

DOCUMENTO
AZIENDALE

* **Fabio Chinnici**
* **Claudio Riponi**
* **Francesca Sonni**
** **Luigi Pirrone**
*** **Attilio Bellachioma**
*** **Matteo Cavagna**

* Dipartimento di Scienze degli
Alimenti - Università di Bologna
** Sezione Industrie Dipartimento
di Ingegneria e Tecnologie
AgroForestali - Facoltà di Agraria
Università di Palermo
*** Pool tecnico
Oliver Ogar Italia S.p.a.



Da sinistra
A. Bellachioma,
F. Chinnici,
F. Sonni,
C. Riponi

INTERAZIONE FRA IL LISOZIMA ESTRATTO DA UOVO ED ALCUNI MACROCOMPONENTI DI MOSTI E VINI

Lo studio ha riguardato l'entità dell'interazione fra il lisozima ed alcuni dei principali costituenti di mosti e vini. I risultati mostrano che glucosio e fruttosio non diminuiscono significativamente il livello di proteina né la sua attività enzimatica mentre per etanolo, tannino, pectina, SO₂ e polifenoli, si è registrato un grado crescente di interazione.

Introduzione

Il lisozima (E.C. 3.2.1.17) è una proteina a carattere enzimatico, di origine naturale, che è in grado di esercitare attività litica nei confronti di un largo spettro di batteri gram positivi (1). È da tempo utilizzato nell'industria alimentare per il controllo delle alterazioni batteriche e trova particolare applicazione nel settore caseario per contrastare lo sviluppo del gonfiore tardivo dovuto a *Clostridium* spp (2).

La sua azione litica è basata sull'idrolisi del legame 1-4 tra l'acido N-acetilmuramico e l'N-acetilglucosamina i quali costituiscono lo strato peptoglucanico della cellula batterica, la cui distruzione porta al disfacimento della parete stessa.

Per ciò che riguarda il settore enologico, sin dagli anni '90 è stato proposto l'uso del lisozima per il controllo della fermentazione malolattica (3,4), allo scopo di ridurre o eliminare l'impiego di anidride solforosa.

Successivamente, l'efficacia di questo approccio è stata dimostrata su mosti e vini bianchi e rossi (5) per svariate condizioni operative (6), nelle quali l'enzima estratto da bianco d'uovo è risultato in grado di inibire lo sviluppo dei batteri lattici durante la fermentazione e l'intero periodo di conservazione del vino.

Dal 1997, il trattamento di mosti e vini con lisozima estratto da uovo è una pratica ammessa dall'O.I.V. e, come tale, rientra fra gli additivi

utilizzabili nel corso della vinificazione.

In qualità di molecola proteica, una volta aggiunto al mezzo, il lisozima subisce una serie di interazioni con i composti presenti, che possono ridurre, anche notevolmente, l'attività antibatterica complessiva. Delfini et al. (5), per esempio, hanno rilevato una più alta percentuale di precipitazione della proteina aggiunta ai mosti rispetto ai vini, mentre Amati et al. (3,6) riferiscono della maggiore inibizione enzimatica che si verifica in vini rossi se paragonati ai vini bianchi.

È ormai accettato che le principali responsabili di tali interazioni siano le molecole polifenoliche (5), composti maggiormente presenti nei vini rossi e nei mosti e che hanno dimostrato di complessare rapidamente le proteine. Appare ugualmente vero, però, che diverse evidenze sperimentali (alcune ottenute anche dal nostro gruppo di ricerca) indichino che possono esistere altri meccanismi e altri componenti, che dovrebbero essere indagati, in grado di interferire sull'attività litica del lisozima.

Complessivamente, questi fenomeni tendono a ridurre il livello di protezione contro le alterazioni lattiche offerto dal lisozima e costituiscono senza dubbio uno dei problemi di carattere tecnologico che l'enologo è chiamato ad affrontare nel caso di vinificazioni condotte a ridotti tenori in anidride solforosa.

Nel presente lavoro si sono volute indagare le modalità e l'intensità delle interazioni intercorrenti fra il lisozima ed alcuni dei principali macrocomponenti dei mosti e dei vini.

Allo scopo di semplificare l'interpretazione dei risultati, è stata utilizzata una matrice modello a pH 3.2 alla quale è stato aggiunto ciascun macrocomponente singolarmente e sulla quale è stato determinata la quantità di enzima residuo dopo 2, 24 e 48 ore dall'avvenuta aggiunta.

Infine, la quantità di enzima residuo è stata espressa sia in termini di proteina

residua (valutata mediante la tecnica HPLC-FLD) sia come % di attività enzimatica (analisi turbidimetrica), in modo da poter evidenziare eventuali riduzioni/inibizioni dell'attività specifica enzimatica della proteina libera.

Materiali e metodi

Matrici Modello e Macrocomponenti indagati.

Alla matrice modello (3 g/L di acido tartarico in acqua distillata aggiustata a pH 3.2 con HCl), sono stati aggiunti singolarmente ciascuno dei macrocomponenti di mosti e vini indicati in Tab. 1. La stessa tabella indica le quantità aggiunte ed alcune caratteristiche dei composti utilizzati. Ad ogni soluzione così preparata, sono stati aggiunti 250 mg/L di lisozima (Oliver Ogar Italia - Verona).

L'estratto fenolico è stato ottenuto a partire da un vino proveniente da uve sangiovese, vinificato nel nostro laboratorio ed estratto seguendo il metodo riportato da Tomas-Barberan et al. (7). Dopo l'aggiunta di tale estratto, la soluzione modello presentava i seguenti valori: a) Polifenoli totali: 1.50 g/L (espressi come acido gallico); b) Antociani totali: 260 mg/L (espressi come malvidina) c) Acidi Idrossicinnamici: 165 mg/L (espressi come acido caffeico).

Per ciascuna prova, quella in bianco era rappresentata dal lisozima aggiunto nella soluzione modello priva del macrocomponente oggetto di studio.

Dopo 2, 24 e 48 ore, su ciascuna matrice modello è stata determinata la quantità e l'attività dell'enzima residuo nella matrice, utilizzando le metodiche riportate nei paragrafi successivi. Ogni valore è stato espresso in percentuale rispetto alla relativa prova in bianco valutata dopo un uguale numero di ore.

Per le prove nelle quali si è avuta la formazione di un precipitato (estratto polifenolico e pectina), al termine

della prova (cioè dopo 48 ore) si è proceduto alla quantificazione del lisozima sul precipitato stesso (ottenuto dopo centrifugazione della soluzione) e sul relativo surnatante.

Quantificazione della proteina residua. La proteina residua è stata valutata mediante HPLC-FLD utilizzando una metodica messa a punto dal nostro gruppo di ricerca (8), utilizzando lo stesso standard di lisozima usato nelle prove su matrice modello.

Quantificazione dell'attività enzimatica. Per la determinazione dell'attività dell'enzima si è utilizzata la metodica approvata dall'O.I.V (9).

Essa si basa sulla valutazione della diminuzione di torbidità di una sospensione di pareti di *Micrococcus luteus* a seguito dell'aggiunta di soluzioni contenenti l'enzima ad attività litica. In tale modo si giunge alla definizione della quantità di enzima nel mezzo in funzione della rapidità di lisi delle pareti batteriche (rilevata monitorando l'entità dell'illimpidimento della sospensione mediante spettrofotometro) paragonata ad una curva di calibrazione preventivamente eseguita con lisozima standard. Tale valore dipende non solo dalla quantità di proteina presente ma anche dall'attività specifica dell'enzima e, a parità di proteina totale, può variare a seconda del grado di inattivazione subito dall'enzima.

Discussione dei risultati

In Tab. 2 sono riportati i risultati ottenuti per le diverse prove.

Quasi tutti i macrocomponenti oggetto di studio hanno avuto una interazione con la proteina.

Glucosio e fruttosio, quando presenti contemporaneamente alle concentrazioni medie di un mosto, appaiono ridurre in maniera solo mar-

Tab. 1 - Quantità impiegate e caratteristiche dei macrocomponenti di mosti e vini utilizzati nelle prove

Macrocomponente	Quantità aggiunta	Note
Zuccheri	200 g/L	Aggiunti Glucosio e Fruttosio nel rapporto di 1:1
SO ₂	100 mg/L	Aggiunta nella forma di sale potassico
Etanolo	12% V/V	
Pectina di mela	2 g/L	Grado medio di metilazione: 70%
Tannino Liquido di galla	100 mg/L	Excellent Gold White (Oliver Ogar)
Estratto Polifenolico	pari ad un tenore in PFT di 1g/L (espressi in acido gallico)	Estratto da vino rosso, con metodo proposto da Tomas-Barberan et Al. (7), dopo dealcolazione sottovuoto

Tab. 2 - Percentuali di proteina ed attività residua nelle matrici modello aggrinte dei diversi macrocomponenti di mosti e vini

		Attività %	Proteina %
Zuccheri	2 h*	82.30	97.00
	24 h	91.97	98.30
	48 h	96.81	95.79
Etanolo	2 h	108.70	82.12
	24 h	93.20	81.89
	48 h	79.09	81.25
SO ₂	2 h	57.81	85.60
	24 h	19.55	67.24
	48 h	0.00	65.23
Tannino di galla	2 h	79.87	88.20
	24 h	75.22	94.13
	48 h	62.49	88.15
Pectina	2 h	91.57	87.04
	24 h	85.47	94.51
	48 h	58.14	75.63
Estratto polifenolico	2 h	0.00	2.13
	24 h	0.00	3.97
	48 h	0.00	1.72

* Tempo di contatto

ginale l'attività del lisozima ed il tenore di proteina residua.

Etanolo e anidride solforosa

Etanolo. In un mosto in fermentazione e, in misura maggiore in un vino, il progressivo accumulo di alcool può portare ad una parziale riduzione della attività enzimatica. Nella Tab. 2, infatti, è mostrato come dopo 48 ore dall'aggiunta, l'attività residua dell'enzima posto in una matrice contenente il 12% di etanolo, sia ridotta di circa il 20%. E' interessante notare il

leggero aumento di attività litica registrato dopo 2 ore, fenomeno che, per il lisozima, è già stato riportato da altri autori (10) utilizzando concentrazioni di alcool pari al 9.5 % per 200 minuti. Tale fenomeno è spiegabile con una probabile labile interazione di tipo aspecifico non-competitivo, a carico della struttura tridimensionale della proteina che favorirebbe una maggiore affinità fra enzima e substrato(10, 11). A maggiori concentrazioni di alcool e, soprattutto, per prolungati periodi di contatto, la proteina subisce alterazioni più profonde che ne riducono l'attività specifica, come

riscontrato anche per altri preparati enzimatici ad uso enologico (12). Il quantitativo di lisozima in soluzione subisce una rapida diminuzione di circa il 20% (entro le prime due ore), a causa di una parziale insolubilizzazione, per poi rimanere pressochè inalterato fino alla fine della prova.

Anidride solforosa. È noto come l'anidride solforosa sia in grado di interferire sulle attività enzimatiche di un vasto numero di enzimi. Per ciò che riguarda il lisozima, sono state segnalate riduzioni delle sue funzioni catalitiche a partire da con-

centrazioni superiori a 10 mg/L di anidride solforosa libera (3). Il meccanismo proposto è quello dell'interazione dello ione bisolfito con i ponti disolfuro presenti nella molecola, fatto che porterebbe ad un riarrangiamento della struttura terziaria ed a una variazione dell'attività biologica della proteina (13). In realtà, tale fenomeno coinvolge altresì le caratteristiche di solubilità della proteina riducendone la stabilità nel mezzo e la quantità totale di proteina libera (14). In particolare, Tirelli e De Noni (14), utilizzando una tecnica HPLC-FLD simile a quella utilizzata nel presente studio, seguita da una indagine spettrometrica, hanno stabilito che l'anidride solforosa è in grado di interagire con uno dei 4 ponti disolfuro dell'enzima portando alla formazione di un addotto tio-solfonato la cui presenza implicherebbe una diminuzione del lisozima nativo libero quantificabile mediante HPLC. Gli stessi autori, sulla base di una valutazione semiquantitativa dei picchi cromatografici presenti nel tracciato, ipotizzano l'esistenza di ulteriori forme di interazione di tipo covalente. I dati della Tab. 2 indicano che 100 mg/L di SO₂ libera sono in grado di ridurre sensibilmente l'attività litica sin dalle prime ore di contatto. L'inibizione è progredita nel tempo e, dopo 48 ore, la soluzione non presentava alcuna attività muramidasi. Questi dati sono sostanzialmente coincidenti con quelli riportati da Amati et al. (4) che avevano indicato una attività residua del 15% dopo 24 ore dall'aggiunta di 40 mg/L di anidride solforosa nella forma libera. Nelle nostre prove, ad una così drastica riduzione dell'azione enzimatica non è corrisposto un parallelo decremento della proteina in soluzione. Questa, infatti, decresce in maniera assai più graduale rimanendo in forma libera in una quantità pari a circa il 65% del quantitativo iniziale, anche dopo 48 ore. Considerando i dati appena

menzionati, quindi, si può dedurre che in queste condizioni la proteina residua nel mezzo, sebbene quantificabile cromatograficamente, non sia più in grado di svolgere alcuna funzione antibatterica, probabilmente a causa delle modificazioni nella struttura indotte dalla presenza di HSO_3^- .

Appare altrettanto evidente come si prefiguri l'importanza tecnologica di monitorare entrambi i parametri (attività dell'enzima e proteina residua) per giungere ad una corretta valutazione delle azioni da intraprendere nel corso delle varie fasi del processo produttivo.

Tannino di galla e pectina

Tannino di galla. Il tannino di galla può rappresentare un valido ausilio per il controllo dei fenomeni ossidativi indesiderati nel corso della vinificazione. Il suo utilizzo è stato suggerito, sin dalle fasi di ammostamento, per le vinificazioni a ridotto o nullo utilizzo di anidride solforosa, nelle quali ha fornito risultati incoraggianti per ciò che concerne il contenimento dei fenomeni ossidativi (15) e l'esaltazione di alcune componenti aromatiche legate agli etilesteri (16). In quanto sostanzialmente composto da oligomeri dell'acido gallico e digallico, l'estratto di galla manifesta caratteristiche "tanniche" ed è lecito attendersi un certo grado di interazione fra questo additivo e le sostanze proteiche presenti nei mosti e nei vini. È noto, infatti, che queste due componenti di mosti e vini, possono interagire attraverso svariati meccanismi di tipo polare, idrofobico od anche attraverso legami del tipo idrogeno (17). In particolare, per ciò che concerne l'acido gallico ed i chinoni da questo derivanti, Rawel et al. (18) hanno stabilito che queste specie chimiche hanno una rilevante capacità di legarsi tramite legami covalenti alle funzioni aminiche libere, riducen-

do la attività e la solubilità della proteina.

A conferma di quanto atteso, la Tab. 2 mostra che vi è una progressiva diminuzione dell'attività enzimatica nelle 48 ore successive all'aggiunta del tannino. Questo suggerisce che il suo utilizzo in vinificazione, se abbinato con il lisozima, dovrà essere razionalizzato in modo da evitare un eccessivo depauperamento dell'azione enzimatica e del tannino di galla presente nel mezzo. A questo scopo, ad esempio, sarebbe buona norma operare aggiunte di enzima solamente dopo qualche ora (12-24 ore) dall'aggiunta di tannino al mosto, permettendo a quest'ultimo di svolgere l'azione antiradicalica, di protezione dall'ossigeno e di inattivazione delle proteine ossidasiche, prima di una sua eventuale interazione con il lisozima. Come già visto nel caso di etanolo e anidride solforosa, la quantità residua di proteina (pari a circa l'88% del tenore iniziale) è maggiore di quanto non risulti dall'analisi torbidimetrica dell'attività enzimatica, indicando una riduzione delle capacità litiche dell'enzima libero nel mezzo.

Pectina. Il contenuto in pectine di uve e mosti è funzione della cultivar, dello stadio di maturazione delle bacche e del loro stato sanitario (19). Mediamente, nei prodotti appena ammostati, il tenore di questo polimero glucosidico (il cui grado di metilazione è solitamente superiore al 70%) può variare tra 1 e 2 g/L.

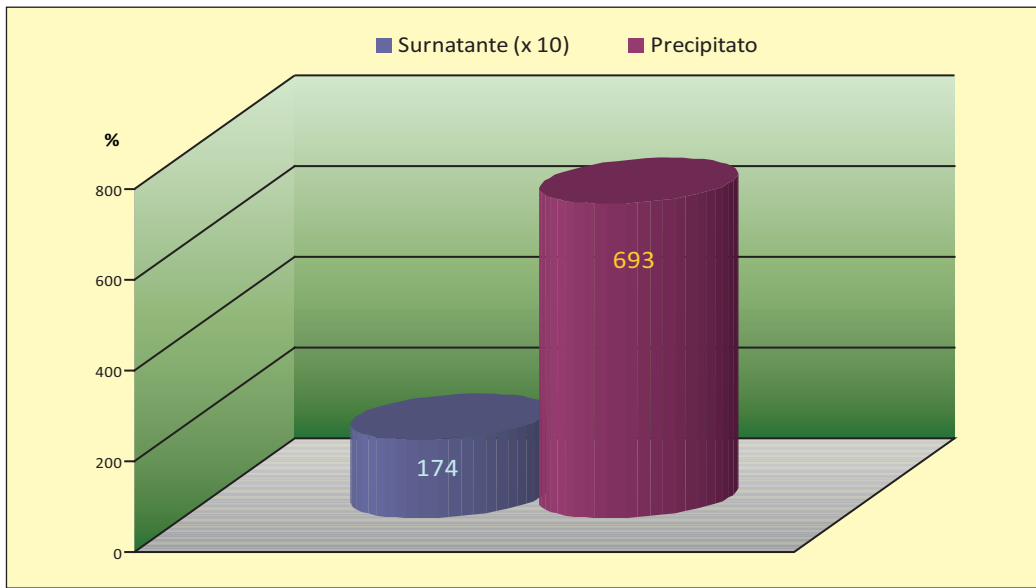
A pH acidi o in presenza di cationi, la pectina tende ad organizzarsi in strutture colloidali a doppia elica (idrogel) in grado di trattenere molecole d'acqua e fornire resistenza meccanica (20).

Nelle prove da noi eseguite su matrice modello contenente 2 g/L di pectina di mela, la progressiva comparsa di un precipitato di natura colloidale è coincisa con una diminuzione dell'attività enzimatica nella matrice, che

dopo 48 ore faceva registrare valori residui pari a circa il 60% rispetto all'attività iniziale (Tab. 2). Parallelamente, anche la proteina libera nel mezzo diminuiva progressivamente, anche se in modo meno marcato (- 25% in 48 ore).

Per approfondire le interazioni intercorrenti fra lisozima e pectina, si è proceduto a testare l'attività eventualmente presente, dopo 48 ore, nella frazione precipitata. A questo scopo, la matrice modello è stata dapprima centrifugata per separare una frazione surnatante ed un precipitato il quale è stato successivamente omogeneizzato e diluito 1:1 con la soluzione modello a pH 3.2. La Fig. 1 evidenzia una notevole attività litica del precipitato il quale pare aver catturato e "concentrato" una buona parte dell'enzima precedentemente in soluzione. La porzione proteica precipitata, quindi, ha dimostrato di conservare intatte le caratteristiche enzimatiche native. Per spiegare questi risultati, si può ipotizzare che la pectina, nel corso del processo di precipitazione, abbia esercitato sul lisozima una azione prevalentemente meccanica, di "intrappolamento" delle molecole proteiche nella maglia colloidale, che non ha comunque interferito con i siti attivi dell'enzima. L'enzima così precipitato, se liberato dalle maglie polisaccaridiche, può continuare ad esercitare azione antibatterica e, trasferendo il concetto alle reali condizioni di cantina, questi dati potrebbero suggerire che la movimentazione delle parti fecciose dei mosti-vino nel corso della fermentazione possa avere un ruolo di aumento dell'attività litica presente nella massa. Inoltre, l'uso di preparati enzimatici di tipo peccolitico potrebbe contribuire a liberare importanti quantità di enzima attivo. Il surnatante ottenuto a seguito della centrifugazione necessaria alla separazione del precipitato, ha mostrato un'attività enzimatica residua pari al 17.4 % del valore iniziale

Fig. 1 - Interazione del lisozima con la pectina; percentuali di attività residua nel precipitato e nel surnatante ottenuti per centrifugazione, dopo 48 ore dall'aggiunta



Per motivi grafici, i valori relativi al surnatante sono stati moltiplicati per 10

(Fig. 1), a conferma che le pratiche che favoriscono i processi di precipitazione/deposito di materiale polisaccaridico possono ridurre la presenza di lisozima nei mosti e/o nei vini sebbene, come dianzi detto, tale enzima mantenga buona parte della sua capacità litica una volta "liberato" dal reticolo pectico.

Estratto polifenolico

Diversi autori hanno evidenziato la notevole influenza che la componente fenolica può esercitare sui fenomeni di interazione/insolubilizzazione del lisozima. Il maggior livello di inattivazione enzimatica che si riscontra nei vini rossi, rispetto ai vini bianchi, ad esempio, è stato attribuito al più alto contenuto in polifenoli dei primi (21,22). Parimenti, come già detto in premessa, la maggior concentrazione in composti fenolici può influire sul livello di insolubilizzazione che si registra quando l'aggiunta è effettuata sin dalle prime fasi di vinificazione, direttamente al mosto, piuttosto che a fermentazione ultimata (5).

Uno dei possibili meccani-

smi di interazione fra lisozima e componenti fenolici monomeri è stato studiato da Rawel et al. (18) i quali suggeriscono che la reazione (di tipo covalente) possa procedere seguendo due diversi meccanismi a seconda che la molecola fenolica possa o meno ossidarsi generando derivati ortochinonici. Da questo punto di vista, la maggiore interazione avverrebbe con i chinoni generati tramite l'ossidazione di *o*-difenoli (quale ad esempio acido caffeico) e di acido gallico, mentre un limitato grado di reattività competerebbe ad altri composti quali l'acido ferulico e l'acido cumarico. Per ciò che concerne l'azione complessante esercitata dai flavonoidi (catechine, antociani e flavonoli), che costituiscono una porzione importante del patrimonio polifenolico dei vini, alcuni dati ottenuti da altri autori su albumina ed α -amilasi salivare sembrano indicare come il grado di interazione (e la percentuale di precipitazione) sia direttamente proporzionale al livello medio di polimerizzazione dei fenoli stessi e come la galloilazione aumenti la reattività di questi composti nei confronti delle proteine (23). Inoltre, a differenza di quanto riportato per i

chinoni degli acidi fenolici, le forze che governano questo tipo di interazioni sarebbero relativamente deboli, del tipo van der Waals o ponte idrogeno (24).

L'estratto polifenolico da noi utilizzato è stato predisposto con lo scopo di rappresentare la composizione in sostanze fenoliche di vini rossi giovani, nonostante non sia disponibile il dato relativo al grado medio di polimerizzazione della sua componente tannica.

Dai dati riportati nella Tab. 2, è evidente la forte interazione che avviene fra lisozima e polifenoli, già dopo due ore dall'aggiunta. L'attività enzimatica è prontamente e completamente inibita sin dalle prime fasi di contatto e tale rimane durante tutta la durata della prova. Parallelamente, anche la proteina residua in soluzione decresce in modo drastico e repentino già dopo due ore di contatto (Tab. 2) confermando che l'interazione fra la matrice fenolica e lisozima porta ad un allontanamento (per precipitazione) dell'enzima dalla soluzione. Senza dubbio, nelle condizioni da noi testate, l'entità dell'effetto esercitato dall'estratto polifenolico sulla proteina è superiore a quanto riscontra-

to dal nostro stesso gruppo e da altri autori su mosti o vini bianchi e rossi, dove il livello medio di inattivazione/precipitazione variava tra il 20 ed il 50% (nel caso di vini bianchi e mosti rossi, rispettivamente) (4, 5, 6). In tutte le prove di cantina da noi effettuate su mosti rossi, inoltre, la diminuzione del lisozima libero nel mezzo si è dimostrata essere assai graduale, tanto da permettere l'efficace svolgimento dell'attività enzimatica durante il corso della fermentazione e mantenere valori residui di lisozima pari al 50 - 60% anche successivamente, nelle fasi di stabilizzazione-conservazione dei vini.

I risultati divergenti, ottenuti in questo lavoro, potrebbero essere dovuti ad una alta percentuale in sostanze tanniche dell'estratto, od alla procedura da noi adottata per l'estrazione della componente polifenolica (che può aver generato specie chimiche ossidate ad elevato grado di interazione con il lisozima) ma anche alla relativa "semplicità" del sistema modello utilizzato, nel quale l'equilibrio colloidale della frazione fenolica può differire da quanto avviene nel mezzo reale.

L'analisi del precipitato, ottenuto in modo simile a quanto già descritto nel caso della pectina, dimostra che la complessazione del lisozima da parte dell'estratto polifenolico da noi utilizzato ha carattere forte e porta alla rilevante inibizione dell'attività enzimatica della proteina (dati non mostrati).

Considerazioni conclusive

Le indagini oggetto del presente lavoro hanno permesso di evidenziare le modalità e l'intensità dell'interazione intercorrente fra il lisozima e alcuni macrocomponenti di mosti e vini. Tra tutte le molecole testate, i polifenoli hanno senza dubbio mostrato di esercitare il maggior livello di complessazione enzimatica, seguiti

da anidride solforosa e pectina. Per quest'ultima, le determinazioni condotte sulla frazione precipitata rivelano che una buona parte dell'attività proteica rimane inalterata e potrebbe svolgere azione antibatterica se movimentata nella massa. Un minor grado di complessazione compete al tannino di galla ed all'etanolo mentre glucosio e fruttosio paiono non interagire con il lisozima.

Nel complesso, i dati raccolti indicano come in taluni casi (presenza di alte quantità di anidride solforosa libera o mezzi ricchi in pectina) i tenori di proteina libera rilevabili mediante analisi HPLC possano non rispecchiare la reale attività enzimatica presente nel mosto o nel vino e come, allo scopo di definire le modalità per una idonea gestione tecnologica del processo, sia necessario determinare entrambi i parametri analitici. ■

Bibliografia

1. Cunningham, F. E., V. A. Proctor, and S. J. Goetsch. 1991. Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poult. Sci. J.* 47:141-163.
2. Ghitti, C., G. Mosca, D. Lavezzari, and B. Bianchi Salvatori. 1983. Produzione di formaggio Grana con l'impiego di cloridrato di lisozima. *Ind. Latte* 19:49-61.
3. Amati, A., F. Chinnici, and A. Piva. 1994. Il lisozima in enologia per il controllo della fermentazione malolattica. *Ind. Bevande* 23:215-221.
4. Amati, A., G. Arfelli, C. Riponi, A., Piva, and F. Chinnici. 1996a. Emploi du lysozyme pour le controle de la fermentation malolactique des vins. Presented to "Groupe d'expert code international des pratiques oenologiques, Oiv", Paris, september 1996, Proceedings.
5. C. Delfini, M. Cersosimo, V. Del Prete, M. Strano, G. Gaetano, A. Pagliara, S. Ambrò. Resistance Screening Essay of Wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (7), pp 1861-1866.
6. Amati, A., F. Chinnici, A. Piva, G. Arfelli, and C. Riponi. 1996b. Influence of enological operations on lysozyme activity in wine-making. *Vitic. Enol. Sci.* 51:59-62.
7. Tomás-Barberán F. A., Blázquez M. A., Garcia-Viguera C., Ferreres F., Tomás-Lorente F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochemical Analysis*. 3 (4), 178 - 181.
8. Riponi C, Natali N, Chinnici F, Quantitation of hen's egg white lysozyme in wines by an improved HPLC-FLD analytical method. *Am. J. Enol. Vitic.* 58: 405-409 (2007).
9. Resolution oeno 15/2001. O.I.V. - Paris.
10. Brecher A. S., Riley C., Basista M, H. Acetaldehyde-modified lysozyme function: Its potential implication in the promotion of infection in alcoholics. *Alcohol*, 1995, 12, (2) 169-172.
11. Millar, D. G., Griffiths-Smiths, K., Algar E., Scopes, R. K. 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotech. Letters*, 4, (9), 601-606.
12. Zinnai, A., Andrich, L., Venturi, F., Andrich, G. 2007. Effetto della temperatura e della concentrazione di etanolo sulla cinetica di degradazione del β -glucano. *Industrie bevande* 36 227-232.
13. Cecil, R., Wake, R. G. The Reactions of Inter- and Intra-Chain Disulphide Bonds in Proteins with sulphite. *Biochem. J.* (1962) 82, 401.
14. Tirelli A., De Noni, I. Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. *Food Chem.* 105 (2007) 1564-1570.
15. A. Bellachioma, C. Riponi, F. Chinnici, F. Sonni "Applicazione di un protocollo sperimentale per la produzione di vini bianchi in assenza di SO₂". *L'Enologo*, 5: 77-81 (2008).
16. Sonni, F., Cejudo Basterante, M.J., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *J. Sci. Food Agric.* 2009; 89: 688-696.
17. Asano, K; Shinagawa, K; Hashimoto, N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1982; 40(4): 147-154.
18. Rawel, H., Kroll, J., Rohn, S. Reactions of phenolic substances with lysozyme - physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chem.* 2001 72, 59-71.
19. A. Ortega-Regules, J. M. Ros-García, A. B. Bautista-Ortín, J. M. López-Roca, E. Gómez-Plaza. Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 88, 3, 420-428.
20. Thom D., Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A. (1982) Characterisation of cation binding and gelation of poly-uronates by circular dichroism. *Carbohydr. Res.*, 100, 29-42.
21. F. Chinnici, A. Piva, G. Arfelli, A. Amati. Effetti dell'ossigenazione e del Lisozima sulla composizione di mosti da uve rosse. *Nota I. Ind. Bevande*, 1996, 25, (12), 571-576.
22. F. Chinnici, A. Piva, G. Arfelli, A. Amati. Effetti dell'ossigenazione e del Lisozima sulla composizione di mosti da uve rosse. *Nota II. Ind. Bevande*, 1997, 26 (4), 150-154.
23. S. Soares, N. Mateus, V. de Freitas. Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 6726-6735.
24. K. S. Ghosh, B. K. Sahoo, S. Dasgupta. Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme. *Chemical Physics Letters* 452 (2008) 193-197.