

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
TORINO
FACOLTA' DI AGRARIA



CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN
SCIENZE VITICOLE ED ENOLOGICHE

TESI DI LAUREA

INTERAZIONI SUPERFICIALI
IN SISTEMI PROTEICI DI ORIGINE VEGETALE:
ASPETTI DI INTERESSE ENOLOGICO

Candidato: Federico Piano

Relatore: Chiar.mo Prof. Francesco Bonomi

Anno accademico 2007-2008

Interazioni deboli, quali quelle dovute ad effetti idrofobici, a legami idrogeno e ad interazioni di Van der Waals, anche grazie alla natura cooperativa delle singole interazioni, assumono un ruolo decisivo nella struttura tridimensionale di sistemi polimerici complessi. Le proteine che interessano l'industria alimentare, per la loro struttura, sono coinvolte in molti processi funzionali. La spiegazione del meccanismo alla base della funzionalità di tali molecole spinge a considerare le variabili più importanti che influenzano la struttura delle proteine: i parametri di idrofobicità, stericità e caratteristiche elettriche. Tra questi fattori l'idrofobicità è conosciuta per essere significativamente correlata con le proprietà funzionali delle proteine.

I polifenoli, ed in particolare i tannini, hanno la proprietà di associarsi alle proteine per dare combinazioni stabili. L'impiego di proteine, nel corso di pratiche di "fining" in enologia, sottintende fenomeni complessi, i cui meccanismi non sono ancora completamente noti.

Nel contesto di questa tesi, sono state utilizzate metodologie di indagine in grado di fornire informazioni circa l'organizzazione strutturale, ed in particolar modo sulle caratteristiche di idrofobicità superficiale, di proteine di origine vegetale potenzialmente utilizzabili (o già utilizzate su basi empiriche) nel processo produttivo di vini. In particolare, è stata posta attenzione nel rilevare la possibilità di misurare, attraverso la metodologia impiegata, ipotetiche interazioni preferenziali tra molecole idrofobiche (polifenoli) e le proteine di origine vegetale oggetto di studio. Tale lavoro è stato condotto su sistemi proteici appartenenti a pisello, soia, lenticchia e frumento (glutine).

Lo studio della frazione solubile dei diversi complessi proteici fornisce una loro caratterizzazione all'interno dei diversi sistemi tampone impiegati ed un loro raffronto con proteine solubili e note per dar luogo ad interazioni superficiali di tipo idrofobico. La sospensione di diversi estratti di origine vegetale all'interno dei sistemi tampone determina il passaggio in soluzione di diverse quantità di proteina, caratterizzate da valori di idrofobicità superficiale differenti. La caratterizzazione strutturale da noi svolta sottolinea che gli estratti siano soggetti alla solubilizzazione di proteine dotate di siti idrofobici solamente qualora si usi tampone a pH 7.00. Utilizzando quest'ultimo sistema tampone i sistemi proteici si sono differenziati in termini di idrofobicità superficiale.

Lo studio di sospensioni degli estratti vegetali, in un sistema tampone a pH 3.50, mostra intorni idrofobici che identificano i diversi sistemi proteici. La presenza di etanolo in una concentrazione 10% (v/v) non determina variazioni dei valori di idrofobicità.

I sistemi proteici presenti nella frazione insolubile si caratterizzano per la capacità di trattenere quantità differenti di molecole idrofobiche, in accordo con i valori di idrofobicità superficiale ottenuti nello studio di sospensioni. La valutazione delle sospensioni dei sistemi proteici, ed i risultati ottenuti nella caratterizzazione della frazione solubile degli estratti stessi suggeriscono che le sospensioni, a pH 3.50, siano caratterizzate, in termini di idrofobicità superficiale, solamente dalla frazione insolubile.

Le misurazioni atte a valutare ipotetiche interazioni superficiali idrofobiche tra le molecole polifenoliche e le proteine di origine vegetale oggetto di studio, evidenziano una diminuzione del numero di molecole idrofobiche legate (utilizzate come marcatore nei nostri studi), come conseguenza della presenza in soluzione di strutture polifenoliche. La titolazione di siti idrofobici in presenza di catechina e proantocianidine polimerizzate mostra un'affinità apparentemente più bassa dei complessi proteici per il marcatore idrofobico in presenza di polifenoli, che pertanto sembrano competere con le molecole idrofobiche del marcatore per il legame alla proteina. Le variazioni dei dati strumentali diversificano i complessi proteici in esame.

La diminuzione del numero di siti idrofobici accessibili e la variazione apparente di affinità osservati nello studio di sospensioni di estratti vegetali, come conseguenza dell'impiego di molecole polifenoliche, non trova conferma in una diminuita concentrazione di molecole idrofobiche all'interno della frazione insolubile degli estratti stessi. Un'ipotesi al riguardo è che l'interazione idrofobica dei composti polifenolici avvenga nei confronti della frazione insolubile ma

l'interazione stessa non sia abbastanza forte da legare da sola la molecola fenolica e determinare il suo trattenimento con conseguente diminuzione della quantità di marcatore nel *pellet*.

L'analisi mediante metodiche LC-MS delle molecole fenoliche legate alla frazione insolubile degli estratti evidenzia come venga trattenuto un diverso quantitativo di composti fenolici in funzione del sistema proteico impiegato. L'assenza di polimeri di composti fenolici trattenuti dalla frazione insolubile dei sistemi proteici dopo interazione con una soluzione di monomero evidenzia che i complessi proteici non inducono reazioni di formazione di nuovi copolimeri fenolici. A causa della complessità delle strutture polimeriche delle proantocianidine polimerizzate, che rendono difficile la caratterizzazione e la quantificazione delle molecole trattenute dalla frazione insolubile dei complessi proteici, i risultati circa l'analisi delle strutture polifenoliche trattenute dalla frazione insolubile dei sistemi proteici oggetto di studio sono, per ora, lontani da una conclusione univoca.

Il lavoro sperimentale condotto ha permesso una caratterizzazione di sistemi proteici di origine vegetale in termini di idrofobicità superficiale. La valutazione di ipotetiche interazioni preferenziali tra molecole idrofobiche (polifenoli) e proteine di origine vegetale necessita di ulteriori indagini atte ad individuare le basi molecolari dei meccanismi di interazione e le conseguenze applicative per un utilizzo più selettivo e mirato dei chiarificanti in enologia.