



# LAFFORT - INFO

NUMERO 12 - GIUGNO 2001



## SOMMARIO

### 1. Introduzione

### 2. Meccanismo di degradazione degli antociani

### 3. Misura dell'attività $\beta$ -glucosidasi

### 4. Conclusioni

## ENZIMI PURIFICATI IN ESTRAZIONE : UN PROGRESSO NELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO.

### 1. INTRODUZIONE

E' ormai noto a tutti, almeno a tutti coloro che operano nel settore enologico, quale sia l'importanza dell'utilizzo degli enzimi purificati nella produzione dei vini bianchi. I positivi risvolti qualitativi, che si ottengono impiegando enzimi privati di attività collaterali indesiderate, vedi cinnamil esterasi, sono stati ormai confermati dal mondo della ricerca, ma direi soprattutto dai molti enologi, che li utilizzano abitualmente con piena soddisfazione.

Naturale quindi il trasporre lo stesso concetto al settore della vinificazione in rosso, nel quale, se pur di introduzione più recente, l'impiego degli enzimi nella fase di macerazione sta dando buoni risultati, e l'ambizione di fare ancora meglio ha buone possibilità di essere largamente pagante.

Il tutto prende le mosse dalle seguenti considerazioni. Gli antociani monoglucosidati sono i principali responsabili del colore dei vini rossi ottenuti da *Vitis vinifera*. Nell'arco di qualche mese di conservazione dei vini rossi, gran parte di questi antociani si combina con i tannini per formare dei complessi stabili e più colorati. Per contro gli antociani che restano in forma libera sono relativamente instabili e si possono degradare per via radicalica o per via ossidativa in presenza di luce e/o di calore. Le  $\beta$ -glucosidasi sono note per accelerare questo tipo di degradazione.

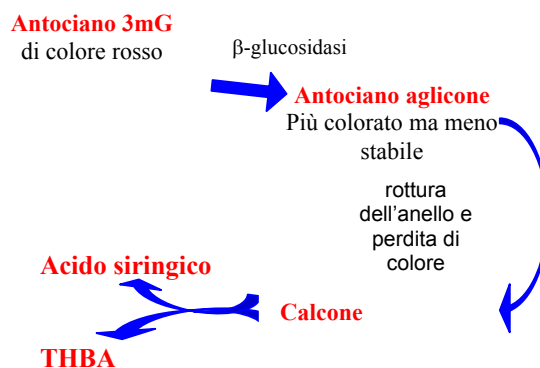
Queste attività possono trovarsi come attività enzimatiche secondarie in molti preparati, ivi compresi quelli di macerazione, possono quindi diventare causa di perdita di parte del colore, che l'attività principale ha aiutato ad estrarre. Nell'ottica di impiego degli enzimi per sfruttare al massimo il potenziale di colore racchiuso nelle uve, risultano dunque indesiderate e possibilmente da eliminare.

Per queste ragioni ed al fine di capire se vi erano reali margini di miglioramento della qualità di questi preparati, è stato avviato uno studio avente lo scopo di mettere in luce i meccanismi e la cinetica di degradazione degli antociani monoglucosidi.

### 2. MECCANISMO DI DEGRADAZIONE DEGLI ANTOCIANI 3 MONO-GLUCOSIDI (3MG).

Lo studio della cinetica di degradazione degli antociani è stato realizzato sulla Malvidina 3 mono-glucoside (M3mG) che è normalmente la più rappresentata nei vini.

FIG. 1 - Schema di degradazione degli antociani



A grandi linee, cercando di semplificare un po' le cose, possiamo dire che gli antociani 3mG possiedono uno ione ossonio ( $O^+$ ), questo per delocalizzazione degli elettroni con il doppio legame dell'anello fenolico si colora in rosso. Gli antociani liberi sono naturalmente instabili, essi, anche in assenza di enzimi, tendono a perdere il loro glucosio per trasformarsi in antociani agliconi. L'aglicone è più colorato ma meno stabile. L'anello che porta l' $O^+$  si apre generando un calcone incolore. Questo calcone si spezza in due molecole secondo un meccanismo non ancora noto, per formare una unità di acido siringico ed una unità di triidrossibenzaldeide (THBA). La THBA tende a sparire a favore di prodotti di decomposizione non ancora noti (Fig. 1).

L'attività  $\beta$ -glucosidasi interviene in questo gioco accelerando il passaggio iniziale, ossia la

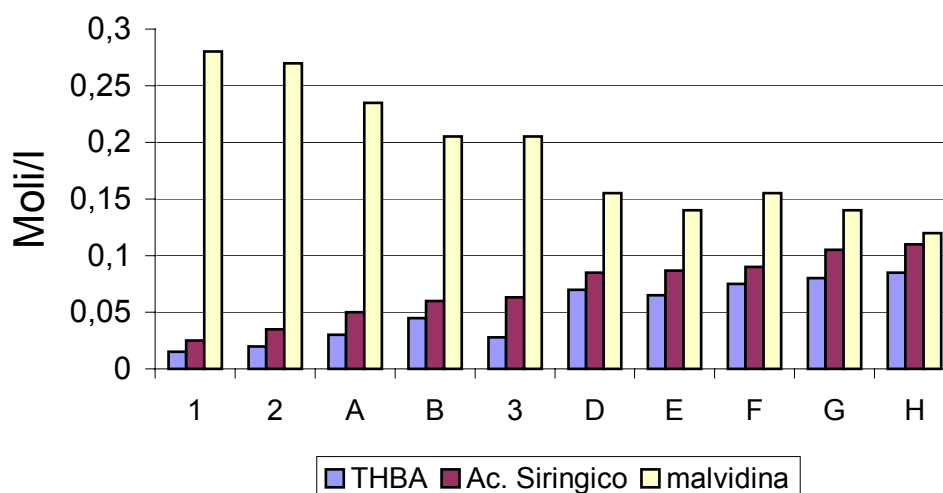
separazione dell'antociano dal glucosio, con formazione di antociani agliconi purtroppo poco stabili.

Il controllo per cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) della malvidina e dei suoi composti di degradazione, ottenuti operando in soluzione modello, indica che in presenza d'enzima la malvidina si degrada 2 volte più velocemente che in sua assenza.

### 3. MISURE DELL'ATTIVITÀ $\beta$ -GLUCOSIDASICA

Questo primo studio della cinetica di reazione ha permesso di mettere a punto un metodo di controllo dell'attività  $\beta$ -glucosidasi in diversi preparati enzimatici del commercio, in soluzione modello. I risultati sono rappresentati in figura 2.

Fig. 2 - Azione di differenti preparati enzimatici sulla malvidina 3mG



Una soluzione idroalcolica contenente 160 mg/l di malvidina è posta a 50°C in presenza di enzimi. Dopo 6 ore di reazione la scomparsa di malvidina 3mG e la comparsa dei prodotti di degradazione sono controllati per HPLC. La differenza di concentrazione tra il testimone non enzimato ed i differenti campioni enzimati fornisce, in funzione della quantità di enzima aggiunto, la misura dell'attività  $\beta$ -glucosidasi.

Il campione 1 rappresenta il testimone, a cui non sono stati addizionati enzimi.

Il campione 2 è stato trattato con Lafase HE Grand Cru, un enzima di macerazione purificato,

effettivamente in questo caso la scomparsa della malvidina e la comparsa dei suoi prodotti di degradazione è paragonabile al testimone non enzimato.

Il campione 3 è stato trattato con Lafase HE, enzima da macerazione con ottime qualità, che rivela una certa attività  $\beta$ -glucosidasi.

Gli altri campioni sono stati trattati con altri enzimi di macerazione del commercio non purificati.

Si può inoltre osservare che la comparsa dell'acido siringico, ritenuto essere stabile, non è sempre proporzionale alla scomparsa della malvidina, ma cambia a seconda del tipo di enzima. Questo fatto

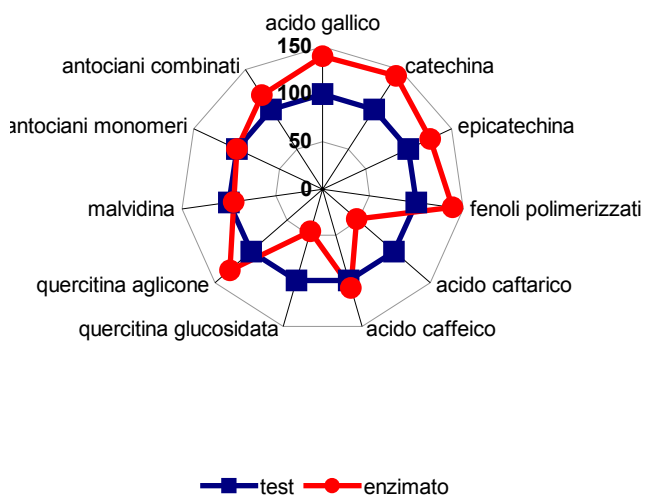
potrebbe indicare la presenza di una seconda via enzimatica di degradazione della malvidina, o meglio della presenza di più attività secondarie in grado di intervenire nella degradazione degli antociani. E' per questo che oggi si tende a parlare di attività antocianasiche, indicando con questo termine un po' generico l'insieme delle attività in grado di indurre una diminuzione degli antociani, tra cui vi è sicuramente la  $\beta$ -glucosidasi, ma con buona probabilità anche altre attività non ancora messe in evidenza.

Prove tecnologiche sono state eseguite in condizioni di cantina su vini. In questo caso si è dovuto scegliere come indicatore dell'attività  $\beta$ -glucosidasi la comparsa di Quercitina in forma di aglicone, sfruttando il fatto che questa molecola è più stabile, non va incontro a degradazione, ed è più facilmente rilevabile in un substrato complesso quale il vino.

Nel grafico di figura 3 sono rappresentati i risultati di una prova di trattamento enzimatico in fase di macerazione con un preparato non purificato.

I dati sono espressi come variazione, di alcuni parametri, rispetto a quelli, fatti pari a 100, determinati sul testimone. Si può notare come il trattamento enzimatico induca, come atteso, un aumento nella componente polifenolica del vino, ma si possa ritenere anche responsabile della perdita da parte dell'antociano, quercitina, del suo zucchero.

Fig. 3 - Controllo della quercitina aglicone



#### 4. CONCLUSIONI.

In soluzione modello ed in condizioni particolari, molto favorevoli alla degradazione degli antociani, l'attività  $\beta$ -glucosidasi di enzimi di macerazione può essere messa in evidenza e misurata.

Bisogna dire però che al momento della vinificazione l'attività  $\beta$ -glucosidasi è fortemente ridotta a causa del più basso dosaggio degli enzimi, rispetto alle condizioni sperimentali, alla presenza del glucosio ad inizio della fermentazione, che in parte inibisce questa attività, e alla comparsa dei tannini a fine fermentazione.

Ciò nonostante, anche in condizioni di cantina, è stato possibile riscontrare variazioni analitiche nei vini che fanno pensare ad una certa sua azione.

Come prima accennato si deve però precisare che, allo stato attuale delle conoscenze, l'attività  $\beta$ -glucosidasi è probabilmente solo elemento spia che ci permette di monitorare la presenza di un pool di attività secondarie, non ancora a noi note, che giocano questo ruolo indesiderato. Il processo di purificazione, a cui possono essere sottoposti gli enzimi, certamente riesce ad eliminare l'attività  $\beta$ -glucosidasi, che infatti non è più riscontrabile nel prodotto trattato, e molto probabilmente anche altre attività, per ora solo sospette, senza per altro limitare l'efficacia del preparato enzimatico.

Diverse prove e sperimentazioni eseguite impiegando Lafase HE Grand Cru, enzima da vinificazione in rosso purificato, hanno permesso infatti di dimostrare una minor perdita di colore a fine vinificazione, nessun aumento nei vini enzimati di sottoprodotti di degradazione degli antociani, a fronte di buoni risultati di estrazione e sviluppo delle potenzialità delle uve.

Le considerazioni che possiamo trarre da tutto ciò sono che gli enzimi da macerazione certamente ci possono dare un forte aiuto nell'estrazione del potenziale polifenolico ed aromatico delle uve rosse. L'abbondante letteratura al proposito ce ne dà conferma, così come le ormai molte esperienze positive di enologi e tecnici del settore. Per vini di elevato pregio, in cui ogni minimo particolare deve essere valutato, esiste ancora un margine di miglioramento, rappresentato dall'utilizzo di enzimi purificati, che rappresentano un nuovo e valido strumento da mettere in opera.