

**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# La misura delle proteine nei vini Sangiovese

**Dr Matteo Marangon**

Università di Padova – DAFNAE

 [matteo.marangon@unipd.it](mailto:matteo.marangon@unipd.it)

 [@ITAfoodandwine](https://twitter.com/ITAfoodandwine)



# Matteo Marangon

Dottorato di ricerca in Enologia (Università di Padova)

Ricercatore in FRA, AUS, ITA, UK.

Specialità: proteine del vino

7 vendemmie in Veneto

Ricercatore e Docente di enologia e tecnologie alimentari  
nel MSc in Italian Food & Wine (UniPD)



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Obiettivi Formativi

**Entro la fine di questa lezione sarete in grado di:**

- Descrivere quali sono le proteine dei vini rossi
- Spiegare quali sono le tecniche analitiche impiegate per lo studio (quantificazione ed identificazione) delle proteine nei vini rossi
- Valutare il ruolo tecnologico e sensoriale delle proteine dei vini rossi



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

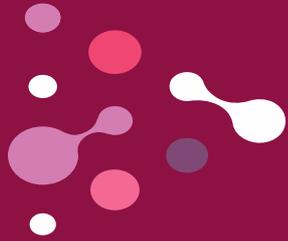
# Contenuti

1. Le proteine presenti nei vini: identità e origine
2. Metodi per la quantificazione delle proteine nei vini rossi (e.g. Sangiovese): colorimetrici, elettroforetici, proteomici
3. I fattori che influenzano il contenuto proteico dei vini
4. Il ruolo delle proteine nei vini rossi: interazioni con altre componenti del vino



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**

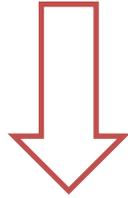
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# 1) Le proteine dell'uva e del vino

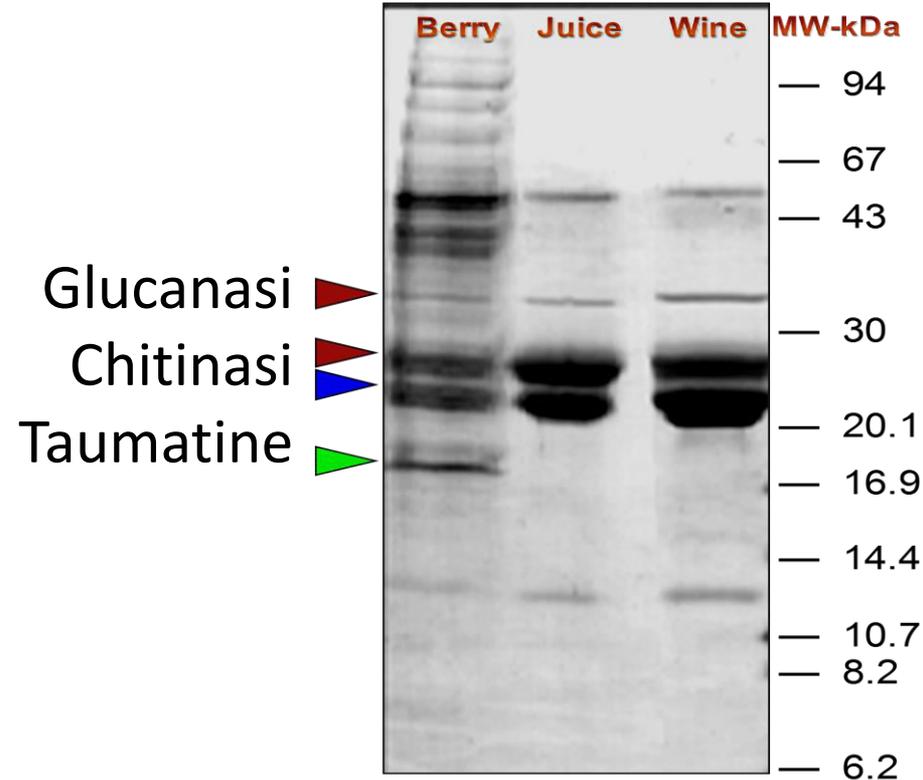




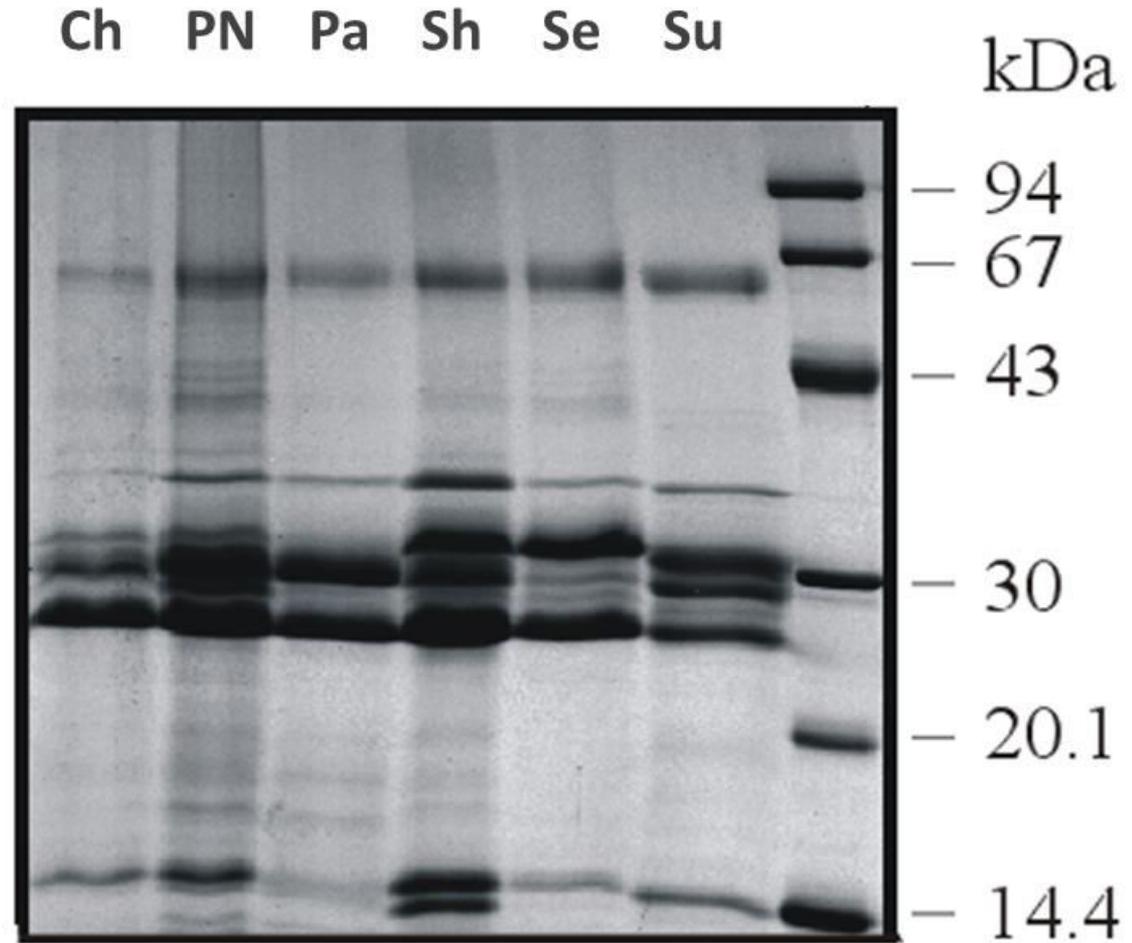
PR proteins sono robuste



sopravvivono alla  
vinificazione e nei vini bianchi  
(50-400 mg/L) causando gli  
intorbidamenti proteici



**I profili proteici di mosti di varietà diverse (bianche e rosse) sono simili**



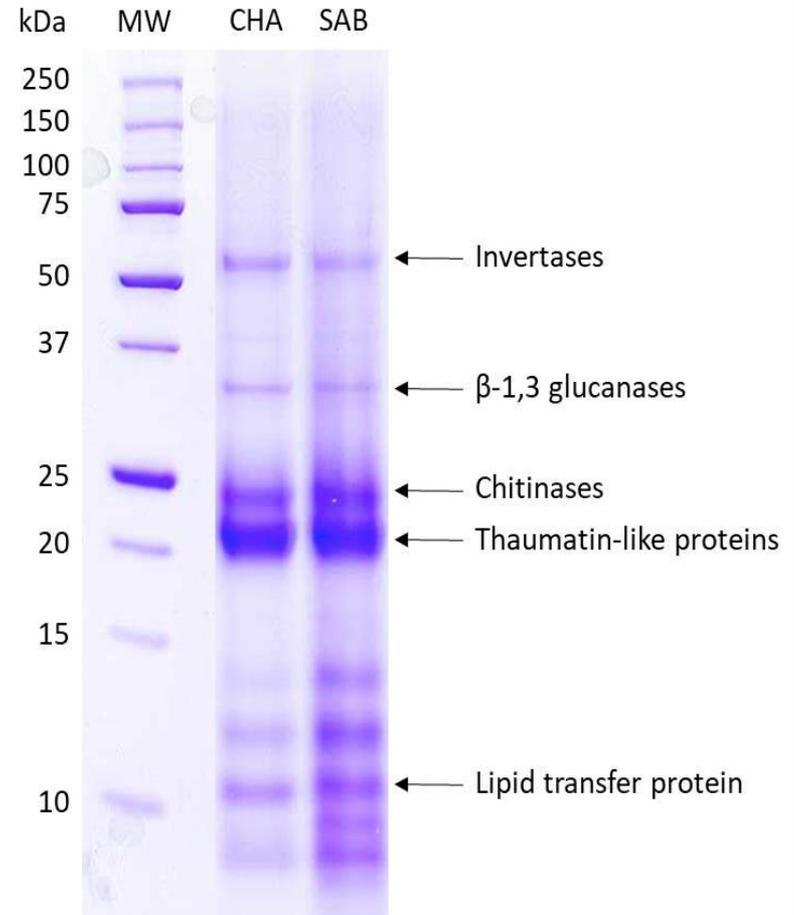
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

*Tattersall, van Heeswijck & Høj, Plant Physiol. 1997, 114: 759-769*

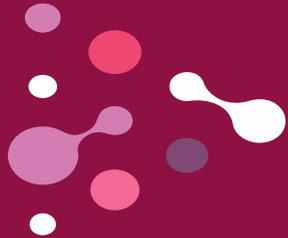
# Lo stesso vale per i vini...

...che contengono soprattutto  
proteine dell'uva, e tracce di  
proteine del lievito (ad  
eccezione delle mannoproteine  
che però sono proteoglicani)



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE



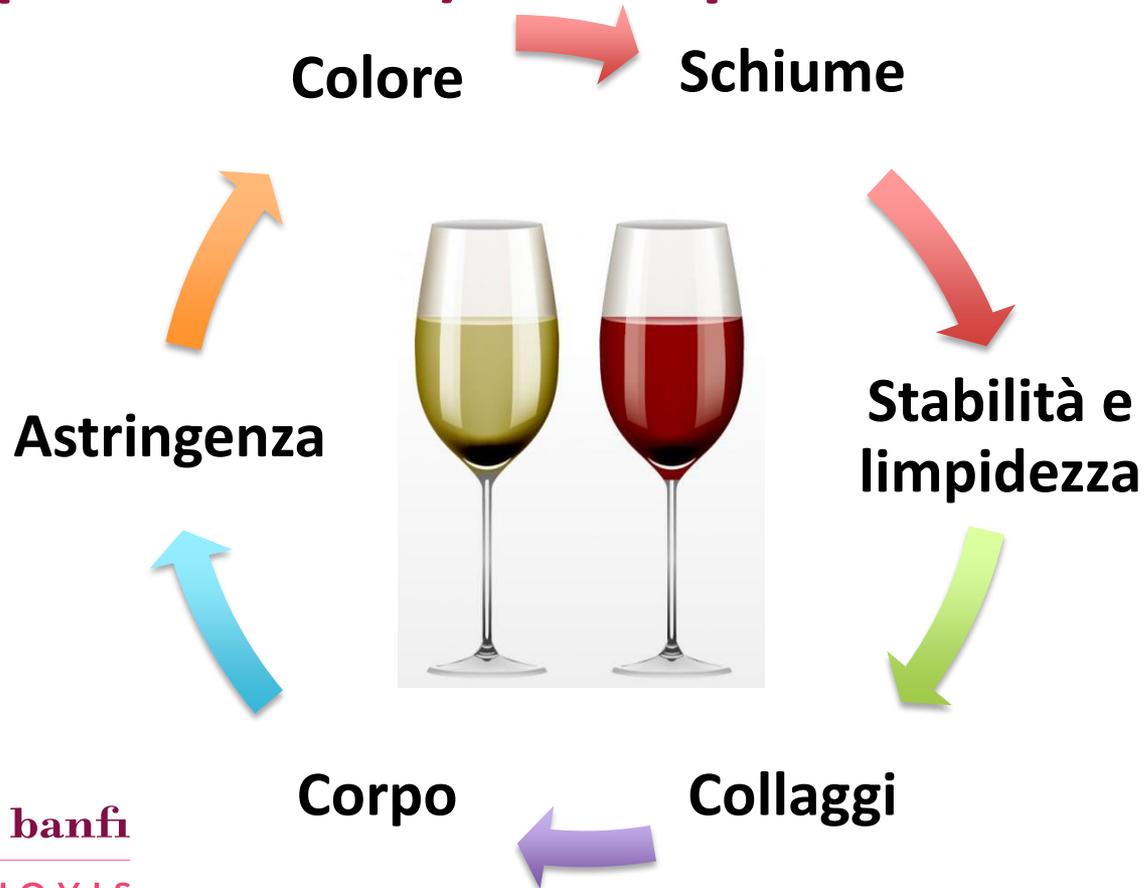
**fondazione banfi**

---

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

2) Metodi per la quantificazione delle  
proteine nei vini rossi (e.g. Sangiovese)

# Ruolo delle macromolecole (proteine, polifenoli e polisaccaridi) nella qualità dei vini



# Ruolo delle proteine nei vini rossi

## Non ben studiato.

I libri di enologia ci dicono che le proteine dei vini rossi non sono importanti in quanto non presenti nel vino (precipitano con i polifenoli)

Studiare le proteine dei vini rossi è più complicato che studiare quelle dei vini bianchi a causa delle interferenze dei polifenoli

Di recente alcuni autori hanno dimostrato che anche i vini rossi contengono quantità importanti di proteine solubili (Wigand et al. 2009; Smith et al. 2011; Mainente et al 2014).



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Metodo per quantificare le proteine nei vini rossi

Rimozione delle interferenze (polifenoli) → PVPP 5 g/L per 24 ore

Precipitazione delle proteine con un solvente (10%TCA in Acetone)

Recupero delle proteine mediante centrifugazione

Lavaggio con acetone per ottenere un precipitato pulito dai polifenoli

Solubilizzazione del pellet in acqua

Aggiunta del reagente di Bradford (blu) e lettura a 595 nm

Curva di taratura preparata con diluizioni seriali di invertasi

Adattato un metodo colorimetrico proposto da Smith et al 2011.

# Identificazione delle proteine dei vini rossi via proteomica

La proteomica è lo studio dello stato complessivo della composizione proteica di un organismo

Le proteine devono essere separate tramite:

- Elettroforesi 1D o 2D
- Cromatografia (FPLC, HPLC)

Identificate tramite:

- Metodi immunochimici
- Spettrometria di Massa

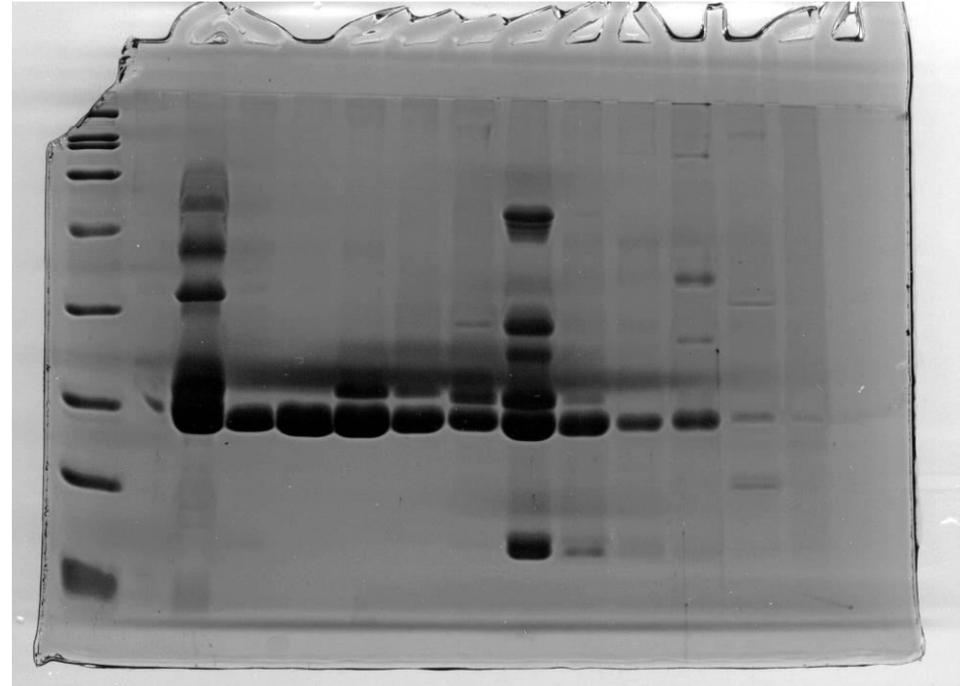
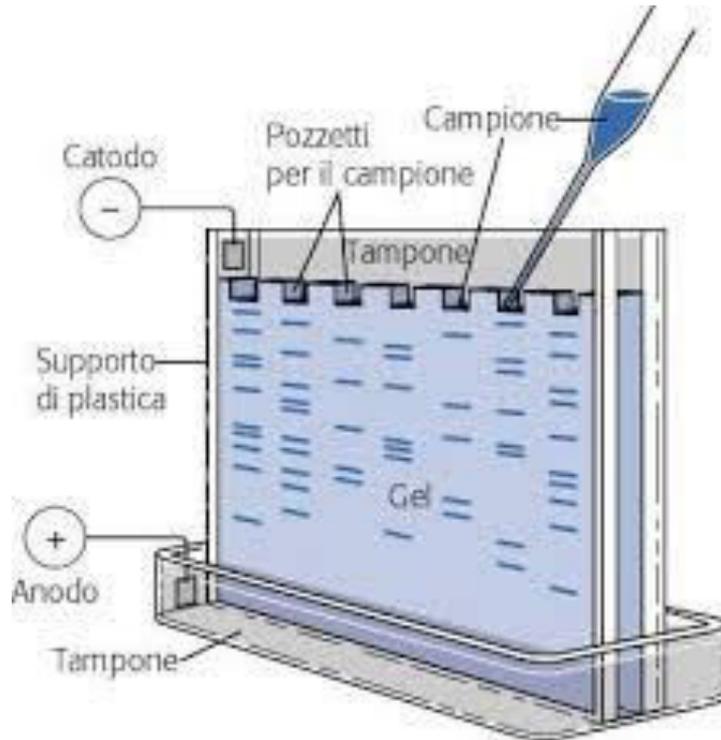


**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Elettroforesi (SDS-PAGE)

Tecnica usata per analizzare e separare le proteine, sfruttando le dimensioni e la carica delle proteine stesse,

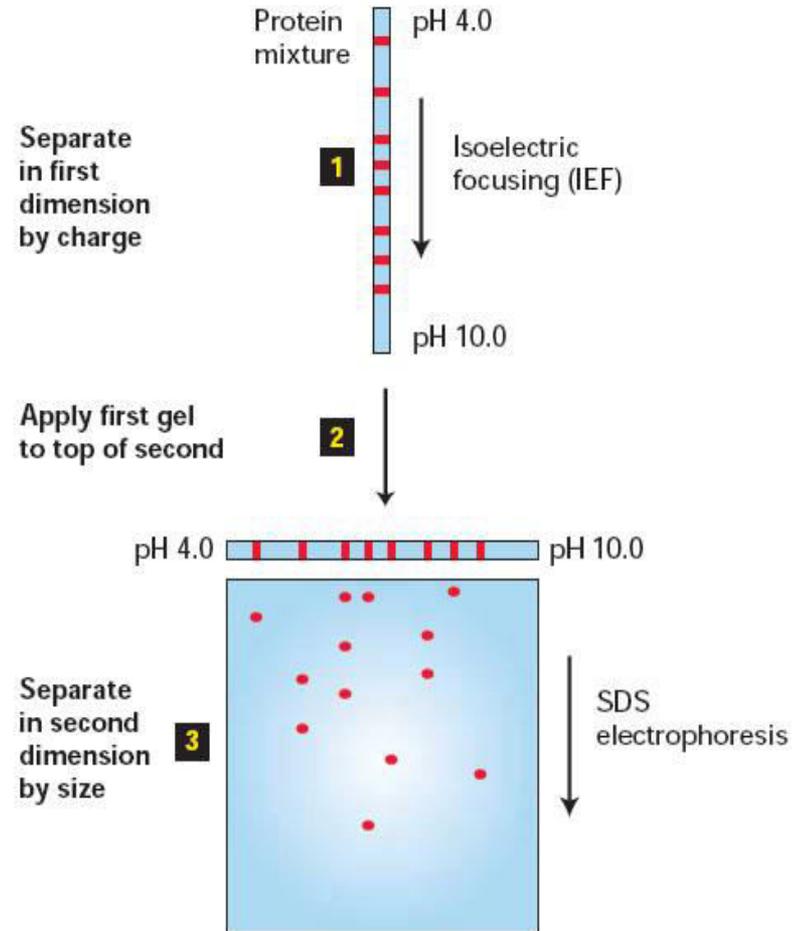


# Elettroforesi bidimensionale (2D-GE)

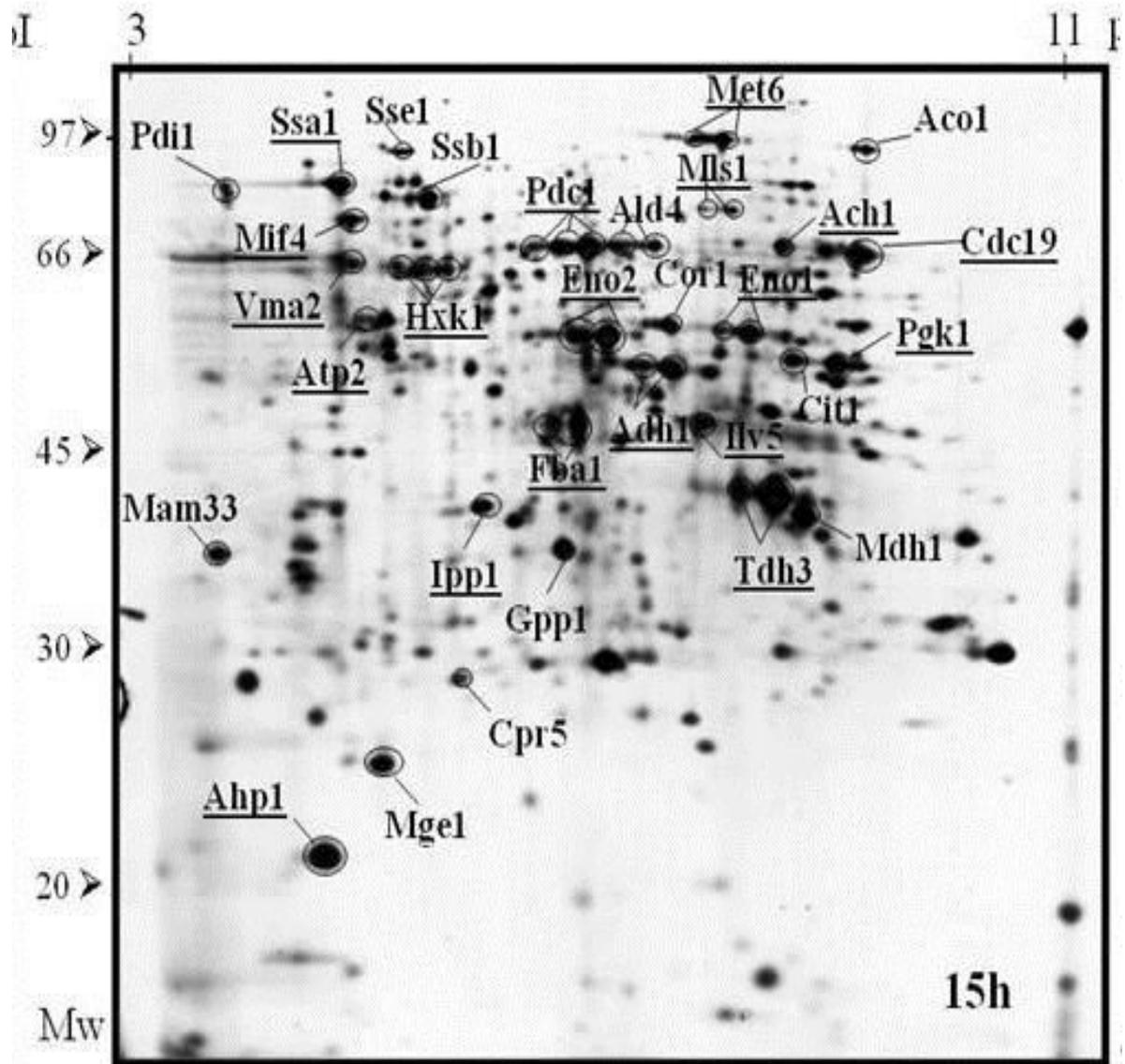
Doppia separazione delle proteine:

- In base al punto isoelettrico
- In base al loro peso

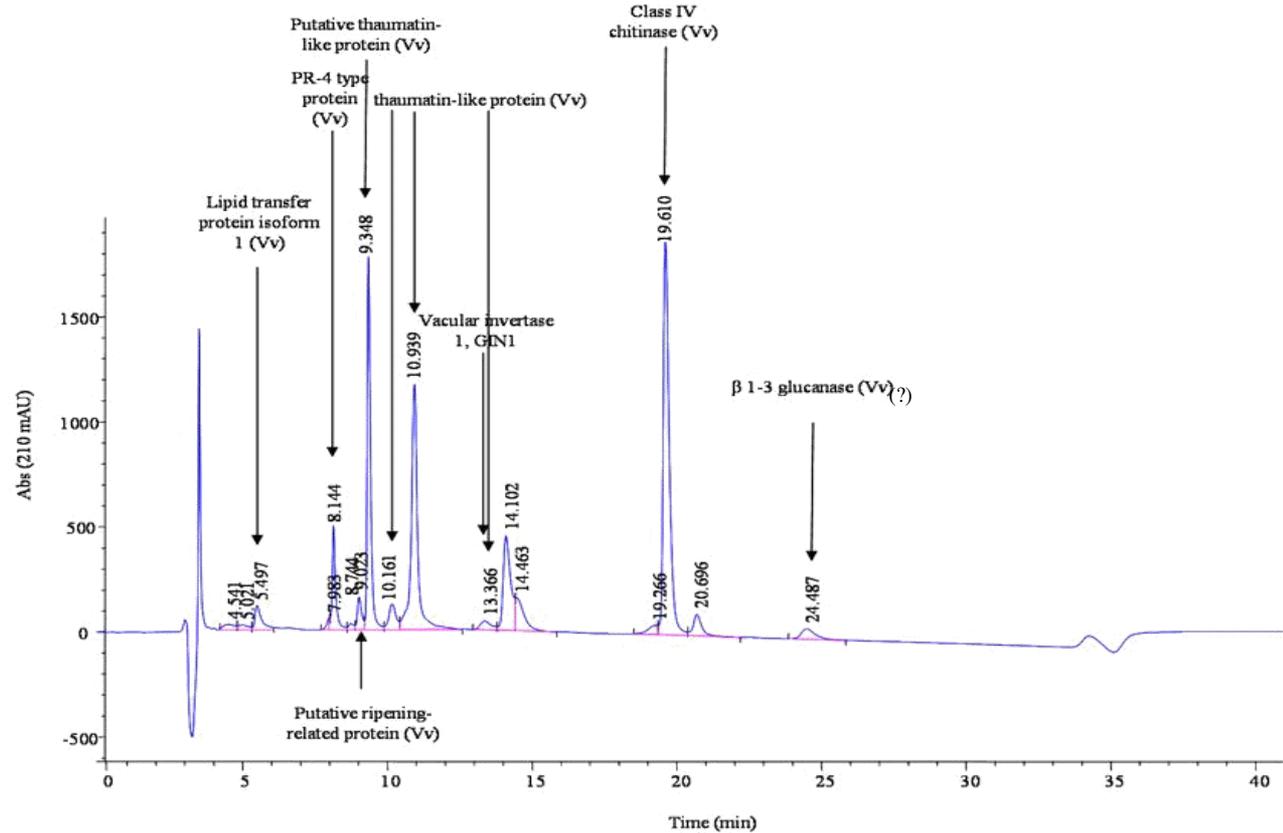
Proteine vengono visualizzate con un colorante (coomassie, nitrato d'argento, ...)



# 2D-GE wine



# Reverse-Phase HPLC



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Proteomica



Proteins



Separation  
SDS-PAGE  
Antibody-  
based  
approaches

LNDL  
EEAL  
QQA  
CEDL  
AR  
~~N~~  
KLN  
DLEE  
ALQ  
QAK

Digestion Peptides



Separation  
SCX  
High pH RP LC  
Low pH RP LC



Analysis  
MS-MS/  
Tandem MS

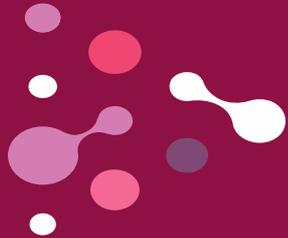
LNDLEEALQQAQEDLAR  
NKLNDEEALQQAQ  
NVQDAIADAEQR  
SKEEAEALYHSK  
SLVGLGGTK  
TAAENDFVTLK  
TAAENDFVTLKK  
TSQNSELNMQDLVEDYK  
TSQNSELNMQDLVEDYK  
K  
VDLLNQEIEFLK  
YEELQTVGR  
YLDGLTAER  
ADLEMQIESLTEELAYLK  
ADLEMQIESLTEELAYLKK  
AETECQNTYQQLLDIK

Peptide IDs  
+ Quantitation

IPI:PI100000073.2  
IPI:PI100217963.3  
IPI:PI100031065.1  
IPI:PI100376379.4  
IPI:PI100397801.4  
IPI:PI100009950.1  
IPI:PI100395488.2  
IPI:PI100295414.7  
IPI:PI100554711.3  
IPI:PI100009867.3  
IPI:PI100019449.1  
IPI:PI100016915.1  
IPI:PI100060800.5  
IPI:PI100013885.1  
IPI:PI100221224.6

Observed Proteins  
+ Quantitation





**fondazione banfi**

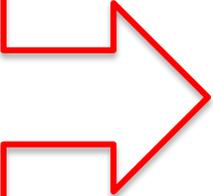
---

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

3) I fattori che influenzano il contenuto proteico di mosti e vini

# I fattori che influenzano il contenuto proteico dei mosti

1. Il grado di maturazione delle uve
2. Stress idrico (volume delle bacche)
3. Infezioni fungine (oidio e botrite)
4. Influenza varietale (genetica)
5. Il contatto del mosto con le bucce (e.g. raccolta e trasporto)
6. Trattamenti in vigneto (e.g. biostimolanti)



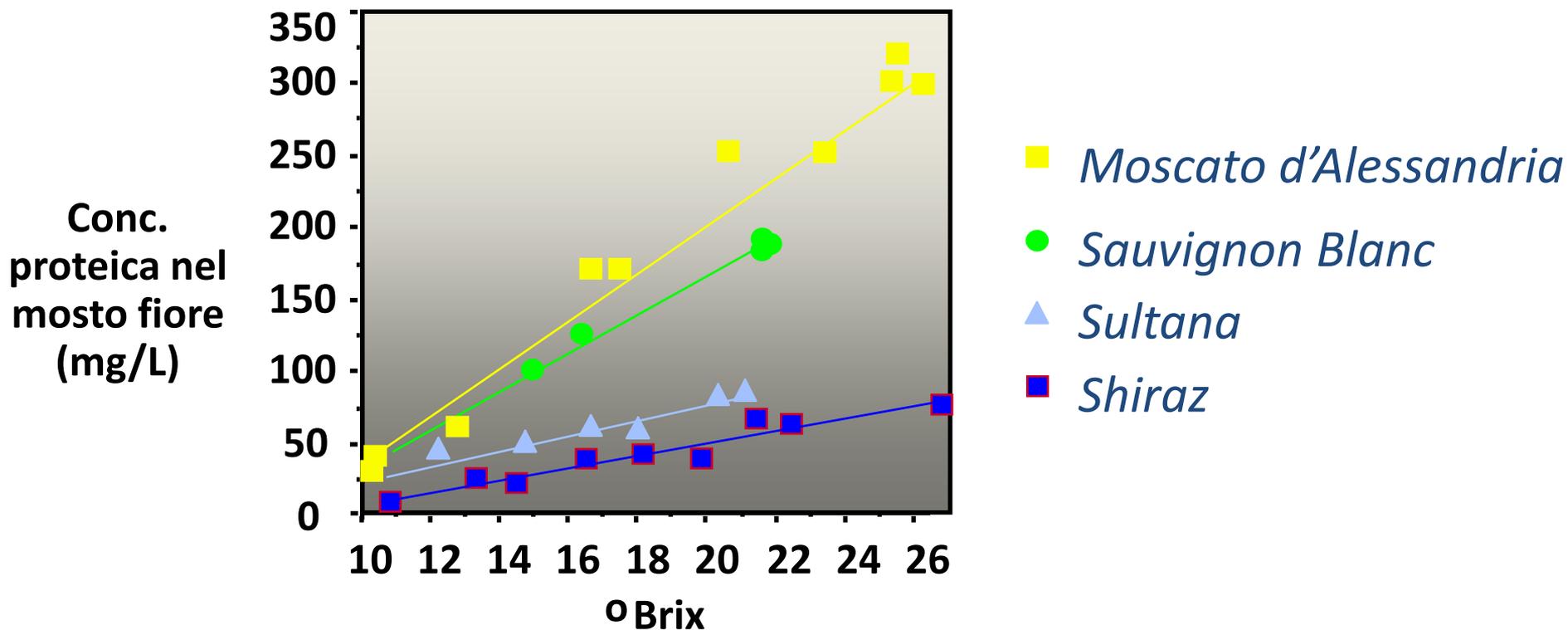
**Ruolo dei  
cambiamenti  
climatici**



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Grado di maturazione dell'uva



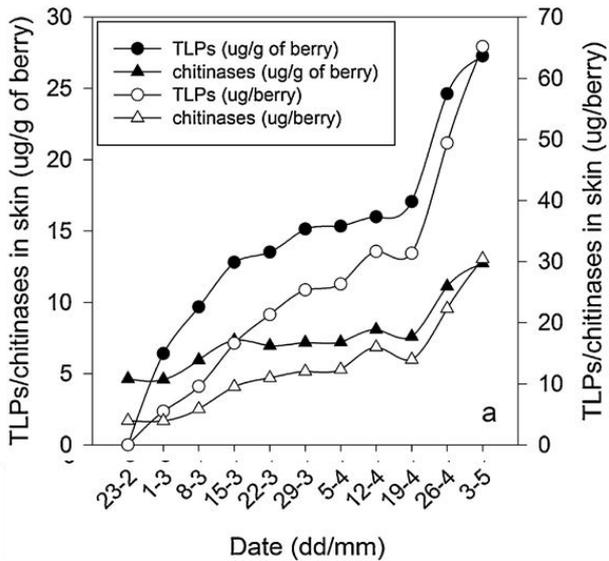
fondazione banfi

SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

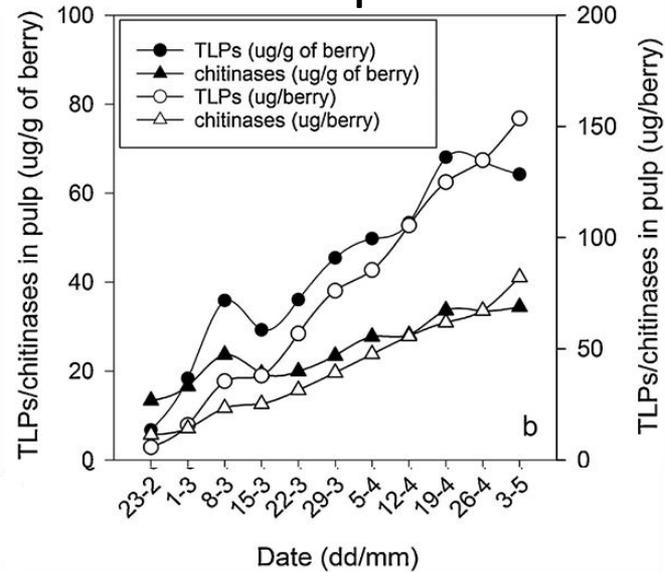
Pocock, Hayasaka, McCarthy & Waters, *J Agric. Food Chem.* 2000, 48:1637-1643

# Effetto maturazione sul contenuto in PR proteins di:

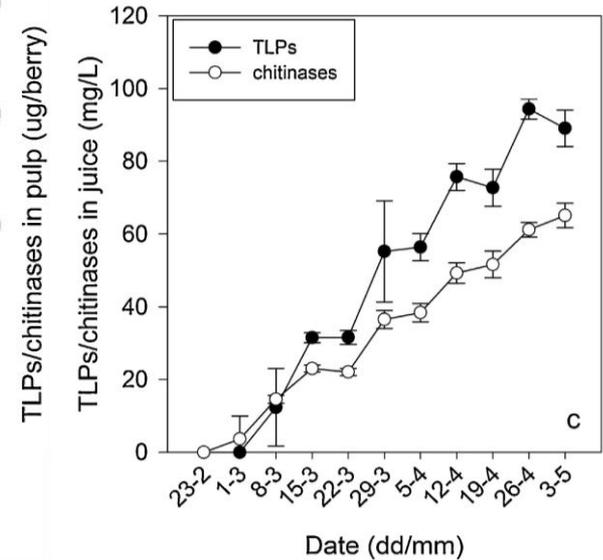
## Buccia



## Polpa



## Mosto



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

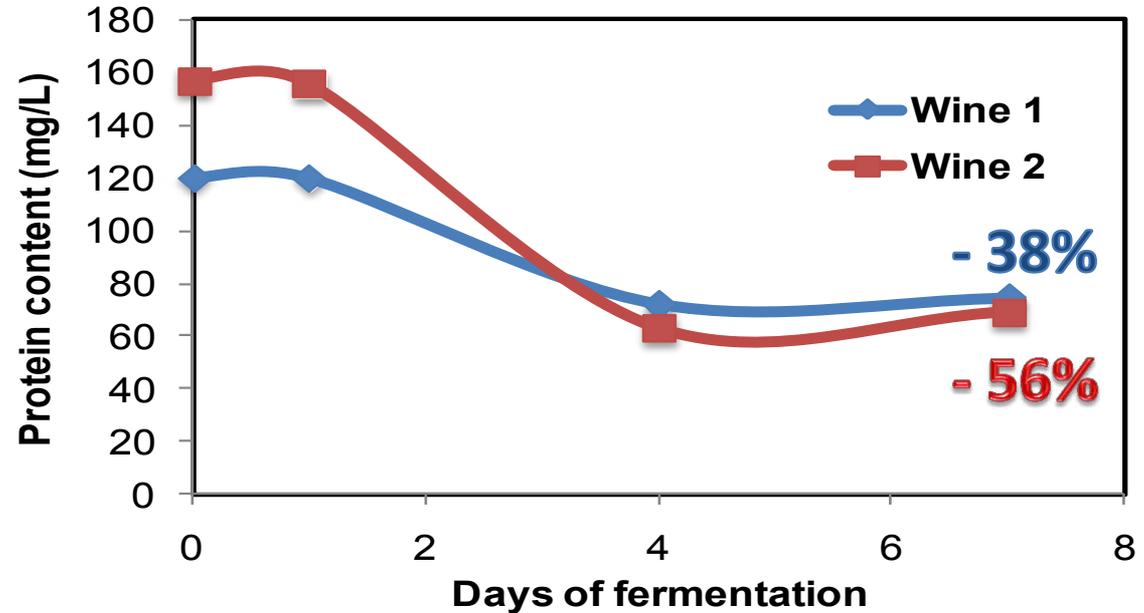
# I fattori che influenzano il contenuto proteico dei vini

1. Perdite in fermentazione
2. La macerazione
3. L'interazione delle proteine con il materiale insolubile delle pareti cellulari dell'uva
4. Aggiunte in tannini esogeni



# Durante la fermentazione c'è perdita naturale di proteine

- Fino al 50% delle proteine del mosto può essere perso in fermentazione
- Alte temperature (e basso pH) possono favorire queste perdite



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Macerazione aumenta l'estrazione dei polifenoli ma anche delle proteine

Fenomeno poco studiato.

## Due ipotesi:

1. Precipitazione proteine/polifenoli
2. Formazione complessi solubili o insolubile di proteine/polifenoli/polisaccaridi



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Ipotesi 1. Precipitazione proteine/polifenoli

## *Caso studio: viti ibride americane*

### Osservazioni generali:

- Le varietà ibride rosse Americane hanno contenuti in tannini molto più bassi rispetto a *Vitis vinifera* (<100 mg/L contro una media di oltre 500 mg/L)
- I tannini contribuiscono al corpo, all'astringenza, alla stabilizzazione del colore etc → Il contenuto in tannini dei vini rossi correla positivamente con il prezzo di vendita



## Protein-Precipitable Tannin in Wines from *Vitis vinifera* and Interspecific Hybrid Grapes (*Vitis* spp.): Differences in Concentration, Extractability, and Cell Wall Binding

Lindsay F. Springer and Gavin L. Sacks\*

Department of Food Science, Cornell University, 630 West North Street, Geneva, New York 14456, United States

 Supporting Information

**ABSTRACT:** Although they possess significant viticultural advantages, interspecific hybrid grapes (*Vitis* spp.) are reported to produce wine with lower tannin concentrations than European wine varieties (*Vitis vinifera*). However, extensive quantitative data on this phenomenon as well as mechanistic explanations for these differences are lacking. A survey of primarily commercial wines from the Finger Lakes American Viticultural Area (New York) using a protein precipitation method determined that hybrid-based wines had >4-fold lower tannin concentrations than *vinifera* wines. To elucidate factors responsible for differences in wine tannin, 24 wines were produced from both red hybrid and *vinifera* cultivars under identical conditions. Lower wine tannin in French–American hybrid- than *vinifera*-based wines could be partially explained by lower grape tannin. However, experiments in which cell wall material was incubated with tannin indicated that cell wall binding may be of equal or greater importance in explaining lower wine tannin concentrations in hybrid-based wines. Subsequent characterization of cell wall material revealed that protein in flesh cell walls and, to a lesser extent, pectin in skin cell walls were correlated with cell wall binding.

**KEYWORDS:** tannin, protein precipitation, interspecific hybrid, wine, cool climate



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Pathogenesis-Related Proteins Limit the Retention of Condensed Tannin Additions to Red Wines

Lindsay F. Springer<sup>†</sup>, Robert W. Sherwood<sup>‡</sup>, and Gavin L. Sacks<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Department of Food Science, Stocking Hall, and <sup>‡</sup>Biotechnology Resource Center Proteomics and Mass Spectrometry Facility, Cornell University, Ithaca, New York 14853, United States

*J. Agric. Food Chem.*, 2016, 64 (6), pp 1309–1317

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04906

Publication Date (Web): January 23, 2016

Copyright © 2016 American Chemical Society

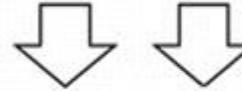
\*(G.L.S.) E-mail: gls9@cornell.edu. Phone: (607) 255-2335.

✓ Cite this: *J. Agric. Food Chem.* 64, 6, 1309-1317

↓ RIS Citation GO

Un lavoro successivo ha confermato tale ipotesi  
L'aggiunta di tannini al vino rosso forma complessi insolubili che contengono PR proteins

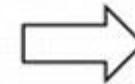
Tannin addition to red wine, forms insoluble complex



SDS-PAGE



Nano-LC/MS/MS



“Pathogenesis related proteins”



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS

Un ulteriore articolo ha provato che esiste una relazione fra il contenuto in proteine solubili e l'estraibilità dei tannini condensati durante la fermentazione dei vini rossi

## Relationship of Soluble Grape-Derived Proteins to Condensed Tannin Extractability during Red Wine Fermentation

Lindsay F. Springer<sup>†</sup>, Lei-An Chen<sup>†</sup>, Avery C. Stahlecker<sup>†</sup>, Peter Cousins<sup>§</sup>, and Gavin L. Sacks<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup> Department of Food Science, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, New York 14853, United States

<sup>§</sup> E & J Gallo Winery, Modesto, California 95354, United States

*J. Agric. Food Chem.*, 2016, 64 (43), pp 8191–8199

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02891

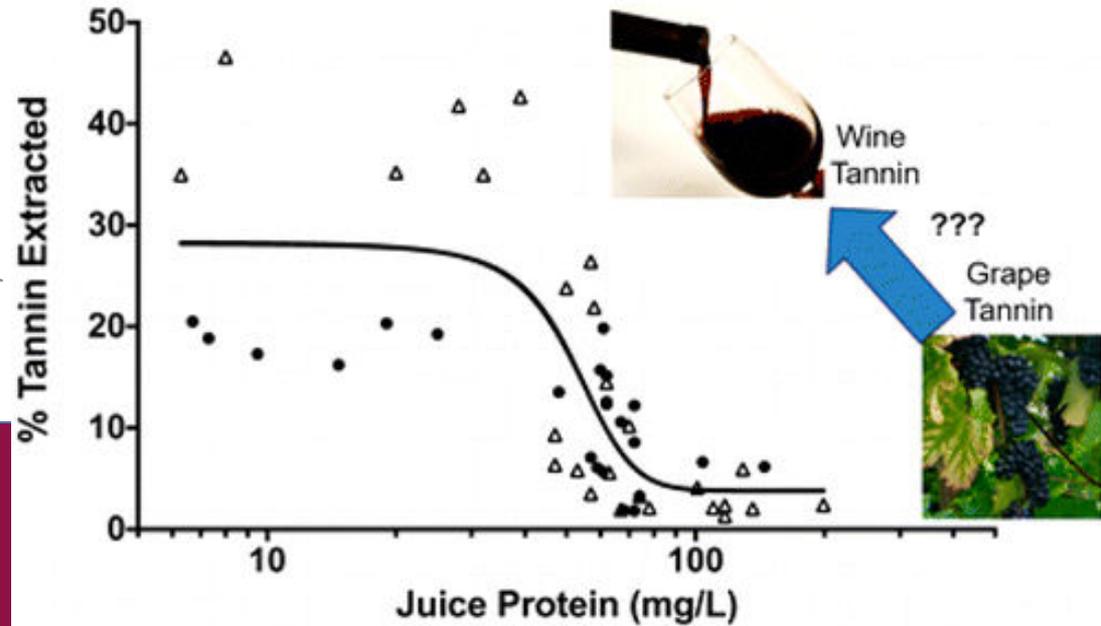
Publication Date (Web): October 4, 2016

Copyright © 2016 American Chemical Society

\*(G.L.S.) E-mail: gls9@cornell.edu. Phone: (607) 255-2335.

 Cite this: *J. Agric. Food Chem.* 64, 43, 8191-8199

 RIS Citation 



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

**Ma questi risultati ottenuti su varietà ibride e internazionale hanno valenza per le varietà italiane in generale e per il Sangiovese in particolare?**

**I vini rossi italiani hanno effettivamente proteine solubili?**



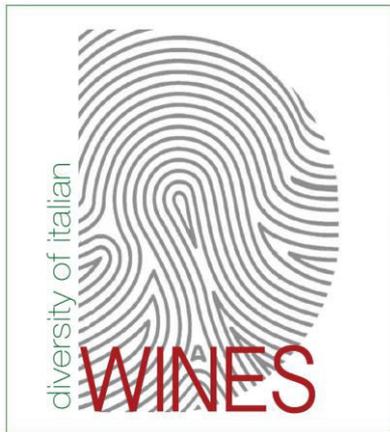
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# The D-Wines project

## *The diversity of tannins in Italian red wines*

**Unità di Ricerca:** UniVR, FEM, UniTO, UniNA, UniBO, UniPD



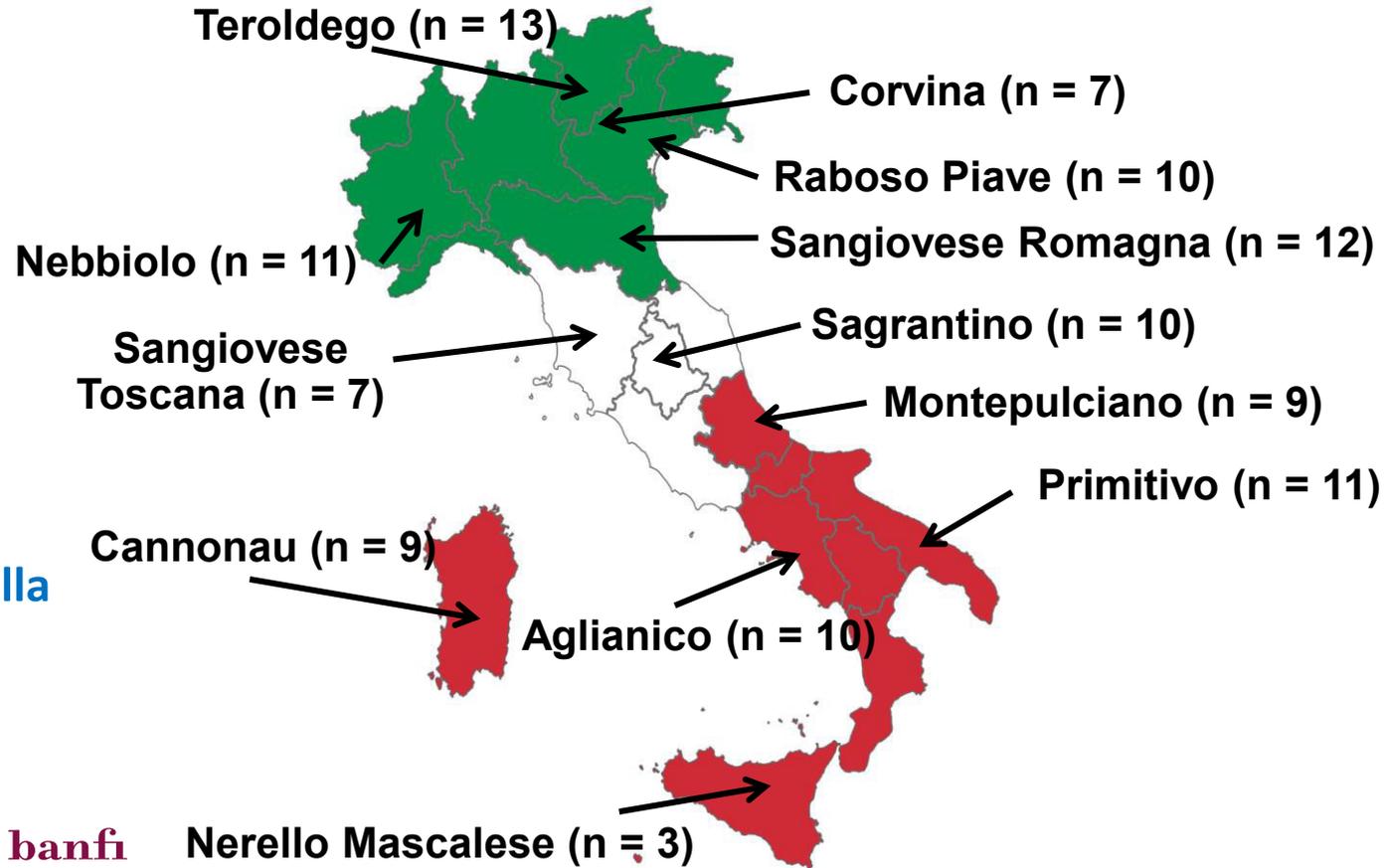
**Scopo:** raccogliere ed analizzare la composizione di diversi vini italiani, con lo scopo ultimo di mettere in luce le complesse relazioni fra composizione chimica e astringenza percepita



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Campionamento (n = 112)



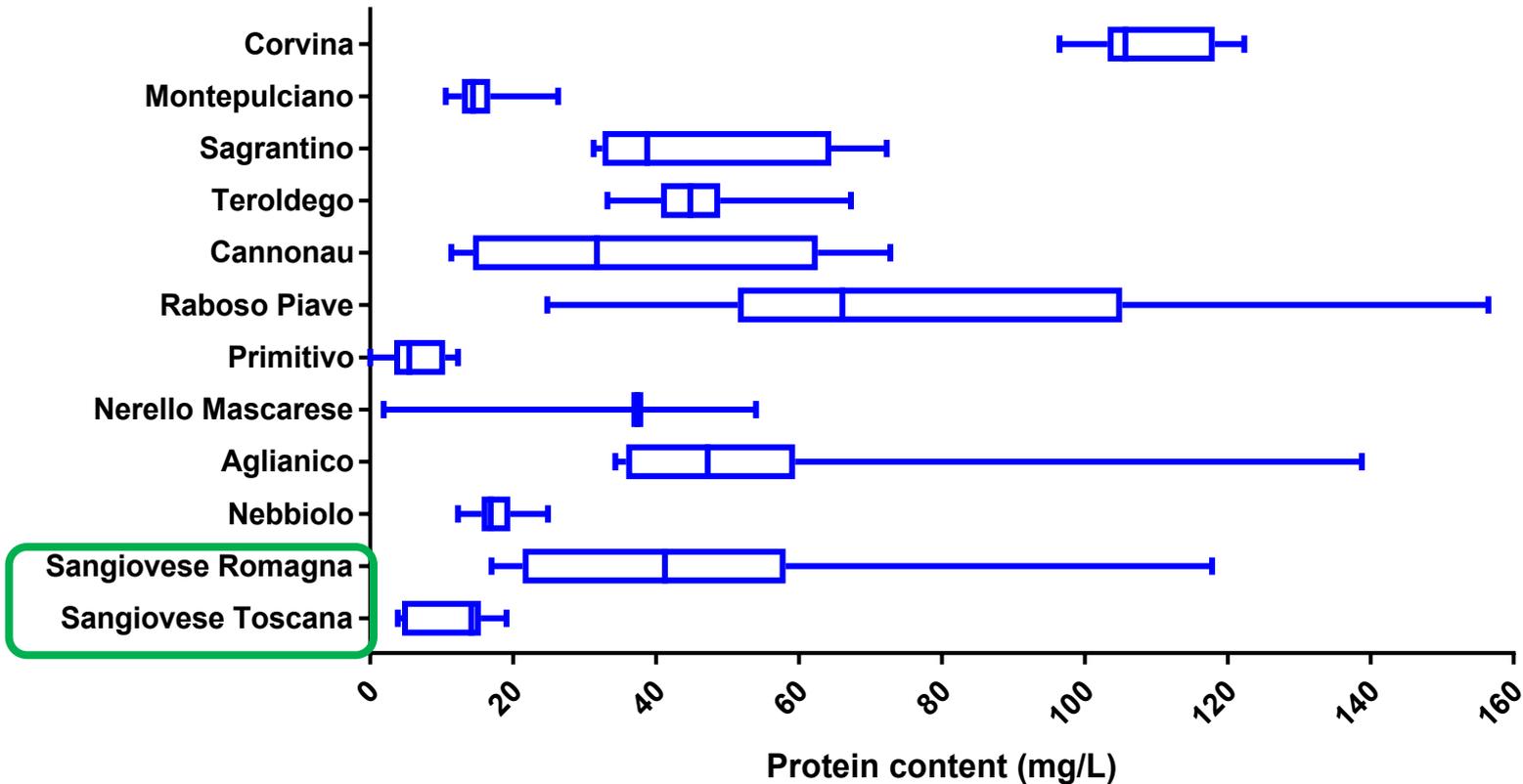
Vini 2016 da vasca  
No legno, no FML  
Vini rappresentativi della  
diversità italiana



**fondazione banfi**  
SANGUIS JOVIS

# Quantificazione proteica

Media: 41 mg/L  
Range: 0 – 159 mg/L



fondazione banfi

SANGUIS JOVIS  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Marangon, M., et al. Macromolecular diversity of Italian red wines.  
In: Macrowine 2018. Universidad de Zaragoza, 2018. p. 44.

# Sangiovese

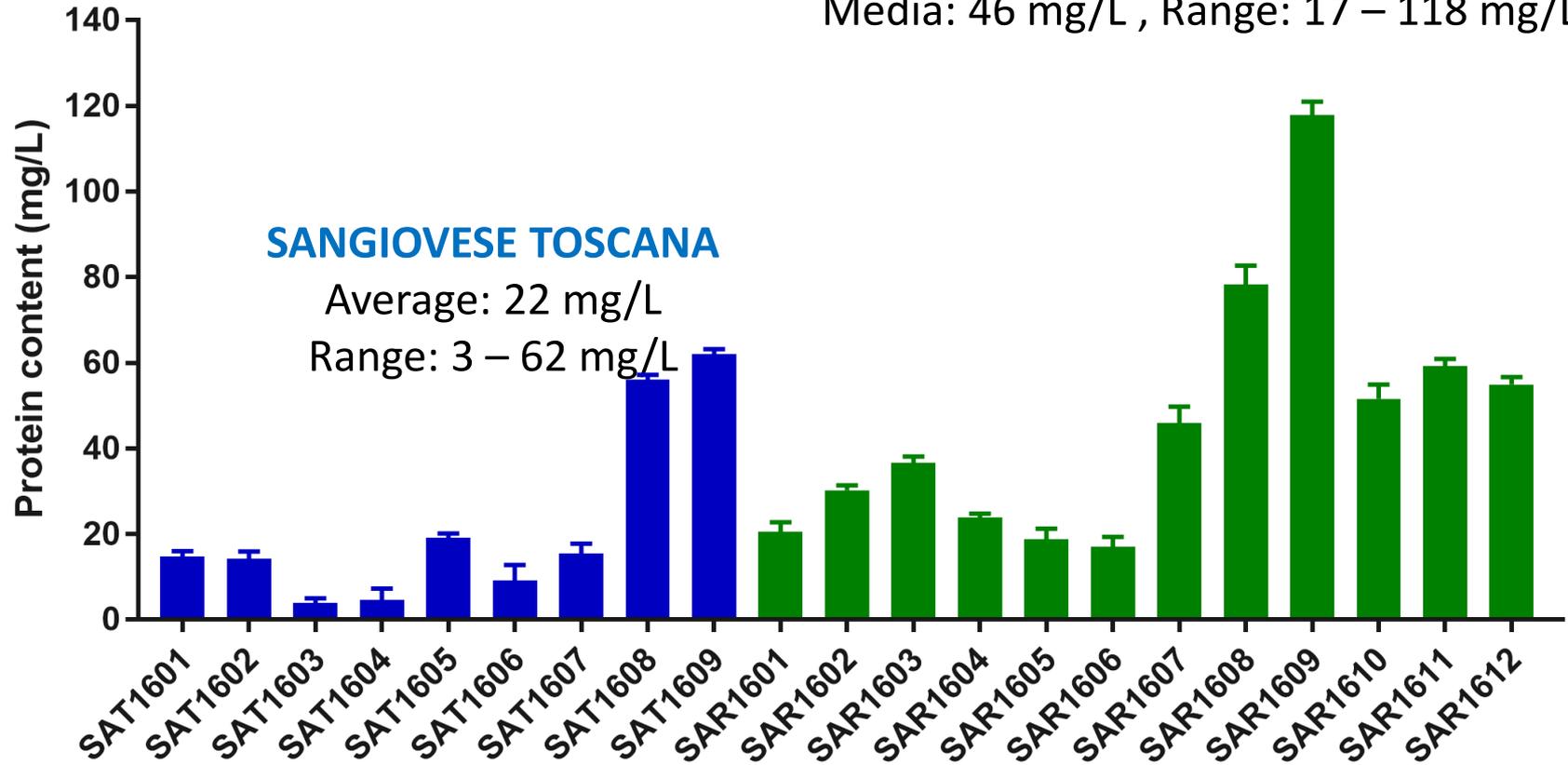
## SANGIOVESE ROMAGNA

Media: 46 mg/L , Range: 17 – 118 mg/L

## SANGIOVESE TOSCANA

Average: 22 mg/L

Range: 3 – 62 mg/L



# Implicazioni pratiche per la produzione del Sangiovese e dei vini rossi

La presenza di proteine solubili nei mosti potrebbe causare/essere causa di:

- maggiore precipitazione dei tannini derivanti dall'uva durante la vinificazione
- minore estrazione dei tannini condensati dell'uva durante la vinificazione
- scarsa efficacia dell'aggiunta di tannini condensati esogeni che precipiterebbero le proteine



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

# Possibili soluzioni?

Per ovviare a tali problemi le proteine dell'uva dovrebbero essere rimosse prima della fermentazione.

Springer et al (2016) hanno testato:

- Riscaldamento del mosto
- Congelamento del mosto
- Aggiunta di tannini condensati
- **Uso di bentonite** (unico efficace)
- MA: si deve separare il liquido dalle bucce per farlo



## **Ipotesi 2. Formazione complessi solubili di proteine/polifenoli/polisaccaridi**

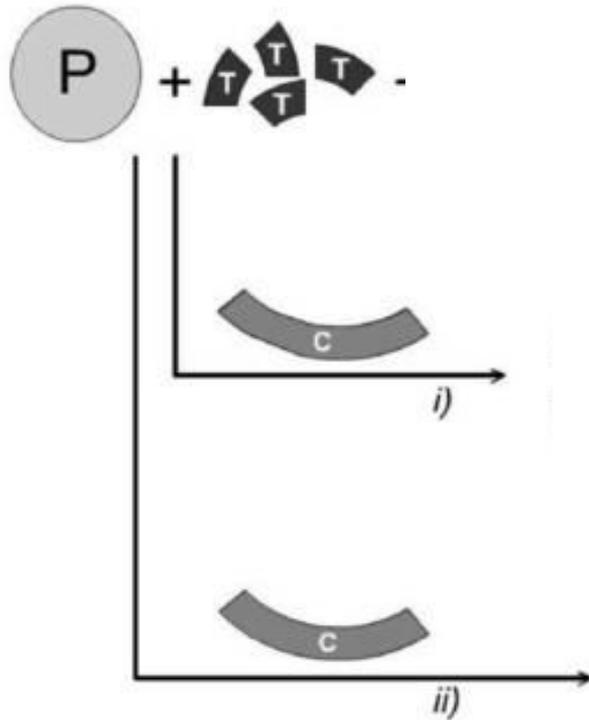
In sistemi modello si è visto che i polisaccaridi possono inibire l'aggregazione tannini/proteine, modulando l'astringenza (de Freitas et al 2003; Soares et al 2012; Watrelot et al 2017)

### **Come?**

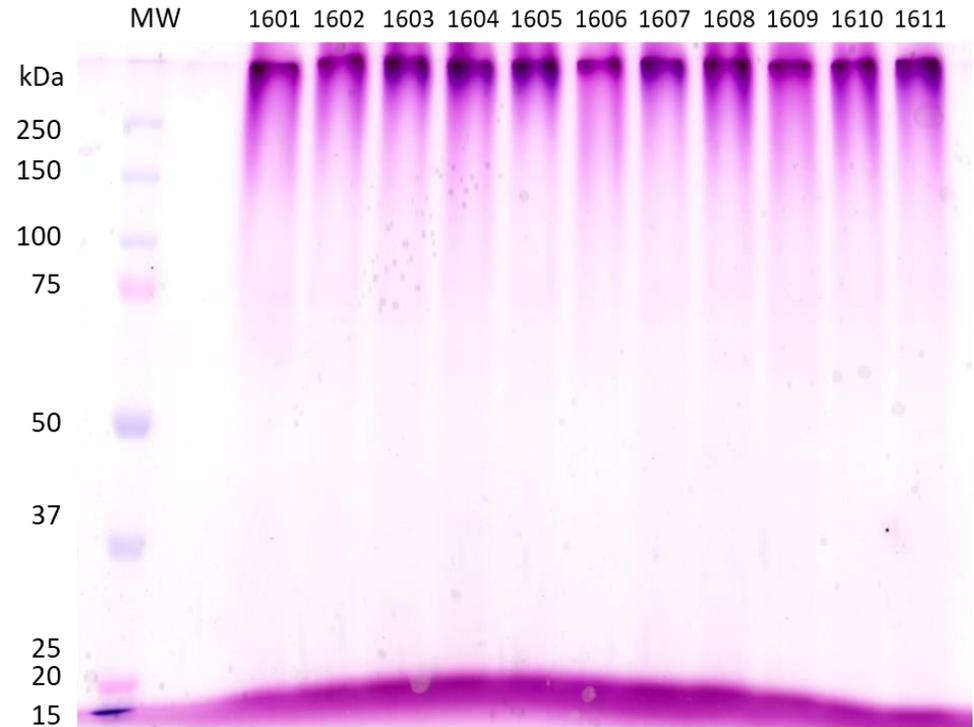
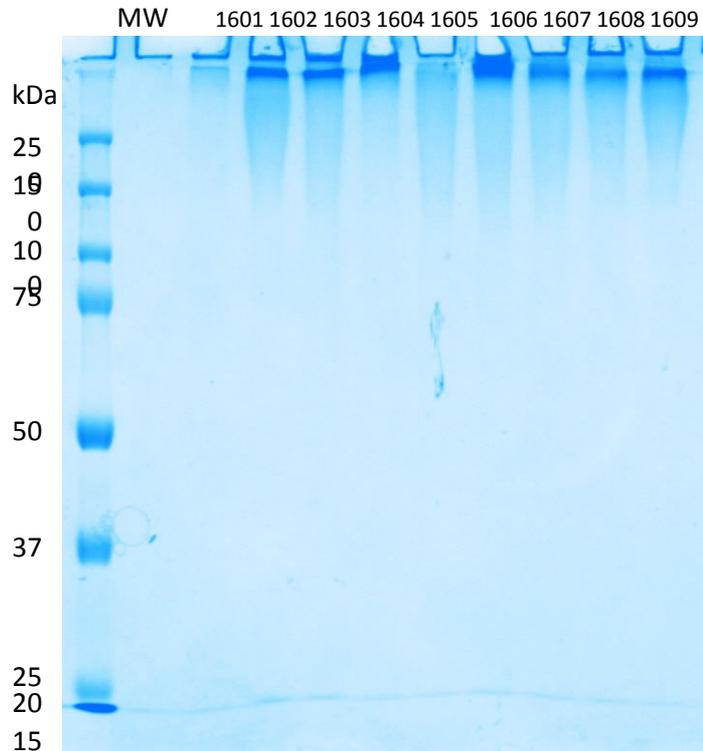
- 1. Competizione** tra polisaccaridi e proteine salivari verso i tannini
- 2. Nel vino si può formare un complesso solubile** proteina-polifenoli-polisaccaridi (Mateus et al 2004).



# Modelli proposti da Mateus et al 2004



# Presenza di aggregati proteici e polisaccaridici ad alto peso molecolare = aggregati solubili



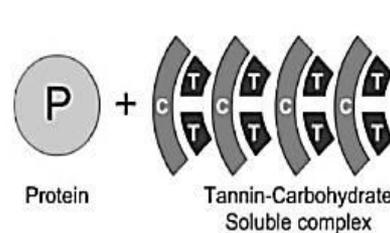
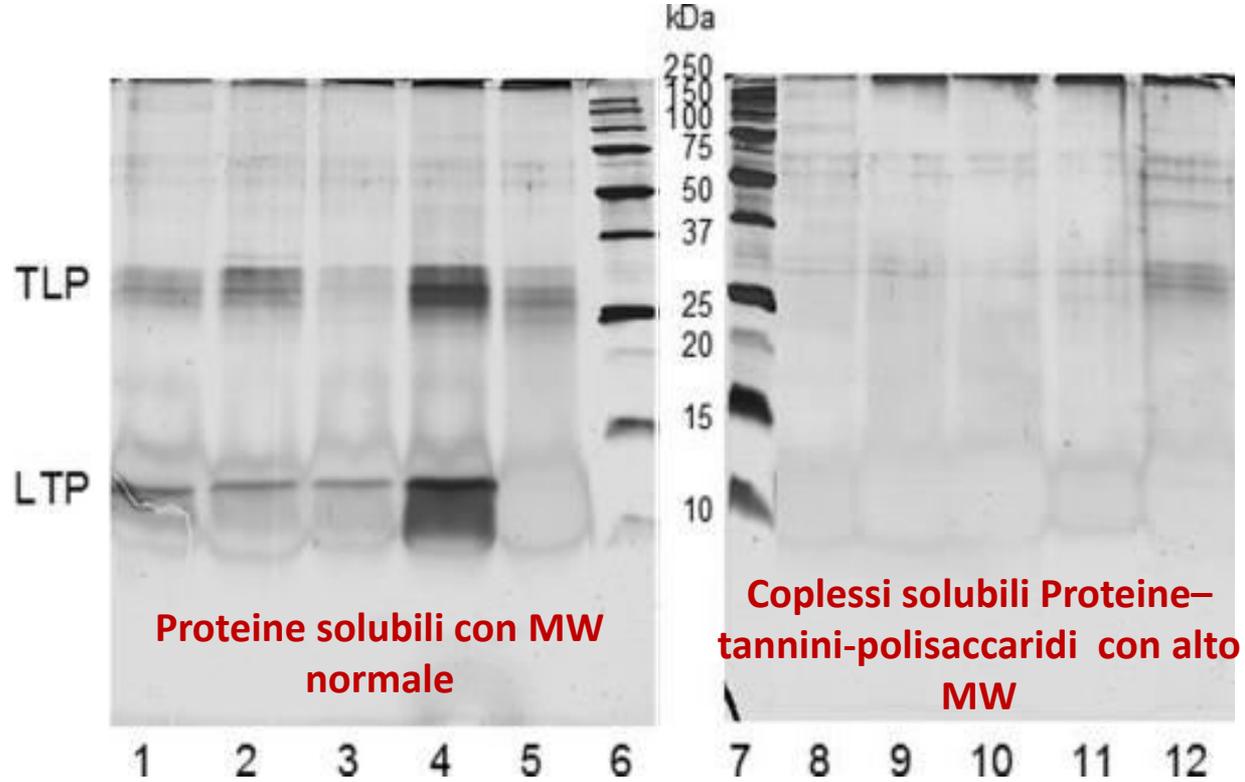
**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Marangon, M., et al. Macromolecular diversity of Italian red wines.  
In: Macrowine 2018. Universidad de Zaragoza, 2018. p. 44.

In letteratura si trovano due tipi di profili proteici per i vini rossi:

1. Con proteine anche a basso peso molecolare
2. Con aggregati proteici ad alto peso molecolare



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

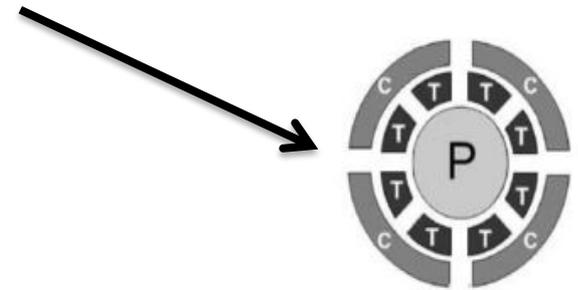
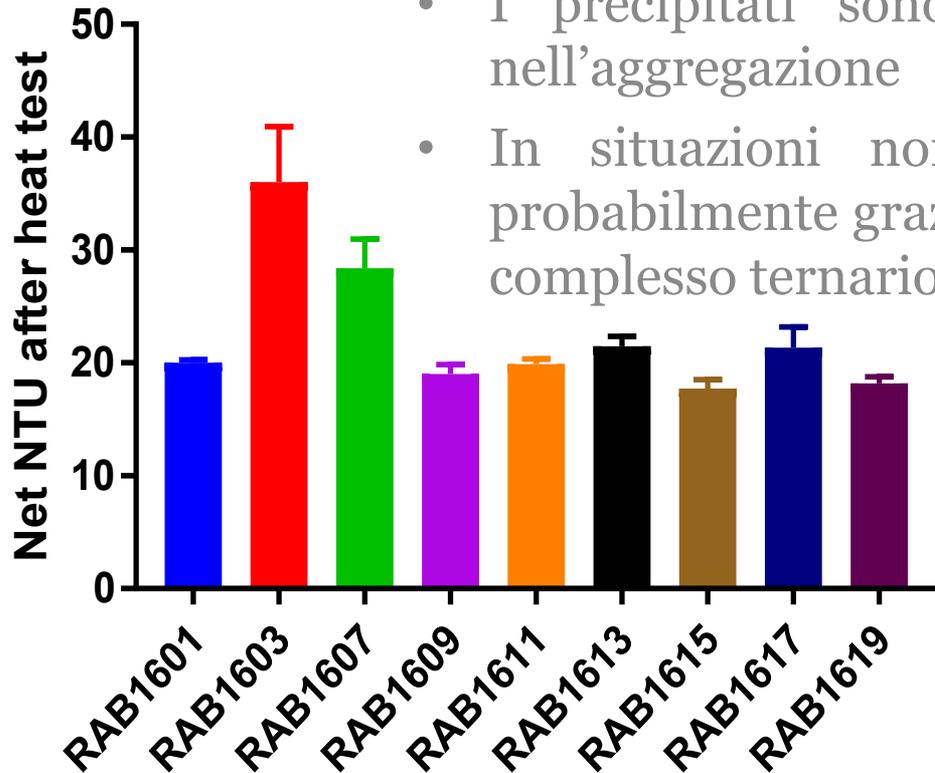
Image from Wigand et al 2009

# Stabilità colloidale

## Test al calore (80 ° C per 2 h)

Tutti i vini sono risultati instabili

- I precipitati sono rossi → polifenoli partecipano nell'aggregazione
- In situazioni normali i vini rossi sono stabili, probabilmente grazie ai polisaccaridi che proteggono il complesso ternario



Dopo riscaldamento l'equilibrio si rompe e si forma torbidità

**Gli intorbidamenti proteici dei vini rossi sono possibili?**

**Le proteine sono coinvolte in questi meccanismi?**

**I cambiamenti climatici favoriranno questi fenomeni?**

# Conclusioni 1/2

- Gli avanzamenti metodologici stanno iniziando a permettere uno studio più sistematico del ruolo delle proteine nei vini rossi
- I vini rossi contengono proteine in quantità anche notevoli
- I cambiamenti climatici favoriranno l'accumulo di proteine
- L'introduzione di varietà resistenti porterà ad un aumento in proteina e conseguente precipitazione dei tannini

## Conclusioni 2/2

Proteine possono avere una valenza tecnologica ed organolettica importante soprattutto per:

- Possibile comparsa di precipitazioni
- Interazione con le aggiunte di tannini esogeni
- Ruolo nella modulazione dell'astringenza
- Effetto sul corpo del vino (mouthfeel, body, texture)
- Ruolo indiretto nella stabilizzazione del colore
- Possibile ruolo nella modulazione della percezione degli aromi

# Rigraziamenti

Financial support of MIUR, project N. 20157RN44Y



MINISTERO DELL'ISTRUZIONE,  
DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA



UNIVERSITÀ  
di **VERONA**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
**FEDERICO II**



FONDAZIONE  
EDMUND  
MACH



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TORINO



UNIVERSITY  
OF TRENTO - Italy



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**D-Wines study group members:** L. Moio, D. Perenzoni, L. Rolle, A. Versari, S. Vincenzi, M. Ugliano, A. Curioni, A Gambuti, V Gerbi, S Giacosa, F Mattivi, P. Arapitsas, G Parpinello, P Piombino, A Ricci, S Río Segade, B Simonato, D Slaghenaufi, G Tornielli

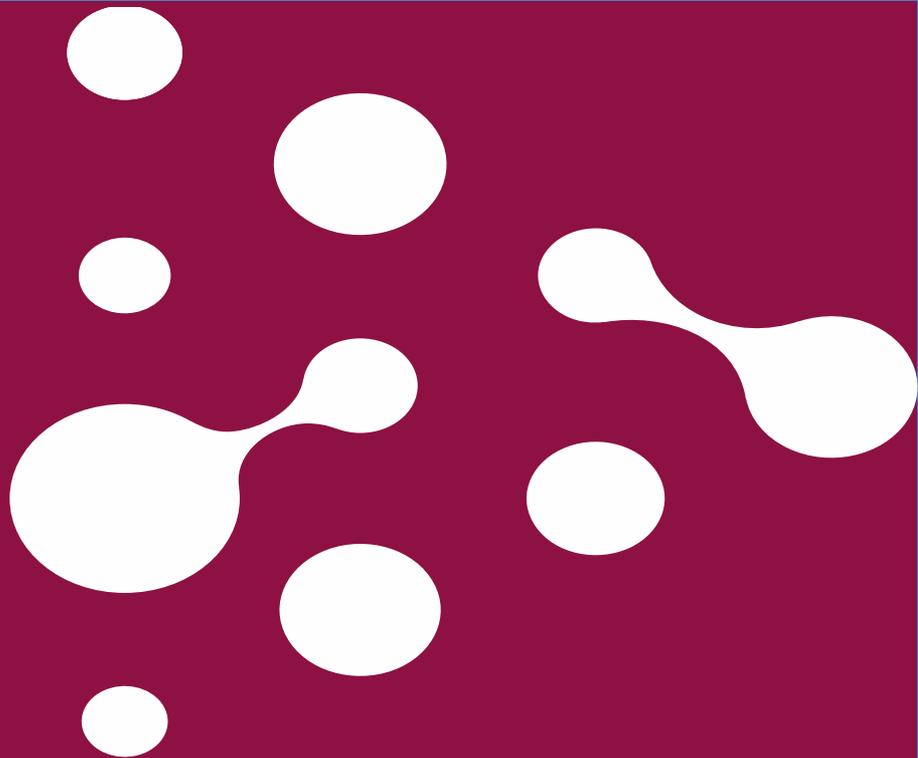


**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

**DAFNAE**  
UNIVERSITY OF PADOVA

DEPARTMENT OF  
AGRONOMY  
FOOD  
NATURAL RESOURCES  
ANIMALS  
ENVIRONMENT



Grazie per l'attenzione



**fondazione banfi**

**SANGUIS JOVIS**  
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

[fondazionebanfi.it](http://fondazionebanfi.it)