RIBEREAU-GAYON P., 1981. Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris, in : Conn. Vigne Vin, 15,n°3, 101-177.
- (12) KLIS F. M., 1994. Review : Cell Wall Assembly in Yeast, in : YEAST, 10, 851-869.