



## LAFFORT INFO N° 118

# Derivati di lievito e affinamento dei vini.

### Introduzione

La domanda da parte del consumatore di vini rossi strutturati, dal colore intenso, morbidi e gradevoli al palato non si arresta.

Inoltre la necessità di avere questi vini pronti il prima possibile per poter essere consumati o quantomeno presentati ai concorsi, alla rete vendita o utilizzati per le degustazioni di anteprima, obbliga i vinificatori a rivedere le tecniche di lavorazione con lo scopo di perseguire questo obiettivo.

Il mantenimento dei vini a contatto con le fecce di lievito di fermentazione è una pratica nata nella vinificazione in bianco, oggi utilmente adottata anche nella lavorazione dei vini rossi. Questa tecnica ha tra i suoi punti di forza la capacità di ridurre le note di astringenza e la percezione amara dei vini, contribuendo all'accrescimento del volume in bocca, della complessità e della persistenza aromatica. Inoltre durante l'affinamento sulle fecce, nei vini rossi, si assiste ad un miglioramento della stabilità sia tartarica che colloidale, compresa la stabilità della matrice colorante.

Oggi, per evitare alcuni inconvenienti legati al mantenimento dei vini a contatto con le proprie fecce di fermentazione (come ad esempio lo sviluppo di fenomeni di riduzione, di microrganismi di alterazione con produzione di metaboliti indesiderati) e cercare di ottenere risultati sempre prevedibili, controllabili e riproducibili, è possibile intervenire facendo ricorso a fecce "artificiali". Si tratta di coadiuvanti enologici ottenuti da lieviti inertati, autolisati, lavorati in modo specifico, ed oggi anche selezionati, proprio allo scopo di favorire il rilascio di frazioni utili e la sottrazione di composti indesiderati.

### Materia prima e tecniche di lavorazione

La materia prima di partenza resta il lievito, di cui bisogna conoscere la struttura per comprenderne le potenzialità e cogliere le differenze tra i diversi derivati.

Com'è noto, vista la sua composizione ricca di polisaccaridi suscettibili di essere rilasciati dal lievito al vino, la parete cellulare del lievito assume grande importanza e riscontra un elevato interesse dal punto di vista enologico.

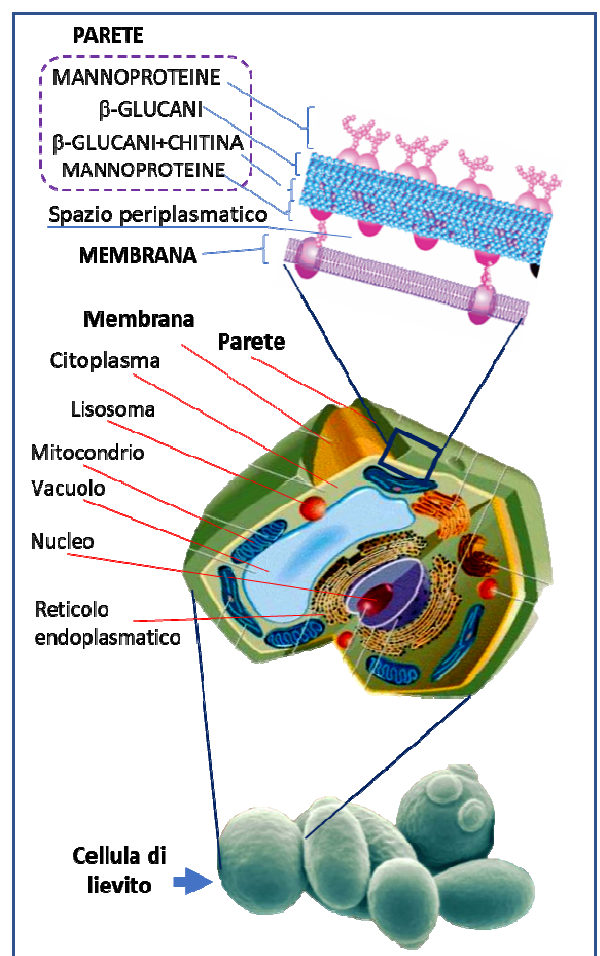


Figura 1 - Dettaglio della struttura della cellula di lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Essa rappresenta il 26-32% del peso secco della cellula e conferisce al lievito forma e rigidità.

La parete cellulare è composta dal 15-30% di beta-glucani, 15-30% mannani-oligosaccaridi, 15-30% da proteine, 5-20% da lipidi e piccole quantità di chitina.

La maggior parte delle proteine sono legate ai

mannani oligosaccaridi e nel complesso vengono chiamati MANNOPROTEINE.

Si tratta normalmente di proteine enzimatiche, l'esempio più ricorrente sono le invertasi, si trovano ancorate alla catena dei glucani da cui sporgono e possono lavorare al di fuori della cellula nel mezzo di coltura.

Lo zucchero mannosio legato ha la funzione di proteggere dall'ambiente esterno e di stabilizzare la parte proteica enzimatica.

All'interno della membrana abbiamo il citoplasma, che rappresenta circa il 65-70 % del peso secco della cellula, esso è ricco di proteine, peptidi, aminoacidi, acidi nucleici, ed altre componenti.

Durante la lavorazione, a seconda del tipo di trattamento di inertizzazione e di lisi che viene applicato al lievito, si vengono a determinare a carico degli appena descritti substrati molteplici e differenti modificazioni, che insieme ai diversi processi di separazione e purificazione applicati sono alla base delle differenze compositive e qualitative dei prodotti commerciali finali.

I derivati di lievito ad uso enologico di ultima generazione oggi in commercio sono ottenuti a partire da apposite colture di *Saccharomyces cerevisiae*. Questo diviene un ulteriore elemento di differenziazione, che permette di orientare, già in fase di scelta del ceppo e poi di coltivazione dello stesso, la qualità e la tipologia del derivato a cui si vuole arrivare.

I derivati di lievito ad uso enologico sono ottenuti prevalentemente per autolisi, sottoponendo il lievito a trattamento termico con o senza applicazione di enzimi esogeni.

Durante l'autolisi la degradazione cellulare avviene sia in seguito all'attivazione del patrimonio enzimatico naturale della cellula, grazie all'applicazione di temperature e pH ottimali, sia in seguito ad aggiunta di enzimi di tipo  $\beta$ -glucanasico o proteolitico esogeni. Si cerca quindi di pervenire ad un processo comparabile all'autolisi naturale, ma in tempi più brevi ed in condizioni controllate. Completata la lisi si deve procedere alla separazione delle diverse frazioni, che devono essere differenziate e selezionate in base all'obiettivo enologico che si vuole perseguire impiegando il prodotto finale.

Già da queste prime informazioni appare evidente come la qualità e le caratteristiche dei prodotti commerciali dipendano da numerosi parametri quali:

- ceppo di lievito di partenza,
- tipo e parametri del processo produttivo seguito,
- livello di separazione e purificazione finale.

Infine, come avrete capito, una grossa dicotomia si ha in virtù della porzione di microrganismo utilizzata:

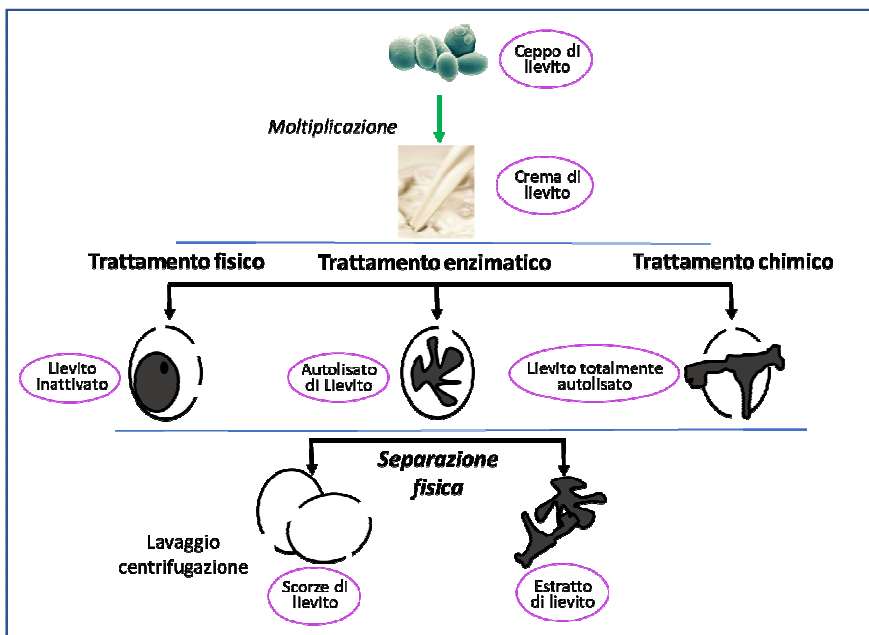


Figura 2 - Schema descrittivo delle tecniche di ottenimento dei diversi derivati di lievito.

- se si sfrutta la parete andremo nella direzione delle scorze di lievito ed estratti da essa derivati come mannoproteine, polisaccaridi ed acidi grassi;
- se si sfrutta la frazione citoplasmatica avremo in prevalenza proteine, peptidi, aminoacidi ed acidi nucleici.

Tendenzialmente questa seconda frazione è quella che in enologia trova oggi largo impiego nella preparazione di nutrienti organici, preparatori di lievito e derivati ricchi di Glutazione; la prima frazione viene sfruttata per la produzione di mannoproteine destinate alla stabilizzazione dei vini e per l'estrazione di polisaccaridi e peptidi da finitura.

La costante ricerca condotta negli ultimi 15-20 anni ha condotto da un lato a nuove tecniche di selezione moltiplicazione e lavorazione dei lieviti e dall'altro a nuovi strumenti di analisi e caratterizzazione dei diversi derivati. Ciò ha consentito la messa a punto di nuovi prodotti, con specifiche caratteristiche, dedicati alla risoluzione di specifiche problematiche o al raggiungimento di particolari obiettivi. Come è noto, Laffort, a partire dalla prima individuazione e proposizione delle Mannoproteine per la stabilizzazione tartarica, oggetto dell'INFO 117, ha giocato attorno a questa tematica un ruolo assai importante, che ha portato alla comprensione di differenti fenomeni ed alla messa a punto di interessanti prodotti.

## Dolcezza senza zucchero

Il via a questi studi era stato a suo tempo dato proprio dalla constatazione empirica del fatto che i grandi vini, sia bianchi che rossi, alla degustazione, esprimono

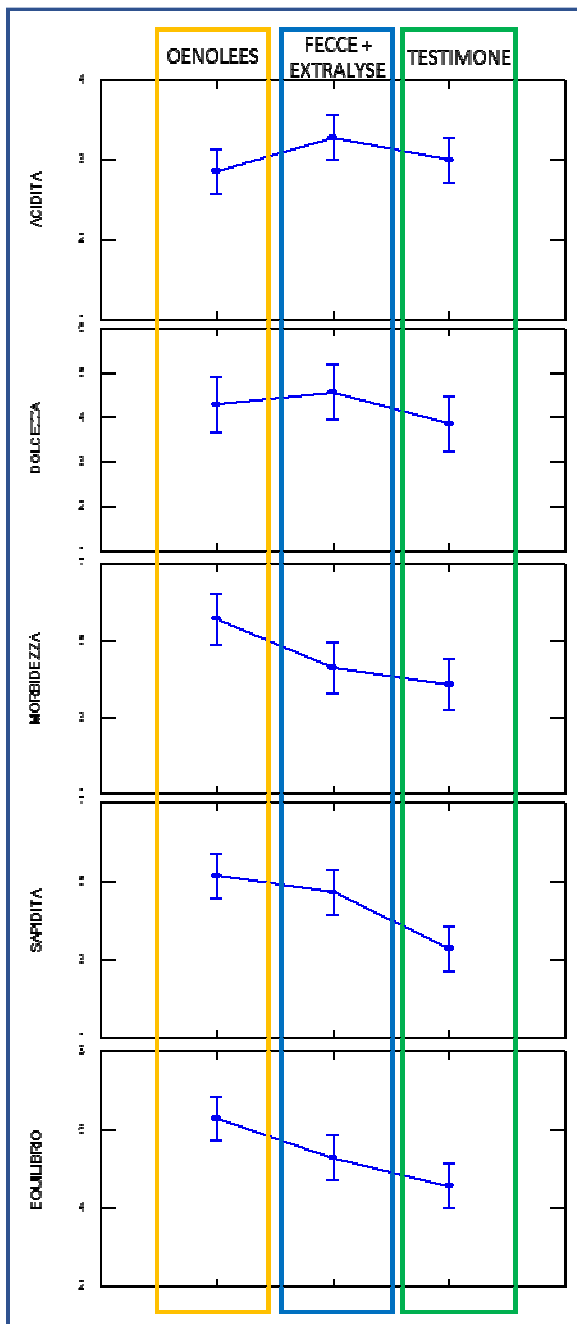


Figura 3 - Risultati delle degustazioni dei campioni di Cabernet sauvignon oggetto della prova trattati nelle 3 diverse modalità.

note di dolcezza assai apprezzate, e dall'osservazione contraddittoria che, all'analisi chimica, nei medesimi vini non si ritrovano che nulle o minime tracce di zuccheri, in quantità assolutamente non correlate alla sensazione di dolcezza espressa; questo, fra gli altri aspetti, ne fa la loro grandezza. I lavori svolti hanno messo in evidenza la ricchezza di questi vini in molecole derivanti dall'autolisi dei lieviti. L'analisi sensoriale svolta su queste sostanze isolate e frazionate in base alla massa molecolare mostra che una sola frazione di peso molecolare relativamente basso, compreso tra 0,5 e 3 kDa, è positivamente gustosa. La sua soglia di percezione è estremamente bassa, pari a 16 mg/L, e

viene descritta dai panel di degustatori professionisti con il termine "sucrosité".

Si tratta di un peptide per il quale è stato messo a punto un metodo specifico di analisi.

Questi risultati hanno permesso lo sviluppo di un prodotto enologico brevettato, l'OENOLEES®, preparato specifico di lieviti inerti che presenta proprietà gustative descritte come dolcezza indotta direttamente dall'importante tenore di peptidi gustosi rilasciati dallo stesso al vino.

Il suo impiego permette inoltre l'eliminazione, grazie all'esecuzione di un microcollaggio selettivo, dovuto a fenomeni di adsorbimento da parte della parete cellulare, di alcune frazioni di polifenoli responsabili di sensazioni negative, soprattutto amare, spostando ulteriormente il giudizio nella direzione della gradevolezza.

L'uso più corretto di questo preparato consiste nell'aggiunta dello stesso al vino già travasato e separato dalle sue fecce di fermentazione. Nel caso dei vini rossi la dose è di 40 - 80 g/hL, ed il tempo di contatto deve essere di almeno un mese. Durante questo periodo si deve procedere al "batonnage" ogni 3 - 4 giorni per almeno 3 settimane, dopo di che si lascia depositare il torbido per almeno 7 - 10 giorni prima di operare un travaso.

Nella figura 3 sono esposti i risultati più significativi ottenuti a seguito di una prova, eseguita in triplicato, e condotta su Cabernet sauvignon in barrique, ponendo a confronto 3 diverse modalità operative:

- Testimone - vino a fine FML travasato e solfitato;
- Oenolees - come il precedente + 60 g/hL Oenolees;
- Fecce + Extralyse - vino a fine FML non travasato + 5 g/hL Extralyse

Nelle prime 4 settimane si è fatto un batonnage settimanale di tutte le barriques, poi si è attesa una naturale decantazione, e successivamente si è proceduto al travaso. Dopo 4 mesi di conservazione in recipienti di acciaio si è imbottigliato ed al termine del 1° mese dall'imbottigliamento si è proceduto alla degustazione. Sono intervenuti 7 degustatori professionisti che hanno valutato i vini su una scala astrutturata sulla base di alcuni descrittori mirati.

L'analisi dei risultati della degustazione conferma che i campioni trattati con l'Oenolees vengono percepiti più morbidi, più sapidi, più dolci e meno acidi e nel complesso più equilibrati. Il vino affinato sulle fecce fini di fermentazione in presenza dello specifico enzima Extralyse è percepito nella stessa direzione con risultati di poco superiori od inferiori; entrambe le tesi trattate si distaccano nettamente dal testimone. Questi risultati pratici hanno incoraggiato al prosieguo dei lavori di ricerca al fine di comprendere meglio quali siano le molecole cedute dal lievito al vino e responsabili di questi miglioramenti organolettici, questo al fine di individuare la via per rafforzare la presenza di composti positivi nei vini.

I lavori che sono proseguiti hanno permesso di dimostrare e confermare che la frazione molecolare individuata come responsabile della **sucrosité** è di natura peptidica.

La messa in atto allora di specifiche tecniche di sequenziazione ha successivamente condotto alla individuazione di 20 peptidi con

peso molecolare compreso tra 680 e 2686 dalton, 11 dei quali corrispondenti perfettamente a frammenti di una proteina parietale denominata **Hsp12 (Heat shock protein)**.

Ulteriori e successivi test hanno permesso di confermare questa origine. Più precisamente si tratta di frammenti proteici derivanti da una proteina tipicamente prodotta dal lievito per far fronte a stress di natura termica. Nella cellula risulta localizzata nella parte inferiore della parete cellulare e più precisamente a livello di spazio periplasmatico. Per questo che il trattamento con enzimi specifici in grado di accelerare la demolizione della parete, come ad esempio la beta-glucanasi attiva nel preparato commerciale Extralyse, ne induce e favorisce la liberazione.

Questo ci conferma ancora una volta che la porzione di cellula su cui si lavora per l'ottenimento dei diversi preparati è di importanza fondamentale. Dunque anche in questo caso la fonte è la parete.

E' stato quindi possibile mettere in evidenza che l'espressione delle sequenze codificanti HSP12 è influenzata sia da fattori genetici che da fattori ambientali. La produzione di Hsp12 è strettamente legata al tipo di ceppo, esistono ceppi che ne producono anche quantità 10 volte superiori ad altri. Inoltre trattandosi di una proteina che in buona sostanza il lievito produce in risposta a stress dovuti ad alte temperature, la temperatura del substrato di fermentazione o di allevamento della coltura cellulare ne condiziona pesantemente la produzione. Tutto questo ci dà ragione di differenti aspetti che si rilevano normalmente nella pratica di cantina.

Il ceppo di lievito utilizzato nella vinificazione può influenzare significativamente le caratteristiche gustative del vino finito proprio grazie alla sua maggiore o minore propensione a produrre e liberare questo specifico peptide.

Tradizionalmente si cercava di guadagnare in rotondità e volume dei vini operando, nella vinificazione in rosso, macerazioni post-fermentative a temperature piuttosto elevate, fino a 30 - 32 °C, questo stress sui lieviti ancora presenti e vitali stimola dapprima la produzione di questa proteina e successivamente la sua liberazione accelerando la loro autolisi.

Questo considerevole patrimonio di esperienze ha consentito a LAFFORT di mettere a punto un prodotto innovativo sempre dedicato all'affinamento dei vini rossi sui quali si desidera sfruttare al meglio l'apporto organolettico di specifici derivati di lievito in piena sicurezza e senza alcun rischio microbiologico.

Si tratta di **POWERLEES ROUGE**, un preparato a base di derivati di lieviti sui quali si è iniziato a lavorare partendo dalla scelta del ceppo, per continuare sulle tecniche di moltiplicazione e trattamento del lievito dopo inertizzazione. Il preparato è inoltre arricchito con attività enzimatica  $\beta$ -glucanasi che permette di prolungarne l'effetto di estrazione anche nel corso della permanenza nel vino, oltre ad allargarne l'azione alle cellule di lievito residue dalla fermentazione, il tutto per consentire di ampliare lo spettro di molecole utili liberate (fra le quali peptidi, mannoproteine, polisaccaridi) rendendone l'effetto meno monocorde e più sovrappo-

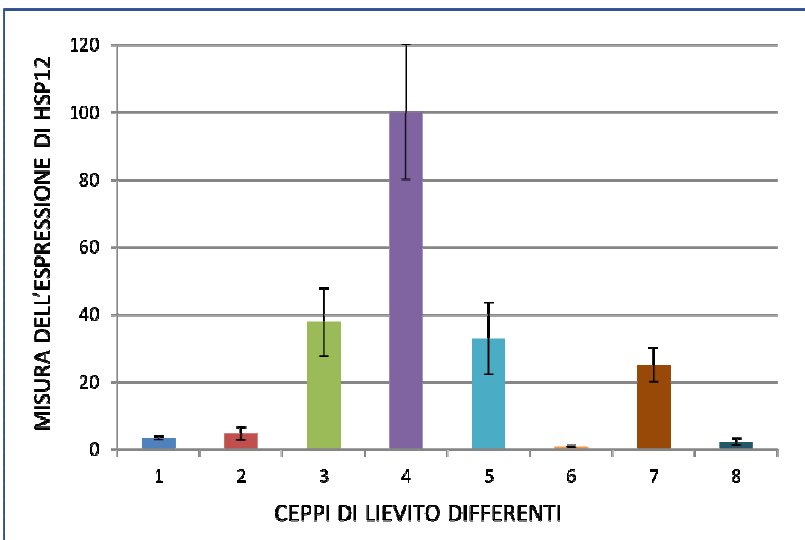


Figura 4 - Misura dei livelli di espressione di HSP12 da parte di differenti ceppi di lievito durante la fermentazione nelle stesse condizioni.

ponibile possibile ad un "élevage" naturale su fecce di fermentazione. Può essere introdotto nei vini in fase finale di fermentazione se si desidera operare in analogia alla macerazione post-fermentativa a caldo, oppure durante tutto il periodo di affinamento.

Esso permette di migliorare l'evoluzione del vino, rendendolo atto ad essere apprezzato alla degustazione in tempi brevi, senza accelerare indesiderati fenomeni di invecchiamento, favorendo nel complesso la stabilizzazione colloidale, soprattutto a favore del colore.

Il dosaggio consigliato è di 20 - 40 g/hL per un tempo di permanenza di almeno 20 gg, da modulare comunque in funzione della temperatura, della possibilità di operare rimontaggi o risospensioni, del tipo di vino in lavorazione e del risultato che si vuole conseguire.

Infine per i ritardatari o per coloro i quali chi non è riuscito in fase di affinamento a raggiungere l'obiettivo prefissato resta la proposta di prodotti completamente solubili, microfiltrabili, che consentono di operare aggiustamenti in fase di preparazione all'imbottigliamento.

Si tratta in buona sostanza di prodotti nei quali viene resa direttamente disponibile la frazione solubile dei due precedenti, con un risultato un poco più semplice ma comunque interessante.

Facciamo qui riferimento all'**Oenolees MP** e al **Manno-feel**.

Il primo, derivato dall'Oenolees, è un estratto parietale di lievito, ricco di peptidi sapidi su supporto di polisaccaridi, completamente solubile, agisce sulle sensazioni di dolcezza rotondità e lunghezza al palato. Può essere impiegato sui vini rossi a dosi variabili tra i 5 e 20 g/hL.

Il secondo è un preparato al 100% da mannoproteine, in formulazione liquida al 20%. Nel rispetto della freschezza e del fruttato del vino riesce a migliorarne l'equilibrio, aumentando le percezioni di volume e dolcezza ed attenuando le percezioni di acidità ed astringenza.

In qualità di colloidale protettore partecipa alla stabilizzazione tartarica e della matrice colorante. Il dosaggio sui rossi si aggira sui 50-100 ml/hL.