N° 6 • GIUGNO 2023

l'Enologo

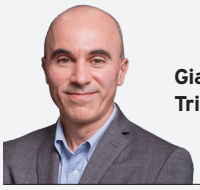
DAL 1893 LA VOCE DI **ASSOENOLOGI**

L'ENOTURISMO COMPIE TRENT'ANNI IL SUCCESSO DOPO LA PANDEMIA

Editoriale del presidente
Romagna nostra

20121 MILANO - VIA PRIVATA VASTO, 3 - TEL 02.99785721 - FAX 02.99785724 - POSTE ITALIANE - SPEDIZIONE IN ABBONAMENTO POSTALE 70% CN/BO

A cura di:



Gianni Triulzi[1]

Alessandra Basana[2]

Pietro Bighiani[3]

LE PROTEINE VEGETALI IN ENOLOGIA: QUALI PRODOTTI SCEGLIERE PER OTTENERE LA PERFORMANCE ENOLOGICA DESIDERATA?

Le proteine vegetali sono chiarificanti enologici adeguati alle attuali necessità di settore il cui utilizzo è in costante crescita. È importante conoscerne le caratteristiche per ottenere il miglior risultato applicativo

Nella storia dell'enologia sono moltissimi i riferimenti all'uso delle proteine. I prodotti utilizzati e gli obiettivi applicativi sono però cambiati tanto negli anni per venire in contro alle necessità del settore dettate dalle esigenze del mercato. In questo articolo sintetizzeremo, dettagliandola nei vari aspetti, la performance enologica delle proteine vegetali.

L'uso delle proteine in enologia

Circa duemila anni fa i romani trasformarono il vino da bevanda per pochi eletti a "nutrimento e piacere di massa"(Roma caput vini, Giovanni Negri-Elisabetta Petrini) diffondendolo in ogni angolo dell'impero. L'enorme aumento dei volumi prodotti richiese un miglior processo produttivo, visto che la qualità media di ciò che veniva commercializzato era spesso discutibile. A tal fine si svilupparono numerose pratiche enologiche che oltre al taglio, ben noto e utilizzato all'epoca, permisero di perfezionare la qualità generale dei prodotti. Tra le tante soluzioni utilizzate vi era il trattamento con latte, uova/albumi, farina di pisello selvatico ecc. (La vinificazione dell'epoca Romana, dove tutto ha avuto inizio: le pratiche enologiche – Annalisa Motta). Queste applicazioni, basate sull'uso dei prodotti all'epoca disponibili, si sono evolute nel corso dei secoli e sono arrivate fino ai giorni nostri rappresentando a tutti gli effetti gli antenati delle attuali pratiche di chiarifica.

Facendo un lungo balzo avanti ed arrivando agli ultimi decenni di storia enologica possiamo notare che, seppure il fine di migliorare le caratteristiche generali del vino non sia variato, oggi sono stati minuziosamente dettagliati gli obiettivi enologici (es. riduzione dell'astringenza, miglioramento della tonalità di colore, aumento della pulizia olfattiva ecc.) e purificati i composti utilizzati (es: da latte a caseinato di potassio, da uova ad albumina, ecc.).

Le vicende legate alla comparsa dell'encefalopatia spongiforme bovina (sindrome della mucca pazza - Regno Unito 1986), seguite dalla proibizione dell'albumina di sangue insieme alla diffusione di allergie ed intolleranze causate dall'assunzione di proteine del latte e dell'uovo, hanno reso necessaria la ricerca di alternative alle proteine chiarificanti di origine

[1] Research and Development manager Enartis

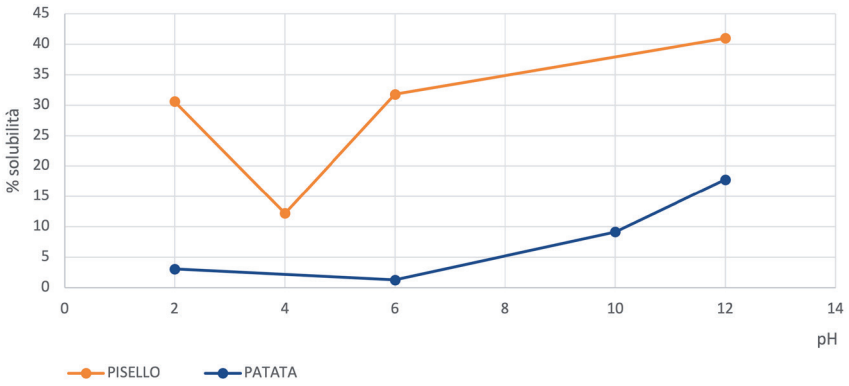
[2] Research and Development specialist Enartis

[3] Product specialist Enartis

animale che godessero di una migliore reputazione e salubrità.
Negli ultimi vent'anni sono stati effettuati molti studi sull'applicazione enologica di varie categorie di proteine di origine vegetale quali proteine di leguminose (soia, pisello, lupino), cereali (frumento, mais e riso) e tuberose quali patata.
Tra le possibili fonti vegetali sopra citate, considerata la potenziale allergenicità (allegato III direttiva europea 2007/68/EC) e la reale disponibilità dei prodotti, oggi solo le proteine di pisello e di patata hanno un' applicazione sempre più diffusa ed in costante crescita. Va precisato che la monografia OIV relativa alle proteine vegetali (COEI-1-PROVEG 2016) attualmente in vigore, considera utilizzabili le proteine di frumento, pisello e patata. Tale monografia verrà aggiornata escludendo dall'utilizzo enologico le proteine di frumento (glutine). Questa scelta è dovuta al fatto che, sebbene sia stata provata con test ELISA l'assenza di residui di glutine post trattamento, per motivi di potenziale allergenicità nessun produttore è interessato a farne uso.

Le proteine di pisello: loro processo produttivo e caratteristiche chimiche

Le proteine di pisello vengono estratte dal pisello giallo (*Pisum sativum*).
Il processo produttivo può essere suddiviso in due fasi: la prima a secco e la seconda che contempla uno stadio intermedio in liquido.
Durante la prima fase avviene la rimozione meccanica dell'involucro del seme di pisello (tegumento) composto principalmente da fibre insolubili. A seguire, il pisello viene macinato (fase di molitura) fino all'ottenimento di una farina costituita da particelle di dimensione omogenea contenenti proteine, amidi e fibre parzialmente solubili. A questo punto inizia la seconda fase in cui la farina viene messa in soluzione a pH e temperatura opportuni e attraverso stadi di centrifugazione viene separata la fase solubile contenente anche le proteine da ciò che rimane in sospensione. Successivamente, per ottenere il concentrato proteico, le proteine vengono portate al loro punto isoelettrico, fatte precipitare ed atomizzate. Il risultato del processo è una polvere fine omogenea con un contenuto proteico superiore all'85%. È importante sottolineare che la gestione delle temperature nelle varie fasi di processo influisce enormemente sulle proprietà dei concentrati proteici ottenuti.
Molti studi esistenti, effettuati per caratterizzare chimicamente le proteine di pisello, indicano che tali proteine sono rappresentate da globuline ed albumine con funzione di proteine di stoccaggio utilizzate come fonte di azoto durante la fase di germinazione del seme. Le globuline, presenti in maggiori quantità, sono rappresentate da legumina, vicillina e convicillina. Dal punto di vista tridimensionale queste molecole si presentano con struttura quaternaria compatta costituita da esameri e tetrameri con massa molecolare variabile tra i 380 KDa (legumina esamero) ed i 150 KDa (vicillina trimero).



Graf. 1 - Solubilità in funzione del pH

Fig. 1A - Proteina di pisello reidratata al 5% in acqua a pH 3,5

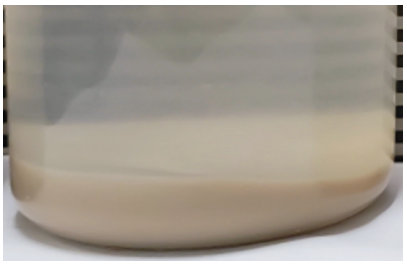


Fig. 1B - Proteina di patata reidratata al 5% in acqua a pH 3,5

Le proteine di patata: loro processo produttivo e caratteristiche chimiche

Le proteine di patata (*Solanum tuberosum*) vengono prodotte da due diversi processi industriali di trasformazione della patata: quello di produzione dell'amido e quello di produzione delle patatine per frittura. Nel primo caso le proteine si trovano nel succo di patata, dopo la rimozione dell'amido, in quantità circa pari all'1,5% in sostanza secca. Nel secondo caso le proteine si trovano nell'acqua di lavaggio delle patatine preparate alla frittura e nel materiale che si produce per perdite da taglio e raspatura della materia prima.
Anche per queste proteine la fase di separazione/purificazione, basata sulla gestione di temperatura, punto isoelettrico, idrofobicità, filtrazione, incide fortemente sulle proprietà del prodotto ottenuto.
Dal punto di vista chimico tra tutte le proteine presenti nel succo di patata, il gruppo più omogeneo è quello rappresentato delle patatine. Tali composti, appartenenti alla famiglia delle glicoproteine, hanno massa molecolare pari a circa 40KDa e punto isoelettrico compreso tra 4,5 e 5,2. A pH neutro e temperatura ambiente la patatina si trova sotto forma di dimero stabilizzato da forze idrofobiche. Le variazioni di pH incidono in modo importante sulla sua struttura tridimensionale così

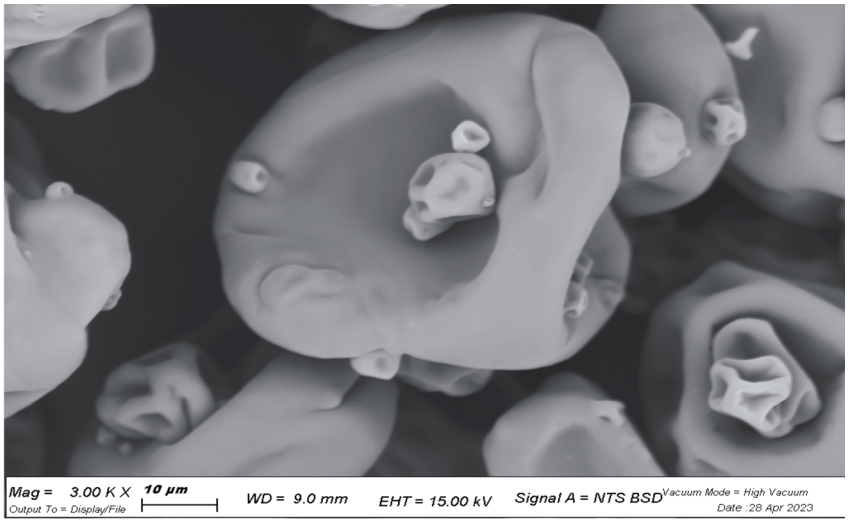


Fig. 2A - Proteina di pisello

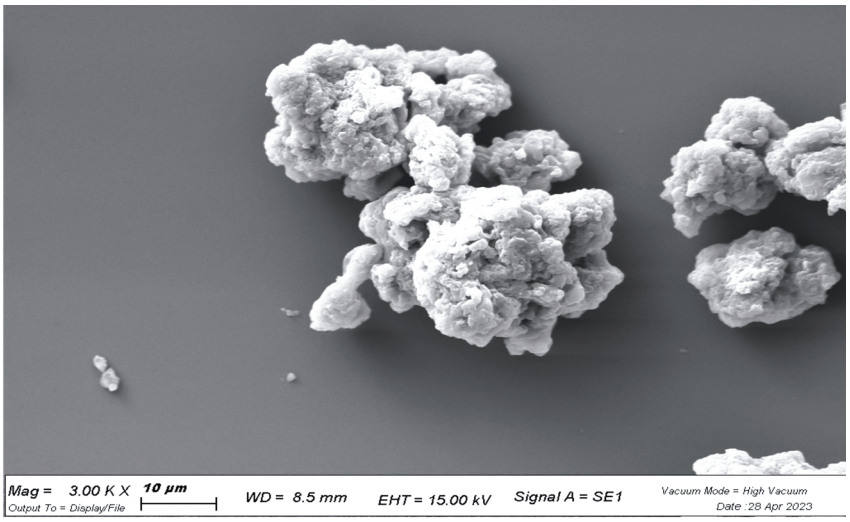


Fig. 2B - Proteina di patata

come la temperatura superiore a 60°C ne causa facilmente la denaturazione.

La solubilità differenzia fortemente le proteine vegetali dalle animali

È importante sottolineare che, a contrario delle proteine di origine animale, le proteine vegetali sono solubili solo in parte; una percentuale di prodotto, che può essere anche molto alta, svolgerà il suo effetto in sospensione grazie alla reattività legata alle caratteristiche superficiali delle particelle.
Il **graf. 1** riporta a titolo di esempio la solubilità in funzione del pH delle due proteine considerate.
Le **Fig. 1A** e **1B** mostrano la sospensione prodotta dalle due proteine vegetali a pH 3,5.
Le **Fig. 2A** e **2B** mostrano i dettagli della sospensione delle proteine fotografate con microscopio elettronico ad un ingrandimento pari a 3000 X.
La porzione proteica solubile è stata sottoposta ad elettroforesi (SDS-PAGE) al fine di dettagliarne le masse molecolari presenti. Quanto trovato viene proposto in **Fig. 3**. L'immagine evidenzia che la proteina di patata è caratterizzata da una banda prevalente corrispondente a circa 40 KDa (patatina) mentre la proteina di pisello è costituita da molti frammenti proteici distribuiti nel range 10-100 KDa.

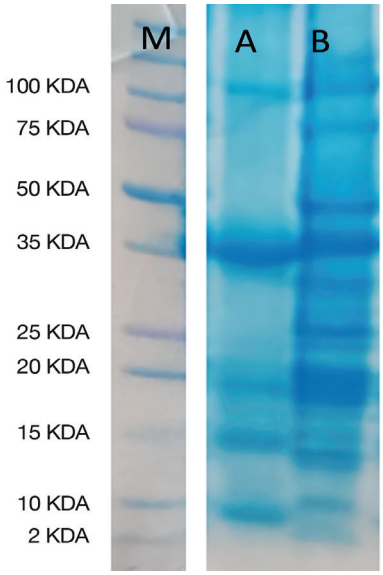
Quale la loro performance enologica?

Gli effetti sul vino delle due categorie di proteine considerate sono stati valutati monitorando i seguenti aspetti: efficacia illimpidente, gestione dell'ossidazione, riduzione dell'astringenza, effetto sull'instabilità colloidale, impatto sensoriale. Generalmente, in enologia, i dosaggi suggeriti di proteine di pisello e patata variano tra i 5 ed i 30 g/hL in funzione del momento di applicazione e dell'obiettivo prefissato. Le prove enologiche sono state eseguite standardizzando il dosaggio di 10 g/hL in tutte le prove ad esclusione della flottazione in cui il dosaggio applicato è stato pari a 5g/hL.

Efficacia illimpidente

La massa molecolare delle proteine vegetali influenza la loro capacità illimpidente, come evidenziato dal **Graf. 2**. Effettuando idrolisi controllate si può incrementare la capacità chiarificante delle proteine considerate.
A titolo di esempio comparativo una gelatina a basso grado di idrolisi (100 gradi Bloom) ha portato il vino Trebbiano a 5 NTU ed il Sagrantino a 2 NTU.
Nella **Fig. 4** riportata in seguito si mette in evidenza la capacità illimpidente di proteine di patata con diverso grado di idrolisi in due diversi vini. I campioni di vino trattato sono stati appositamente fotografati di fronte ad uno sfondo con righe nere orizzontali in modo da rendere maggiormente visibile la differenza di torbidità ottenuta.

Fig. 3 - Profilo elettroforetico della frazione solubile di proteine di patata (A) e pisello (B) rappresentativo delle caratteristiche medie dei prodotti presenti nel mercato. (M) marker di pesi mlecolari



Graf. 2 - Valori di torbidità a 48h dall'aggunta dei prodotti, effettuata su vino bianco Trebbiano pH 3,22 e vino rosso Sagrantino pH 3,45

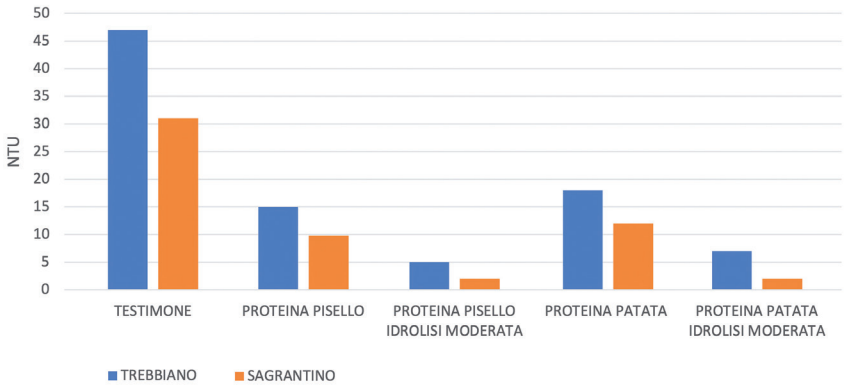
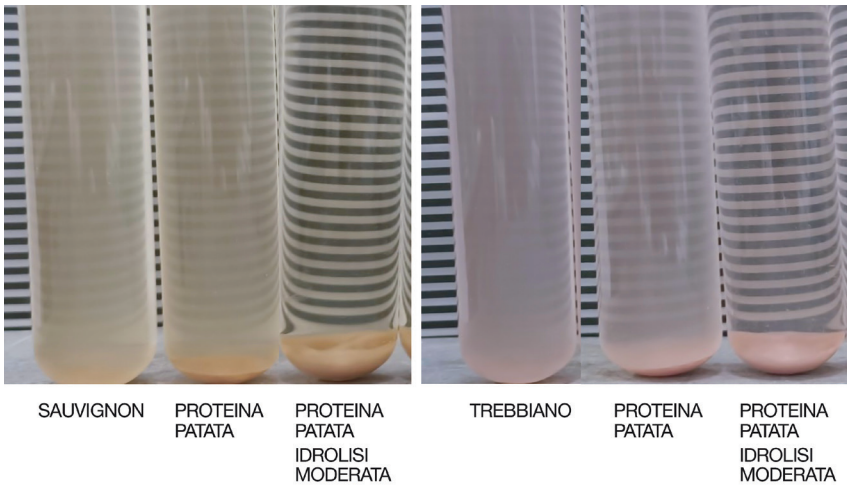
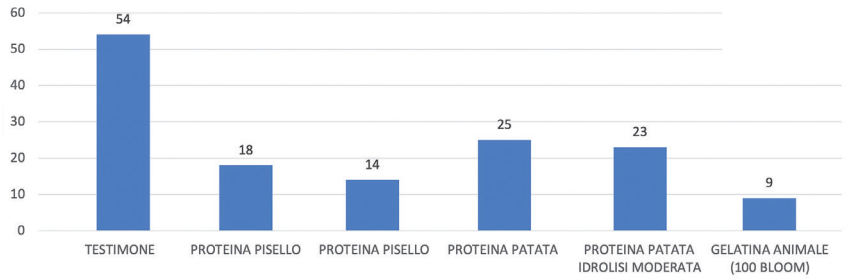


Fig. 4 - Prove di chiarifica. Torbidità dopo 48h dall'aggiunta dei prodotti su vino Sauvignon con pH 3,3 e vino Trebbiano 3,22



Graf. 3 - Prove di flottazione effettuate su mosto di moscato con torbidità di partenza pari a 600 NTU. Valori di torbidità dopo un'ora dalla fine del processo



Le proteine vegetali vengono comunemente utilizzate anche per la flottazione dei mosti. Si noti come la proteina di pisello a medio grado di idrolisi, oltre ad illimpidire, sia in grado di migliorare la tonalità del colore del mosto trattato. **Graf. 3** e **Fig. 5**.

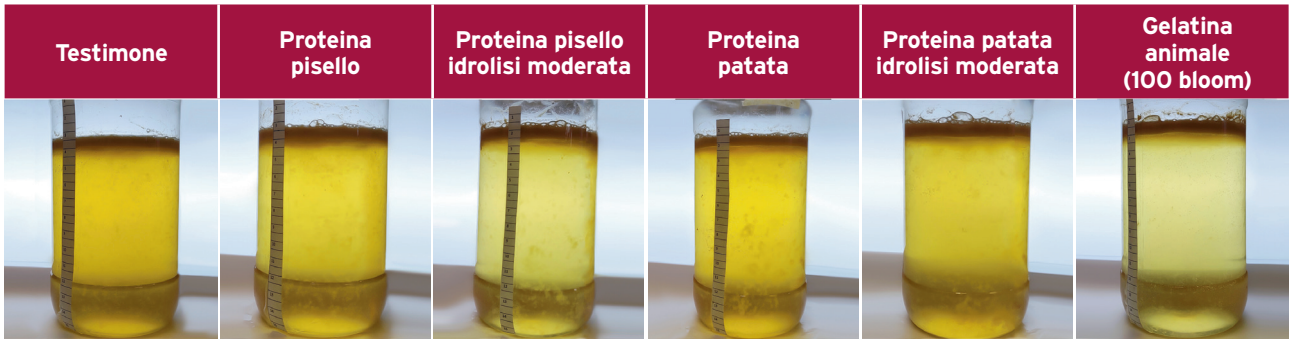
Gestione dell'ossidazione

Le proteine di pisello sono quelle più indicate per la riduzione dell'imbrunimento. Tale effetto può essere monitorato misurando la riduzione della densità ottica alla lunghezza d'onda di 420 nm, come mostrato nel **Graf. 4**. In questo caso la dimensione delle proteine non sembra influenzare tale proprietà. Le proteine di pisello risultano anche le migliori nella riduzione della concentrazione di ferro, metallo con effetto di catalizzatore di ossidazione, come evidenziato nel **Graf. 5**. in cui viene riportata la performance del PVI/PVP come termine di paragone.

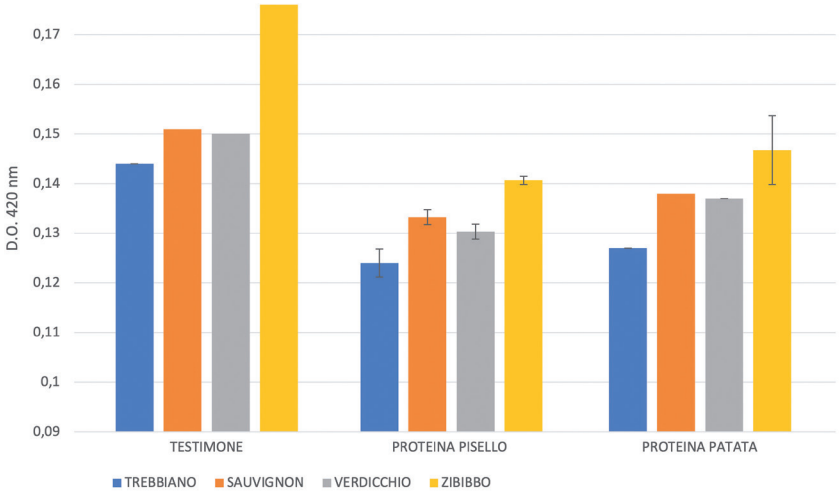
Riduzione dell'astringenza

Le proteine di patata sono quelle che reagiscono maggiormente con i tannini più astringenti. Prove di chiarifica effettuate su diversi vini hanno confermato tale peculiarità, come mostrato nel **Graf. 6**. La performance di una gelatina idrolizzata viene mostrata a titolo di paragone.
Nel **Graf. 7** si può notare come l'adeguato livello di idrolisi effettuato sulle proteine di pisello permetta di aumentarne l'efficacia nella riduzione dell'astringenza.

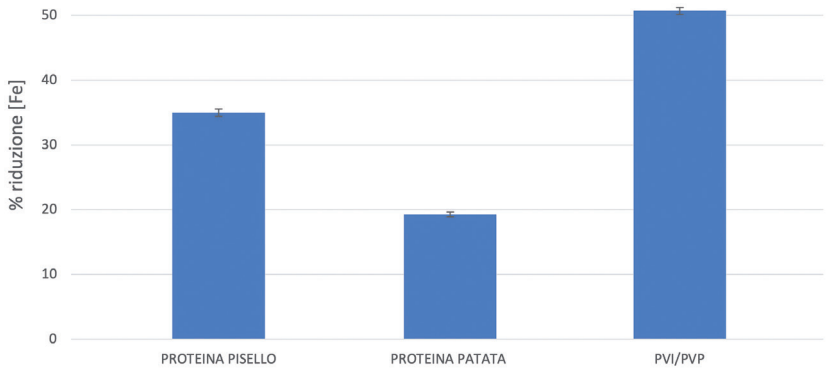
Fig. 5 - Prove di flottazione effettuate su mosto di moscato con torbidità di partenza pari a 600 NTU. Immagini acquisite dopo un'ora dalla fine del processo



Graf. 4 - Lettura media della densità ottica a 420 nm in seguito alla chiarifica con le principali proteine vegetali



Graf. 5 - Riduzione % media della concentrazione di ferro ottenuta in seguito a chiarifiche effettuate su diverse tipologie di vini con le principali proteine vegetali presenti sul mercato

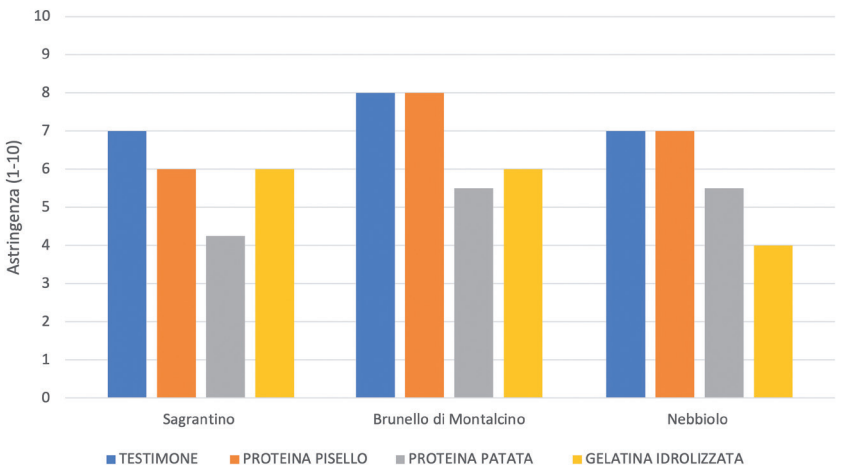


Riduzione dell'instabilitá proteica/colloidale

Vini bianchi instabili proteicamente chiarificati con proteine vegetali e sottoposti successivamente a test a caldo mostrano minori variazioni di torbidità come si nota nel **Graf. 8**. Tale comportamento farebbe presumere un effetto stabilizzante da parte delle proteine vegetali. Andando poi a verificare dettagliatamente con analisi HPLC la concentrazione delle proteine instabili (chitinasi e taumatine), non si verificano differenze degne di nota.

Quanto riportato evidenzia che ci possano essere ulteriori aspetti da chiarire meglio, probabilmente relativi all'interazione tra polifenoli, proteine ed altri colloidi, in cui i polifenoli agiscono da fattore di destabilizzazione proteica/colloidale.

Graf. 6 - Valori di astringenza di vini chiarificati con proteine vegetali e gelatina idrolizzata



Impatto sensoriale

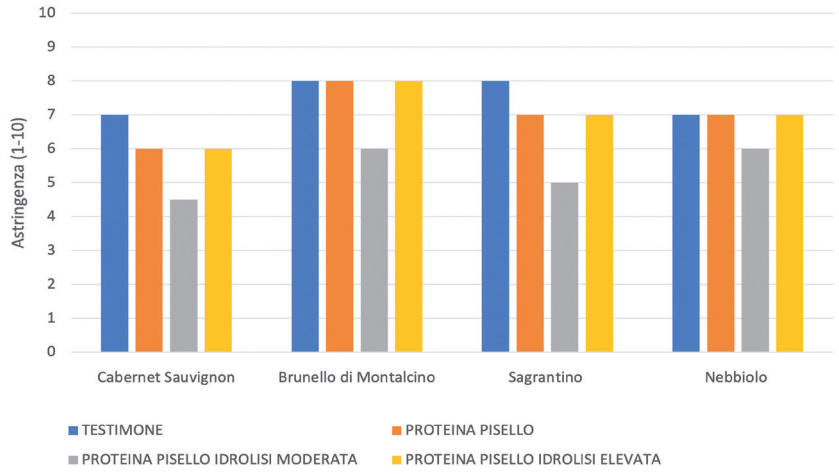
È noto che l'applicazione di dosaggi elevati di proteine vegetali possano apportare al vino sentori definiti genericamente come "note vegetali". Le prove applicative di molti prodotti presenti sul mercato hanno confermato che la scelta del prodotto ed il suo utilizzo al dosaggio corretto sono punti importanti da cui dipende il buon esito dell'applicazione.

Durante le prove di chiarifica effettuate, i numerosi campioni di vino trattati con proteine di pisello, patata e di origine animale sono stati sottoposti ad analisi GC prendendo in considerazione le principali categorie di composti aromatici. Facendo un'estrema sintesi dei risultati ottenuti è possibile affermare che i trattamenti non causano perdite significative di composti aromatici tipicamente presenti. È altresì importante sottolineare che in fase di degustazione i campioni chiarificati nella maggior parte dei casi risultino avere un profilo complessivo più pulito. A titolo di esempio di quanto descritto si riporta il **Graf. 9**.

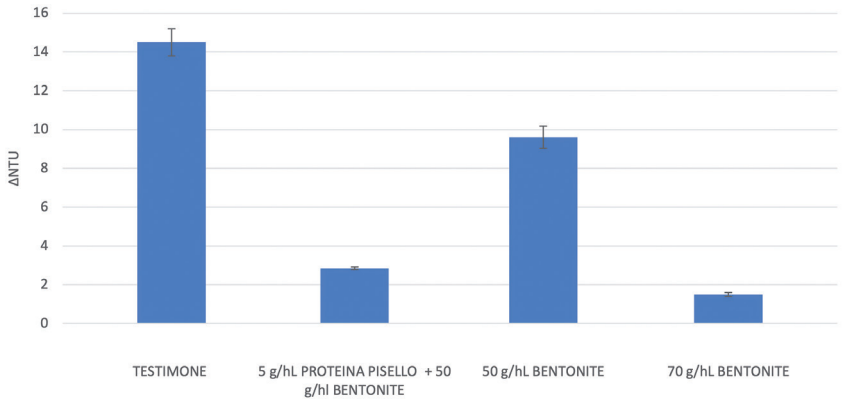
Conclusione

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di descrivere le caratteristiche ed i principali effetti enologici delle proteine di pisello e patata oltre ad effettuare la valutazione delle performance dei più comuni chiarificanti vegetali a disposizione del mercato enologico. I risultati ottenuti hanno evidenziato le principali attitudini delle due diverse categorie di proteine vegetali testate e sottolineato che, attraverso processi che ne modificano la reattività, è possibile in alcuni casi aumentarne la performance rendendole più adeguate alle esigenze di settore.

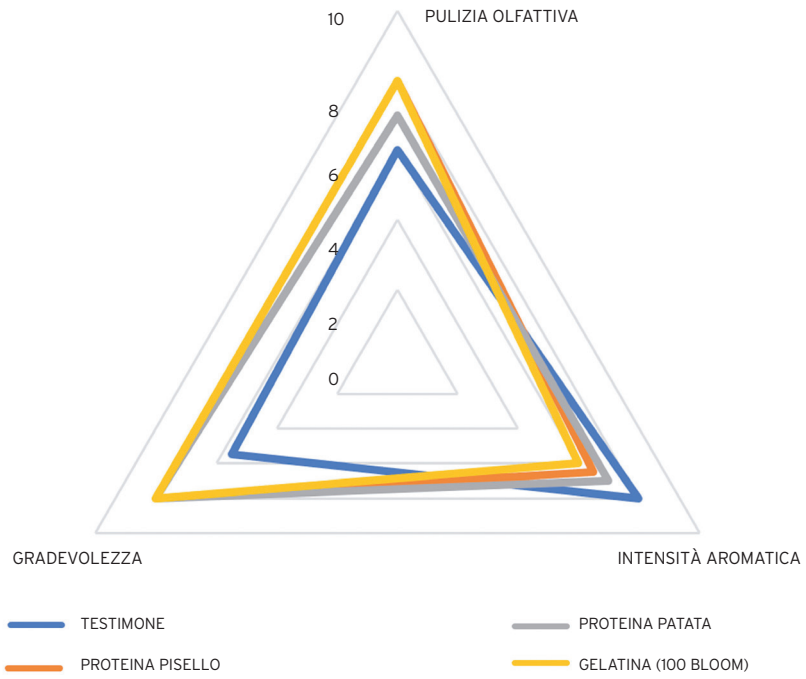
Graf. 7 - Valori di astringenza di vini chiarificati con proteine di pisello a diverso grado di idrolisi



Graf. 8 - Valori di ΔNTU di test a caldo (30 minuti a 80°C) effettuati su vino Traminer



Graf. 9 - Degustazione di vino Nebbiolo. Medie dei valori ottenuti applicando le principali proteine vegetali. Gelatina mantenuta a titolo di confronto



Bibliografia

• Matteo Marangon, Simone Vincenzi, Andrea Curioni; Wine Fining with Plant Proteins. Molecules 2019, 24, 2186.
• Adebiyi, A.P.; Aluko, R.E. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (Pisum sativum L.) seed protein isolate. Food Chem. 2011, 128, 902-908.
• Fuhrmeister, H.; Meuser, F. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. J. Food Eng. 2003, 56, 119-129.
• Owusu- Ansah, Y. J.; McCurdy S.M. Pea Proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. Food Rev. Int. 1991, 7, 103-134.
• Shewry, P. R.; Napier, J. A.; Tatham, A. S. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. Plant Cell 1995, 7, 945-956.
• lokra, s., helland, m. h., claussen, i.c., strætkvern, k.o., egelandsdal, b. (2008) Chemical characterization and functional properties of a potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed adsorption chromatography. Food Science and Technology 41, 1089–1099.
• Plieger, p. (1986) The composition of potato juice. A literature review. Dutch Institute for Carbohydrate Research report nr. PI 86-3, Groningen.
• Pots, a.m., de jongh, h.h.j., gruppen, h., hessing, m., voragen, a.g.j. (1998) The pH dependence of the structural stability of patatin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 2546–2553.
• Racusen, d. and foote, a. (1980) A major soluble glycoprotein of potato tubers. Journal of Food Biochemistry 1, 13–52.
• Van koningsveld, g.a., gruppen, h., de jongh, h.h., wijngaards, g., van boekel, m.a., walstra, p., voragen, a.g.j. (2001) Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4889–4897. ■