



# LAFFORT

*l'œnologie par nature*



## INFO

NUMERO 60 - Maggio - Giugno 2008

### ***Biotechnologie ed espressione aromatica dei vini***

Per affrontare questo tema è opportuno fare brevemente il punto sulla complessità aromatica del vino, in modo da vedere quali sono le molecole implicate, la loro origine, ed i meccanismi di formazione. Questo ci permetterà di capire come l'applicazione di alcune biotechnologie possa intervenire a favore dell'espressione degli aromi dei vini.

#### **Introduzione**

L'aroma dei vini è il risultato di numerosi fattori :

- ♦ metabolismo della pianta, legato a vitigno, suolo, clima, pratiche agronomiche, ecc...,
- ♦ biochimismi prefermentativi che agiscono sull'estrazione degli aromi primari e dei loro precursori;
- ♦ metabolismo dei microrganismi responsabili della fermentazione alcolica e malo-lattica;
- ♦ reazioni chimiche ed enzimatiche che avvengono durante l'affinamento dei vini.

La complessità aromatica del vino può dunque essere studiata cercando di classificare i composti odorosi in diverse famiglie facenti riferimento alla loro origine ed alle caratteristiche chimiche.

Di seguito prenderemo in considerazione :

- Aromi varietali, caratteristici dei diversi vitigni, possono essere presenti nell'acino già in forma libera attiva o sotto forma di precursori. Gli aromi identificati vengono raggruppati nelle seguenti famiglie:
  - ⇒ Terpeni
  - ⇒ Nor-isoprenoidi
  - ⇒ Tioli
  - ⇒ Pirazine
  - ⇒ Rotundone
- Aromi fermentativi, rappresentati da alcoli superiori ed esteri, formati dai lieviti durante la fermentazione.

#### **Aromi varietali**

I terpeni o alcoli terpenici possono essere presenti nelle uve in forma libera, aromaticamente attiva, o sotto forma di glicosidi terpenici, ossia legati a mono o di-glicosidi. Alcuni vitigni come Moscato, Malvasia, Bracchetto ne sono particolarmente ricchi, ed il loro aroma è nettamente caratterizzato da queste molecole. Altri vitigni ne contengono in tracce. La concentrazione delle forme glicosilate nell'uva è da 3 a 10 volte più abbondante che le forme libere. Ma le molecole glicosilate sono inodori.

Composto	Descrittori	Soglia di percezione
Linalolo	Rosa	50 µg/L
α-terpineolo	Mughetto	400 µg/L
Citronellolo	Citronella	18 µg/L
Nerolo	Rosa	400 µg/L
Geraniolo	Rosa	130 µg/L
Ho-trienolo	Tiglio	110 µg/L

Alla famiglia dei norisoprenoli appartengono il β-damascenone ed il β-ionone, composti varietali derivanti dalla degradazione dei carotenoidi. Anch'essi possono essere presenti nell'uva sotto forma di derivati glicosilati.

Non sono molto importanti per la loro espressione aromatica diretta, dato che difficilmente raggiungono concentrazioni superiori alla soglia di percezione, ma anche a basse concentrazioni sono in grado di funzionare come esaltatori di aromi fruttati, per questo assumono una certa rilevanza nell'aroma dei vini rossi.

Composto	Descrittori	Soglia di percezione
β-damascenone	Odore complesso floreale e di composta di mele	45 ng/L
β-ionone	Violetta	800 µL/L

I tioli volatili sono le molecole responsabili di una grande varietà di note e sfumature aromatiche (gemma di cassis, bosso, pompelmo, frutto della passione, ...) tipiche del vino Sauvignon blanc, ove sono state identificate per la prima volta, ma presenti, anche se in minor concentrazione, in molti altri vini quali Gewurtztraminer, Riesling, Pinot grigio, ecc. Una delle prime osservazioni fatte è che la loro espressione si attenua nel momento in cui viene aggiunto rame al vino. Questo è stato uno degli indizi che ne ha fatto comprendere la natura tiolica.

Queste molecole non sono presenti come tali nei mosti, che infatti non sono odorosi, ma sotto forma di precursori derivanti dalla L-cisteina che, grazie all'attività dei lieviti, vengono trasformati nei tioli aromatici corrispondenti. E' infatti durante la fermentazione alcolica che si sviluppa l'aromaticità. Nelle uve i precursori sono a loro volta legati a molecole più complesse, parliamo allora di pre-precursori, che nelle fasi prefermentative di estrazione dei succhi possono essere idrolizzati e liberare i precursori.

Le pirazine, tra cui le più note sono la 2-metossi-3-isobutil pirazina e la 2-metossi-3-isopropil pirazina, sono le molecole responsabili delle tipiche note erbacee e di peperone verde del vino Cabernet sauvignon, Merlot e talvolta Sauvignon.

Il rotundone è una molecola di recente individuazione isolata nell'ambito di studi sulla caratterizzazione dell'aroma del vino Syrah, e sarebbe responsabile della tipica nota di pepe nero.

#### **Aromi fermentativi**

Gli aromi fermentativi, detti anche aromi secondari, si formano ad opera dei lieviti durante la fermentazione a partire dagli amminoacidi contenuti nei mosti. La loro presenza nei vini è legata al ceppo di lievito responsabile della fermentazione.

Tioli volatili identificati	Descrittori	Soglia di percezione
4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP)	Bosso, ginestra	0,8 ng/L
Acetato di 3-mercapto-esan-1-olo (A3MH)	Bosso, pompelmo, frutto della passione	4 ng/L
3-mercapto-esan-1-olo (3MH)	Pompelmo, frutto della passione	60 ng/L
4-mercapto-4-metil-pentan-2-olo (4MMPOH)	Fiori di agrumi	55 ng/L
Furfuriltiolo (FFT)	Caffè torrefatto	0,4 ng/L
2-metil-3-furantiolo (2MFT)	Carne arrostita	1 ng/L

Le dosi raccomandate per questo enzima sono intorno ai 3 – 5 g/hl, ma si può arrivare anche a 10 g/hl in caso di vini a forte residuo zuccherino. Il tempo di contatto è dell'ordine delle 3 – 5 settimane, seguendo sempre l'evoluzione dell'aroma con la degustazione. Quando si ritiene che il vino abbia sviluppato il livello aromatico desiderato l'attività enzimatica può essere bloccata con un leggero trattamento alla bentonite (5-10 g/hl).

E' ovvio che l'effetto è tanto maggiore quanto più il vino è ricco di terpeni glicosidati, su vini che ne sono privi l'enzima non ha nessun effetto.

zione, alle condizioni ambientali in cui essa si svolge (temperatura, torbidità dei mosti, stato nutrizionale) ed alle condizioni di conservazione dei vini. Le molecole identificate sono molte, nella tabella sono riportate le più importanti.

### Quale contributo dalle biotecnologie

Visto il quadro generale, cerchiamo di capire quale contributo possono dare le biotecnologie alla loro espressione. Per quanto riguarda gli aromi primari, con le diverse implicazioni accennate, si può cercare di intervenire migliorandone l'estrazione dalla materia prima e favorendone la rivelazione durante le tappe pre-fermentative, fermentative e post-fermentative. Questo è possibile ricorrendo a preparati enzimatici specifici, debitamente purificati ed utilizzando lieviti appositamente selezionati.

### Rivelazione di aromi terpenici.

L'idrolisi enzimatica dei glicosidi-terpenici, prevede l'intervento di un'attività  $\beta$ -glicosidasi, che seguendo un meccanismo di tipo sequenziale, porta alla liberazione ed attivazione della frazione legata. In alcuni vini bianchi tipo Moscato, Riesling, Gewurztraminer, Chardonnay, ecc. ciò permette di migliorarne in maniera significativa l'espressione aromatica.

Questa attività enzimatica può essere presente naturalmente nell'uva o nei lieviti, ma spesso non è sufficiente a liberare tutto il potenziale aromatico. Si può fare allora ricorso a preparati enzimatici esogeni. Si tratta di preparati enzimatici pectolitici a forte attività  $\beta$ -glicosidasi.

L'attività  $\beta$ -glicosidasi è soggetta ad inibizione di tipo competitivo per il sito attivo dell'enzima da parte degli zuccheri, per questo non può essere impiegata sui mosti; l'uso è consigliato sui vini verso fine fermentazione quando gli zuccheri sono sotto i 20 g/l, oppure su vini finiti.

### Rivelazione di aromi tiolici

Il tenore di aromi che riusciamo ad avere nel vino è proporzionale al tenore in precursori presenti nel mosto. La fermentazione alcolica permette di trasformare i precursori nelle rispettive molecole odorose, ad esempio il precursore del 3-mercaptoesano (3-MH) ha un rendimento di trasformazione in 3-MH libero intorno al 10%, questo tasso è influenzato dalla composizione del mosto e dal ceppo di lievito che conduce la fermentazione.

Nello sfruttamento del potenziale aromatico dell'uva un ruolo determinante è giocato dal passaggio precedente, ossia la liberazione dei precursori da parte dei rispettivi pre-precursori. Riprendendo l'esempio del 3-MH, secondo studi del Peyrot, il pre-precursore presente nell'uva, ha un tasso di trasformazione in precursore < 0,28 %. Viene allora ad assumere grande importanza la tecnica di estrazione dei succhi. L'introduzione di varianti tecnologiche che permettano di migliorare la diffusione dalla frazione solida verso quella liquida (macerazione pellicolare, stabulazione liquida a freddo, ...) con l'ausilio di specifici preparati enzimatici consente di aumentare questo tasso.

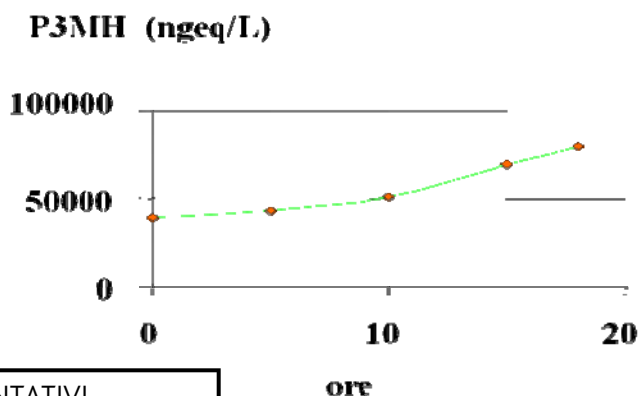


Fig. 1 – Evoluzione della concentrazione di precursori di 3MH nel corso della macerazione pellicolare.

MOLECOLE RESPONSABILI DEGLI AROMI FERMENTATIVI					
Composto	Descrittori	Soglie di percezione (mg/l)			Concentrazione nei vini
		acqua	vino B	vino R	
Acetato d'isoamile	Banana, bonbon anglais	0,02	2,70	1,60	0,1 – 5,0
Acetato d'isobutile	Banana, fruttato	0,25	3,50	3	0,01 – 4,00
Acetato di fenil etile	Rosa	0,13	6	8	0 – 20
2-fenil-etanolo	Rosa	0,50	20	45	4 – 200
Acetato d'esile	Pera	0,075	2,4	2,7	0 – 5
Butanoato d'etile	Ananas	0,001	0,2	0,4	0,01 – 10,0
Esanoato d'etile	Mela verde	0,002	1	1,4	0,03 – 5,00
Ottanoato d'etile	Sapone, solvente	0,06	2	1,5	0,05 – 4,00
Decanoato d'etile	Floresale, sapone	0,25	2,5	1,5	0 - 2

Si tratta di enzimi da macerazione che agiscono in maniera mirata sull'estrazione di precursori aromatici, permettendo di limitare le azioni meccaniche, che hanno sempre un effetto estrattivo generico. Inoltre gli enzimi facilitano la successiva chiarifica dei mosti e, se opportunamente purificati, preservano la freschezza aromatica dei vini.

Il grafico di fig. 1 mette in evidenza come durante le operazioni prefermentative il tenore del precursore del 3-MH nel mosto vada incontro ad una evoluzione positiva nel corso di una macerazione pellicolare. Volendo operare a temperature più bassa e per tempi più brevi senza perdere efficacia si può ricorrere all'uso di preparati enzimatici specifici che consentono di estrarre buone quantità di precursori aromatici senza eccedere nell'estrazione di composti polifenolici indesiderati. La concentrazione di 3MH, notoriamente contenuto nelle bucce, aumenta nel caso di macerazione pellicolare a bassa temperatura (8° - 10° C) in presenza di appositi preparati enzimatici.

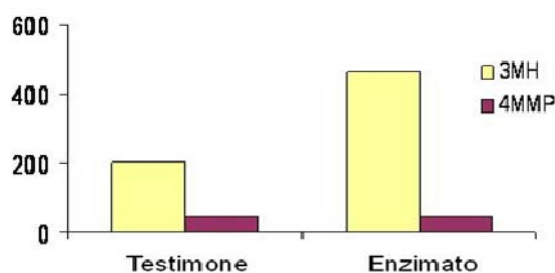


Fig. 2 – Concentrazione di 3MH e 4MMP in vino ottenuti con e senza impiego di enzimi

Non tutti i preparati enzimatici portano agli stessi risultati in termini di estrazione globale. Di seguito riportiamo i dati analitici di prove condotte impiegando un preparato enzimatico di vecchia generazione con un nuovo formulato. Le prove sono state condotte su uve Sauvignon blanc in una cantina neozelandese.

Come si evince dai dati della tabella, mentre i parametri generali restano invariati il preparato enzimatico tradizionale indicato con A induce un certo aumento nella componente del colore, quindi nell'estrazione dei composti fenolici dalle bucce, mentre l'enzima di nuova generazione (Lafazym press) risulta più attivo nell'estrazione di composti aromatici tipici del Sauvignon.

PROVE SU SAUVIGNON BLANC	LAFAZYM PRESS	ENZIMA A
4MMP ng/L (bosso, ginestra)	nd	nd
A3MH ng/L (frutto della passione)	126	79
3MH ng/L (pompelmo, frut. passione)	870	598
Metossi pirazina ng/L (peperone verde)	3	2
Acidità totale (g/L)	7,73	7,73
pH	3,24	3,24
Acido malico (g/L)	3,67	3,62
Acidità volatile (g/L)	0,22	0,28
SO <sub>2</sub> libera (mg/L)	65	72
SO <sub>2</sub> totale (mg/L)	166	162
D.O. 420	0,084	0,093
D.O. 520	0,024	0,037
D.O. 620	0,011	0,025
420 + 520 + 620	0,119	0,155

Durante le operazioni prefermentative si devono inoltre prendere tutte le precauzioni necessarie per evitare l'ossidazione dei tioli volatili. Si dovrà dunque procedere ad un solfitaggio ragionato, ove possibile ricorrere all'impiego di CO<sub>2</sub> sia come inerte in fase di macerazione, sia in fase di travaso dei succhi. Buona norma è separare sempre le ultime pressate, più ricche di sostanze fenoliche che possono assu-

mere il ruolo di intermedi di ossidazione. Le pressate potranno eventualmente essere aggiunte alla massa dopo specifico trattamento di chiarifica.

Una volta ottenuti mosti ricchi di precursori si deve ottimizzare la trasformazione nella forma attiva. Questa viene rilasciata nel corso della fermentazione alcolica, probabilmente per intervento di una β-liasi specifica facente parte del patrimonio enzimatico di *Saccharomyces cerevisiae*. Un ruolo importante è perciò assunto dal ceppo di lievito che conduce la fermentazione. Alcuni ceppi sono stati pertanto selezionati in base a questa specifica attitudine, anche impiegando tecniche molto innovative.

Su questa attività dei lieviti influiscono diversi fattori come la temperatura e le condizioni di nutrizione.

Per quanto riguarda la temperatura di fermentazione i diversi studi hanno dimostrato come temperature di 20° C siano nettamente più favorevoli alla rivelazione di questi aromi rispetto a temperature di 13° C. Forse trattandosi di un fenomeno enzimatico, giova di temperature più alte.

A proposito di nutrizione possiamo dire che mettendo i lieviti

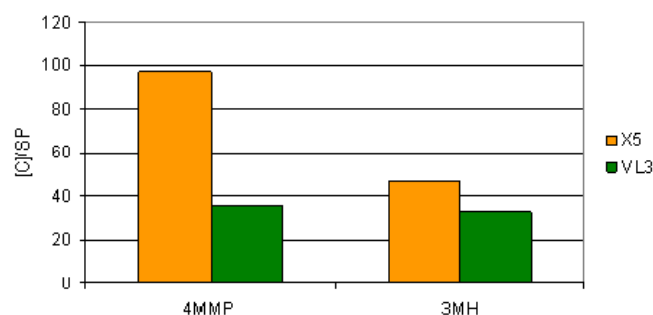


Fig. 3 - Incidenza del ceppo di lievito sulla rivelazione degli aromi di un vino Sauvignon (vendemmia 2007)

nelle migliori condizioni si ottengono i risultati più interessanti. Per questo è raccomandabile un controllo dell'APA al momento dell'avvio della fermentazione seguito all'occorrenza da tempestivi interventi correttivi.

Molto efficaci si sono inoltre rivelati attivatori di lieviti di ultima generazione, da utilizzare in fase di riattivazione dei lieviti allo scopo di apportare esclusivamente alla nostra popolazione fattori di crescita e fattori di sopravvivenza (Superstart). Vinificando con lo stesso ceppo di lievito, aliquote diverse dello stesso mosto, in presenza od in assenza di tale attivatore si sono registrati incrementi fino a 2volte.

### Implicazioni particolari lieviti-aromi.

Già da tempo sono stati messi in evidenza gli effetti negativi dei vinil fenoli sull'aroma dei vini bianchi.

Il 4-vinil-guaiacolo e soprattutto il 4-vinil-fenolo, a causa del loro odore farmaceutico, influiscono negativamente sulla franchezza aromatica dei vini bianchi. La loro soglia di percezione è molto bassa e permane bassa anche per i prodotti in miscela. A concentrazione inferiori alla soglia interferiscono comunque con la percezione olfattiva generale mascherando gli aromi primari

Una via di formazione di questi composti è data dalla trasformazione di acidi fenolici liberi (presenti anche naturalmente nei mosti) sotto l'azione della cinnamato decarbossilasi propria di *Saccharomyces cerevisiae* nel corso della fermentazione alcolica.

Uno studio effettuato da ricercatori americani sui lieviti da birra ha permesso di individuare il gene la cui espressione porta alla sintesi della cinnamato decarbossilasi e quindi alla

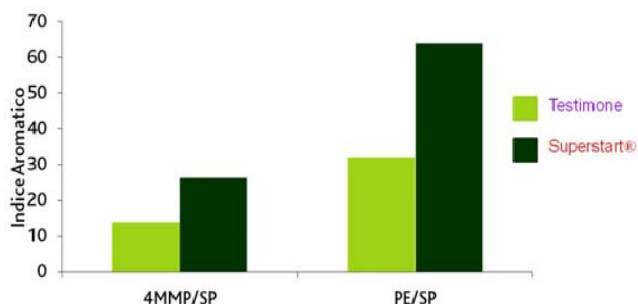


Fig. 4. – Effetto dell'uso di attivatori di lievito sull'espressione aromatica dei vini.

presenza di vinil-fenoli nei prodotti fermentati. Questo gene è stato chiamato POF 1, che significa Phenol Off Flavour (difetto di odore fenolico). I lieviti possono essere classificati in 2 famiglie :

- Lieviti POF (+) in cui il gene POF 1 si esprime completamente, durante la fermentazione producono vinil-fenoli;
- Lieviti POF (-) in cui il gene POF 1 si esprime poco, durante la fermentazione producono quantità trascurabili di vinil-fenoli .

La maggior parte dei lieviti esistenti in natura e dei lieviti enologici commerciali sono POF (+). Solo pochi ceppi commerciali sono POF (-) e tra questi figurano lo storico Zymaflore VL1, di cui sono note le qualità di finezza e franchezza aromatica, a cui oggi si affiancano i ceppi Zymaflore VL2 e Zymaflore X16 .

### Aromi fruttati dei vini rossi

Negli ultimi anni, spinti anche dal consumatore, ci si è molto

Composto	sensazione olfattiva	soglia di percezione olfattiva su vino mg/L	
		Bianco	Rosso
4-vinil-guaiacolo	chiodo garofano	0,44	0,38
4-vinil-fenolo	vernice, datura,	0,77	1,50
miscela 1:1		0,70	

interessati allo studio dell'aroma "fruttato" dei vini rossi.

Allo stato attuale delle conoscenze questo non è ascrivibile a nessuna molecola, o gruppo di molecole, in particolare, anche se è stata vista la responsabilità di molecole come il  $\beta$ -damascenone, il  $\beta$ -ionone e più recentemente il dimetil solfito (DMS) che sicuramente giocano un ruolo sull'espressione dei sentori fruttati, sia direttamente sia come esaltatori.

E' certo che alcune pratiche enologiche contribuiscono a far aumentare l'espressione fruttata dei vini, tra queste possiamo annoverare la macerazione pre-fermentativa a freddo (MPF), l'impiego di enzimi da macerazione, l'attività di alcuni ceppi di lievito.

### Selezione di lieviti con la strategia del breeding

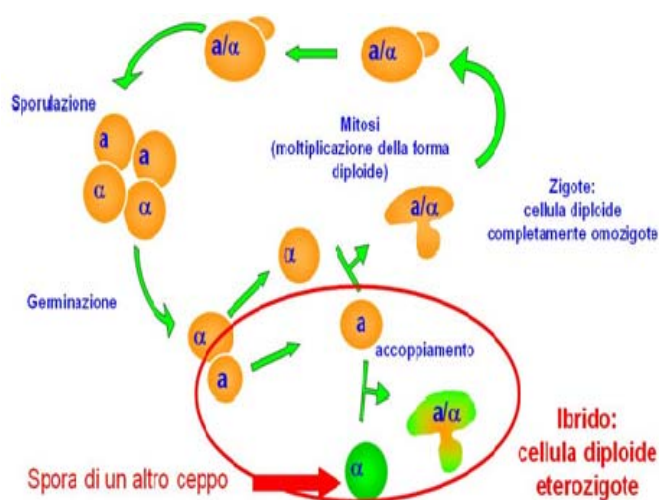
Un nuovo e potente strumento biotecnologico, sfruttabile anche per migliorare l'espressione aromatica dei vini, è la selezione dei lieviti applicando la tecnica dell'incrocio. Questa ha permesso l'introduzione in enologia di nuovi ceppi che combinano in uno stesso individuo caratteri complementari provenienti da ceppi diversi.

I lieviti normalmente si moltiplicano per via vegetativa (gemmazione), quello che accade normalmente nelle nostre vasche di fermentazione, ma come tutti i funghi possono

andare incontro ad un ciclo di riproduzione sessuata. In particolari condizioni ambientali, corrispondenti a situazioni di forte stress, le cellule di lievito sporificano, vanno in meiosi e danno origine ad aschi contenenti tetradi di spore monoziogoti di segno sessuale opposto. Se spore di segno opposto, provenienti da ceppi diversi si incontrano fondono il corredo cromosomico dando origine ad uno zigote con patrimonio genetico nuovo. Questo fenomeno, che può avvenire anche in natura, se controllato dal selezionatore può dare risultati interessanti.

Prefiggendosi un certo obiettivo enologico, è possibile per esempio scegliere un ceppo P1 noto per le sue ottime caratteristiche fermentative ed un ceppo P2 noto per la sua gran-

Fig. 6 – Ciclo riproduttivo di cellule di lievito con intervento dell'incrocio



de capacità di produrre aromi fermentativi. Incrociando questi due ceppi parentali si ottengono cellule figlie nella cui progenie si troveranno individui che ricombinano in modo diverso i caratteri dei genitori. Operando una selezione massale su questi individui sarà possibile isolare cellule dotate di entrambi i caratteri che restano fissati nel loro corredo cromosomico.

### Conclusioni

Non dobbiamo dimenticare che le molecole molto odorose, aromi, sono particolarmente reattive, dunque vulnerabili, nell'ambiente vino. Per la loro protezione e trasferimento in bottiglia è dunque indispensabile il minuzioso controllo delle condizioni di vinificazione, a partire dalle fasi di estrazione del succo, alla gestione della fermentazione fino alla conservazione durante l'affinamento e la preparazione all'imbottigliamento. Questo controllo deve passare dall'ottimizzazione dell'estrazione dei precursori aromatici, protezione contro l'ossidazione, scelta del ceppo di lievito, gestione dell'attività fermentativa. Tutto questo è importante se non indispensabile per permettere la loro espressione e il loro mantenimento.

Bisogna dunque operare nel senso di una buona gestione globale del processo, con una corretta tecnologia di lavorazione, nella quale inserire di volta in volta lo strumento biotecnologico più adatto, ricorrendo alle più recenti acquisizioni.