



LAFFORT - INFO

NUMERO
23
GIUGNO
2002



ENZIMI AD USO ENOLOGICO: PARAMETRI DI QUALITA', FATTORI DI RISCHIO

Prof. Roberto ZIRONI
Università degli Studi di Udine
Testo tratto dagli atti dell'incontro tecnico
Orvieto, 14 Maggio 2002

Lo sviluppo dell'applicazione degli enzimi in enologia ci offre interessanti opportunità tecnologiche di cui è utile valutare l'impatto sulla qualità del prodotto, considerandone i benefici e gli eventuali rischi.

Li troviamo oggi impiegati in fase di macerazione, sia sulle uve bianche che rosse. Si tratta di enzimi pectolitici con attività secondarie di tipo emicellulasi e cellulasi, che agiscono sulle strutture cellulari della buccia, indebolendole, favorendo così i fenomeni di estrazione.

Sui mosti in fase di defecazione sono applicati enzimi pectolitici il cui obiettivo è di aumentare la velocità di degradazione delle pectine per facilitare le operazioni di illimpidimento.

Sui vini allo scopo di favorire la rivelazione di alcuni aromi vengono impiegati enzimi pectolitici con attività secondarie di tipo β -glicosidasico in grado di liberare i composti aromatici legati a zuccheri, rendendoli olfattivamente attivi.

Sempre sui vini li troviamo applicati allo scopo di favorire la filtrazione e l'affinamento, in questo caso si tratta di enzimi ad attività β -glucanasica in grado di rompere le catene di glucano, favorendo la filtrazione di vini da uve bottrizzate e la lisi dei lieviti durante l'affinamento dei vini a contatto con le fecce.

Le preparazioni enzimatiche, grazie alla loro azione selettiva e controllata, possano di fatto migliorare le caratteristiche della materia prima facilitando il passaggio in soluzione di tutti i costituenti presenti nel frutto prima e nei lieviti e batteri poi. Contribuiscono dunque non soltanto al mantenimento, ma anche al miglioramento della qualità dei prodotti oltre che alla riduzione dei costi di produzione.

I preparati enzimatici impiegati in enologia sono dei preparati industriali, di fatto sono poche le aziende al mondo in questo settore che producono, molti commercializzano.

La produzione di enzimi, come schema tecnologico, è relativamente semplice, si tratta di far sviluppare dei

Lo sviluppo dell'applicazione degli enzimi in enologia ci offre interessanti opportunità tecnologiche di cui è utile valutare l'impatto sulla qualità del prodotto, considerandone i benefici e gli eventuali rischi.

in questa relazione in prof. Zironi a preso in considerazione tutti quelli, che fino al momento attuale, possono essere considerati fattori di rischio nell'impiego di enzimi, indicandone anche le possibili soluzioni e vie d'uscita.

Aspergillus niger ma non solo, su particolari substrati di crescita. I microrganismi che hanno la capacità di produrre una grande quantità di enzimi arricchiscono questi substrati di attività enzimatiche. Queste devono essere successivamente estratte dal substrato di coltura ed isolate. Si ottiene così inizialmente una soluzione contenente un pool enzimatico, una miscela di attività, che può essere, nei successivi passaggi produttivi, più o meno purificata fino ad arrivare all'attività enzimatica principale o addirittura esclusiva. Chiaramente il livello di purificazione è una variabile tecnologica, ma è anche una variabile economica. Esistono chiaramente tecniche sempre più sofisticate di purificazione, che comportano un aggravio dei costi di produzione ma una maggiore sicurezza e garanzia per la qualità del prodotto finale, vino.

Ecco perché quando si parla di prodotti enzimatici si deve sicuramente fare riferimento all'attività principale, o alle attività principali, ed alla eventuale presenza di attività secondarie che possono essere migliorative e gradite o peggiorative dunque sgradite. Quando andiamo ad aggiungere al nostro mosto, vino o uva un preparato enzimatico, bisogna avere chiari questi due aspetti: che attività principale ha il preparato enzimatico e che livello di purificazione ha subito.

L'attività enzimatica si misura in unità di attività, se un enzima ha minor attività di un altro non è detto che sia peggiore. Potrebbe essere migliore in termini di purezza, inoltre a seconda delle condizioni operative e dello scopo d'impiego, se ne potrà regolare il dosaggio o i tempi di contatto o le condizioni del mezzo (temperatura).

Quando parliamo di prodotti enzimatici, anche da un punto di vista storico, facciamo innanzitutto riferimento a preparati ad attività pectolitica. Si tratta di preparati enzimatici che sono arrivati al settore enologico da altri settori alimentari. Negli anni '70 vennero messi sul

mercato i primi preparati enzimatici pectolitici per l'enologia, derivanti dall'industria di produzione del succo di mela.

I primi risultati però non furono confortanti. Accanto al buon effetto pectolitico e di chiarifica si ebbe una destabilizzazione drammatica soprattutto sui vini rossi, il che comportò l'abbandono degli enzimi enologici per una decina di anni.

Questo è il primo esempio di come non tutti gli enzimi sono uguali e pur avendo tutti come attività principale la pectolitica, è il grado di purificazione e di adattamento all'impiego enologico che ne fa la differenza ed il pregio.

Attualmente gli enzimi ad uso enologico non presentano più attività collaterali così devastanti, ma possono essere affetti da attività collaterali meno visibili, meno conosciute ed evidenti, comunque in grado di estrinsecare effetti negativi, incompatibili con un'enologia di alto livello qualitativo.

Una delle attività indesiderate, a volte presente nei preparati pectolitici commerciali, è rappresentata dall'attività cinnamil-esterasi. L'attività cinnamil-esterasi agisce sugli esteri cinnamici dell'acido tartarico, con l'effetto di rompere il legame tra l'acido fenolico e l'acido tartarico con produzione di acido cinnamico libero (Fig. 1).

L'acido cinnamico è l'acido fenolico più presente nelle uve, e nel caso delle vinificazione in bianco risulta essere la sostanza fenolica più presente nei mosti, di conseguenza più presente nei vini. Questo tipo di reazione avviene anche in natura, ossia non è indotta soltanto dai preparati enzimatici, ma avviene più lentamente, con una produzione limitata di acidi cinnamici. Se noi aggiungiamo enzimi dotati di questa attività, la liberazione di acidi cinnamici in fase prefermentativa può diventare importante. Gli acidi cinnamici liberi di per sé non creano problemi, ma possono andare incontro all'attività cinnamato-decarbossilasi da parte del lievito, di *Saccharomyces cerevisiae*, con produzione di nuovi composti chiamati vinil-fenoli che hanno la capacità di passare in fase di vapore, quindi con valenza olfattiva. Nel caso specifico i vinil-fenoli hanno caratteri sensoriali che vengono identificati con il termine "farmaceutico", possono risultare di pregio in certi vini, ma sicuramente risultano di disturbo dal punto di vista sensoriale per la maggior parte dei vini bianchi.

Lo stesso tipo di reazione, a carico degli acidi fenolici liberi, può avvenire per intervento di una cinnamato-decarbossilasi seguita da vinil-fenolo-riduttasi prodotte da *Brettanomyces*, con produzione di etil-fenoli (Fig. 2) anch'essi con valenza sensoriale negativa.

Tutto ciò significa che un preparato enzimatico non purificato rispetto ad un altro purificato può predisporre

maggiormente il substrato vino alla sintesi da parte dei microrganismi di componenti responsabili di caratteri sensoriali negativi.

Fig. 1 – Schema di liberazione dell'acido fenolico da parte dell'attività cinnamil-esterasi dell'enzima

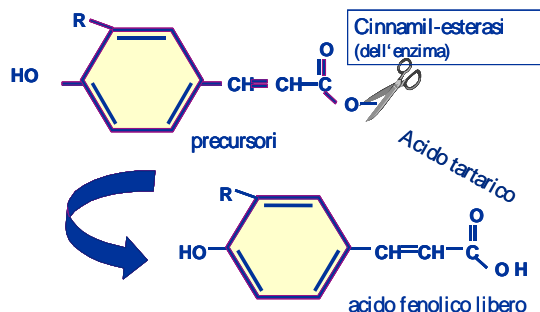
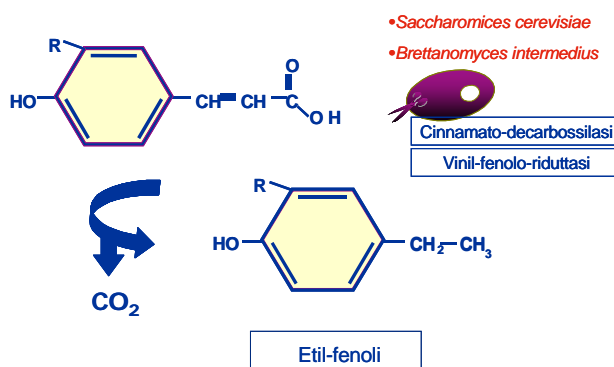


Fig. 2 – Schema di produzione dell'etil fenolo per intervento dell'attività dei microrganismi a partire dall'acido fenolico libero



Cerchiamo di fare un po' di chiarezza su questi aspetti ed eventualmente indicare una sorta di soluzione.

I fenoli volatili (etil-fenoli e vinil-fenoli) che si formano in seguito alla decarbossilazione e riduzione degli acidi fenolici forniscono sensazioni olfattive diverse in funzione del fatto che riescano a superare o meno la soglia di percezione olfattiva o la soglia di interferenza. Per soglia di percezione si intende la concentrazione al di sopra della quale il composto viene avvertito e riconosciuto da almeno il 50% dei degustatori. Per soglia di interferenza si intendende una concentrazione molto inferiore alla precedente, alla quale il composto di per sé non viene sentito, tantomeno riconosciuto, ma alla quale è in grado di interferire, mascherando o alterando l'espressione olfattiva di altri composti del vino.

Nella tabella che segue sono riportate le soglie di percezione e i descrittori attribuiti ad alcuni fenoli volatili.

Composto	Soglia di percezione	Descrittore
4-vinil-fenolo	770 µg/l	farmaceutico chiodo di garofano
4-vinil-guaiacolo	440 µg/l	speziato
4-etil-fenolo	620 µg/l	sudore di cavallo
4-etil-guaiacolo	140 µg/l	speziato affumicato

Dicevamo prima che le reazioni che danno origine a questi composti possono avvenire anche naturalmente durante la vinificazione, per cui non si può pensare che esista un vino assolutamente privo di queste sostanze, ma certamente possiamo avere prodotti che ne contengono naturalmente in concentrazioni limitate, quando queste concentrazioni superano una certa soglia diventano evidenti, percettibili dalla maggior parte dei consumatori, quindi un difetto.

Per quanto riguarda i vinil-fenoli, ossia i prodotti in cui è direttamente implicato il *Saccharomyces cerevisiae*, esiste una forte incidenza del ceppo di lievito, esistono infatti lieviti che tendono a produrne in maggiore concentrazione e lieviti che tendono a produrne in minor concentrazione. Questo fatto è legato alla capacità del lievito di produrre l'attività cinnamato decarbossilasi, ossia l'attività che induce la trasformazione da acido fenolico a vinil-fenolo. Uno studio eseguito da ricercatori americani ha permesso di individuare il gene la cui espressione porta alla sintesi della cinnamato decarbossilasi e quindi al rischio di presenza di vinil-fenoli nei vini. Questo gene è stato chiamato POF 1, che significa Phenol Off Flavour (difetto di odore fenolico). In seguito a questa scoperta i lieviti possono essere classificati in 2 famiglie:

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

E' chiaro come anche nella scelta del lievito sia possibile andare a condizionare la presenza di questi composti nel vino. Se poi combiniamo il ceppo di lievito POF (-) all'impiego di enzimi privi di attività cinnamil esterasi, riduciamo ulteriormente la presenza di fenoli volatili a carattere negativo, favorendo la migliore espressione sensoriale dei nostri vini.

L'effetto legato alla presenza di vinil-fenoli è da tempo riconosciuto nei vini bianchi; spesso ci si è chiesti perché nei vini rossi questo fenomeno non fosse messo in evidenza. Per rispondere a questa obiezione possiamo ricorrere a due ipotesi, una formulata dalla scuola di Bordeaux ed una dalla scuola di Montpellier. Secondo la prima scuola di pensiero l'alta concentrazione di tannini dei vini rossi inibirebbe

l'attività enzimatica, cinnamato decarbossilasi, prodotta dai lieviti della fermentazione, pertanto anche in presenza di acidi cinnamici liberi non si arriverebbe alla formazione di fenoli volatili. Per contro l'attività cinnamato decarbossilasi e vinil-fenol-riduttasi di *Brettanomyces* non sarebbe inibita dai tannini, per cui in presenza di questi lieviti inquinanti, anche nei vini rossi si avrebbe la formazione di etil-fenoli.

La seconda scuola di pensiero invece sostiene che i fenoli volatili, che si formerebbero normalmente nei vini rossi, si possano comportare analogamente all'acetaldeide, ossia dare origine al ponte antociano-tannino nella stabilizzazione del colore, e per tanto, entro certe concentrazioni, non essere più ritrovabili nei vini.

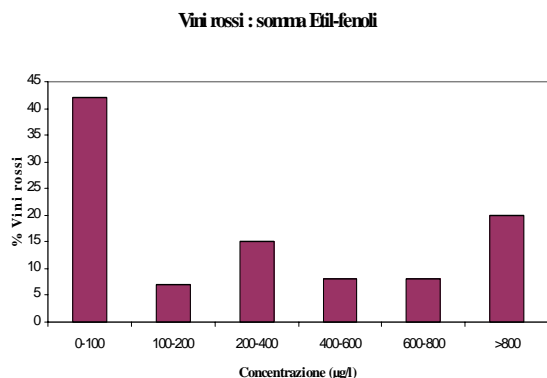
Non dobbiamo comunque trascurare il ruolo dei *Brettanomyces*, che incrementando la produzione di fenoli volatili, qualunque sia la teoria esatta, hanno portato all'attenzione del settore enologico questo problema anche sui vini rossi. Purtroppo i fattori di rischio legati alla presenza di questi microrganismi sono molti e tendenzialmente in aumento. Tra questi potremmo elencare l'uso sempre più massiccio di barriques che comporta da un lato già in partenza un maggior rischio, accentuato spesso dall'impossibilità di procedere regolarmente, su numeri importanti di barrique, all'esecuzione tempestiva e puntuale di tutte le operazioni: solfitazioni, travasi, chiarifiche. Il che porta alla conservazione di vini a volte sporchi in presenza di bassi livelli di SO₂ libera. L'uso ripetuto di barrique accentua questi rischi. La pratica della microossigenazione, ma anche la microossigenazione naturale in barrique favoriscono lo sviluppo dei *Brettanomyces*. La presenza di residui zuccherini, lo svolgimento ritardato delle malolattiche, la raccolta delle uve in condizioni di maturità troppo avanzata, così come pH molto elevati aggravano ulteriormente il problema delle contaminazioni.

Per far fronte al fatto che le fermentazioni, su materie prime ad alta concentrazione zuccherina (superiore a 14,5 % vol potenziali), spesso lasciano residui zuccherini nel vino, per incapacità del lievito di completare la fermentazione, può essere consigliabile procedere a fermentazioni scalari. Ossia avviare la fermentazione con un lievito più qualitativo e poi ad un certo punto intervenire inoculando un lievito più alcoligeno in modo da assicurare il completo consumo degli zuccheri. Ultimo fattore di rischio è che spesso per motivi di ostentazione l'enologo porta visitatori in cantina di affinamento in legno. In questo modo si veicola inquinamento all'interno delle cantine, inoltre nell'atto di far assaggiare dalle barrique, impiegando il tipico assaggiavino che si passa da un fusto all'altro, si inocula l'eventuale inquinamento in modo indiscriminato in tutte le barrique.

Il problema di presenza di *Brettanomyces* con comparsa di note fenoliche si sta diffondendo a macchia d'olio ed

é estremamente più grave nelle zone di tipica produzione di vini rossi con affinamento in legno. E' infatti molto diffuso in Spagna nella Rioja ma sta assumendo dimensioni preoccupanti anche in Francia a Bordeaux dove il 36% dei vini presenta etil-fenoli in concentrazioni superiori alla soglia di percezione.

Fig. 3 – Presenza di etil fenoli in vini di Bordeaux

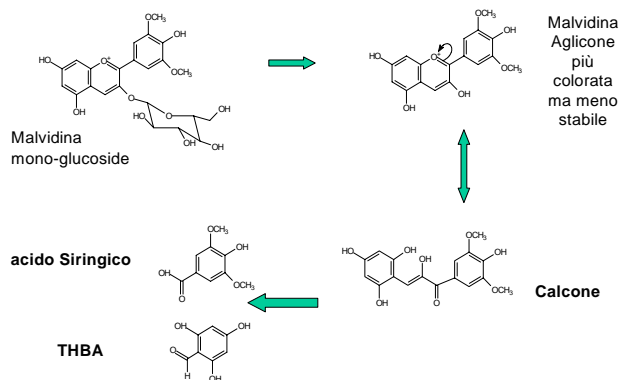


Ecco dunque come sempre più, anche nella vinificazione in rosso convenga utilizzare enzimi purificati da attività cinnamil esterasi, in modo da ridurre la presenza di substrato per la produzione di fenoli volatili sgraditi.

Nella produzione dei vini rossi cerchiamo di utilizzare materie prime facilmente estraibili, l'estraibilità è ovviamente collegata all'indice di maturità fenolica. Quando il seme è maturo la buccia perde resistenza e ne aumenta la permeabilità: schiacciando tra le dita un acino d'uva con seme maturo le dita vengono visibilmente macchiate. Se le dita non sono macchiate il seme non è maturo, ma ancor più importante per noi l'estraibilità di antociani e polifenoli in genere non é buona. Questo è un indice semplicissimo ma estremamente significativo. Se non abbiamo questa condizione o se vogliamo incrementare questa condizione di permeabilità possiamo utilizzare preparati enzimatici estrattivi che sono ancora una volta pool enzimatici costituiti da varie attività in grado di disgregare la lamella mediana e indebolire la parete cellulare. Ciò favorisce la fuoriuscita dei costituenti della cellula, tra cui antociani e tannini, con incremento della componente fenolica. L'azione enzimatica implica due fatti che non sono assolutamente sotto l'attenzione della maggior parte dei tecnici; l'azione enzimatica è un'azione di indebolimento delle cellule che porta ad avere uva molto più fragile, che deve essere trattata da un punto di vista meccanico (rimontaggi, follature, delestage, ...) con maggiore delicatezza. Un'uva ben enzimata se sottoposta a forti stress meccanici si frammenta e produce una grande quantità di feccia, la feccia è costituita da fibre di cellulosa che assorbono colore, che si perde con la feccia stessa. Enzimando le tecniche di vinificazione devono dunque essere adattate. Non più interventi meccanici drastici ma

delicati, volti semplicemente a sostituire il solvente a contatto con le bucce, che si arricchisce di composti grazie alla naturale dissoluzione.

Fig. 4 - Schema di degradazione degli antociani



Il secondo aspetto ancora legato alla purezza dei preparati enzimatici é che gli antociani che sono presenti nella buccia, quindi gli antociani che noi estraiamo, sono glicosidati, cioè legati a uno zucchero. Gli antociani glicosidati sono più stabili e protetti dalle ossidazioni. Se, come spesso avviene, nel preparato enzimatico abbiamo presenza di attività glicosidasi noi otteniamo l'antociano libero, senza lo zucchero; molto più reattivo ed instabile. I preparati enzimatici che da un lato favoriscono l'estrazione possono dunque divenire causa di instabilizzazione e farci perdere parte di quello che abbiamo ottenuto in più. Possiamo ovviare a questo abbinando l'uso di preparati enzimatici a quello di tannini ad effetto antiossidante e ad effetto di fissazione.

Meglio ancora se ricorriamo all'uso di enzimi purificati dall'attività glicosidasi che annullano completamente questo tipo di inconveniente.

Per quanto riguarda l'aspetto prettamente sensoriale legato all'utilizzazione di enzimi glicosidasi in grado di liberare i terpeni glicosidati rendendoli olfattivamente attivi, poniamo l'attenzione sull'aspetto sicurezza. L'attività glicosidasi è legata ad una molecola enzimatica che ha dimensioni molecolari molto simili a quelle dell'attività cinnamil-esterasi, già vista prima tra i fattori negativi. Purificare gli enzimi da attività cinnamil-esterasi senza ledere l'attività glucosidasi risulta pertanto estremamente complicato e costoso, ne deriva che normalmente questi preparati commerciali non sono purificati. Diventa dunque importante utilizzare gli enzimi glucosidasi, aromatizzanti, in fase post fermentativa quando la presenza di alcool inibisce l'attività cinnamil-esterasi.