



Gli enzimi più utilizzati in enologia sono pectinasi, la cui efficacia può essere misurata verificandone la capacità di diminuire la viscosità di una soluzione modello di pectine.

# Enzimi enologici: tutto ciò che avete sempre desiderato sapere

**CÉLINE FAUVEAU SCHAFF** Responsabile Enzimi - Laffort

**I**l crescente fabbisogno in termini di prestazioni delle preparazioni enzimatiche e la ricorrente richiesta di metodi che permettano un loro confronto rendono di estrema attualità l'aggiornamento delle conoscenze sui preparati enzimatici utilizzati in enologia.

L'obiettivo di questo articolo è di fornire un quadro un po' più chiaro sull'argomento, in modo da permettere agli utilizzatori di effettuare scelte avvedute. In questa ottica affron-

teremo il tema della composizione dei preparati enzimatici utilizzati in vinificazione, tenendo conto che l'enzimologia resta una disciplina biologica assai complessa.

In enologia, considerata l'eterogeneità del substrato su cui si opera, si deve ricorrere a formulazioni enzimatiche complesse, che spesso però vengono interpretate ed immaginate sulla base teorica della reazione enzimatica più semplice: enzima + substrato da cui si origina un prodotto.

Ridotti alla loro attività strettamente pectinasi, la maggior parte degli enzimi enologici possono sembrare sulla carta tutti uguali

tra loro. La comprensione del loro meccanismo d'azione, ma soprattutto delle loro qualità enologiche, risulta menomata e la scelta di fronte alle numerose proposte diviene assai difficile. Gli utilizzatori cercano di razionalizzare le proprie scelte sulla base dei costi al chilogrammo o all'unità di attività, ma non sempre con risultati soddisfacenti.

## Microrganismi produttori e mezzi di coltura

Gli enzimi ad uso industriale sono prodotti da funghi microscopici (come i lieviti). Gli enzimi applicati in enologia vengono prodotti principalmente da microrganismi del genere *Aspergillus* e *Trichoderma*. Ognuna delle specie impiegate conta poi al suo interno un gran numero di ceppi che presentano differenti attitudini nella produzione di enzimi. Ogni ceppo produce una sua propria miscelanea di attività. Un fungo utilizzato per la produzione di enzimi può essere dotato di diverse decine di geni che codificano attività enzimatiche di tipo emicellulasico. Ogni produttore industriale detiene i propri ceppi e di conseguenza propone preparazioni uniche.

Studi specifici hanno permesso di mostrare la forte influenza del mezzo di coltura sulla trascrizione dei diversi geni che codificano la produzione di enzimi. Per esempio in presenza di xilano, un composto dell'emicellulosa, possono essere espresse contemporaneamente fino a 30 xilanasi: endoxilanasi, xilosidasi, arabinofuranosidasi, acetil-xilanesterasi,  $\beta$ -galattosidasi, feruloil esterasi... L'effetto della maggior parte di queste attività durante la vinificazione rimane ancora da studiare.

Per la produzione di pectinasi, si assiste agli stessi meccanismi. I microrganismi, se messi in presenza di un certo substrato, sono in grado di attivare un vero e proprio arsenale enzimatico. Questo arsenale, specifico di ogni ceppo, è utilizzato per esempio in natura dai microrganismi fungini saprofiti o patogeni per degradare strutture e tessuti complessi, nel corso della colonizzazio-

ne di nuovi ambienti o di infezione di nuove piante, mettendo in gioco attività enzimatiche capaci di degradare molecole complesse come polisaccaridi, pectine, lignine ecc.

### Le attività delle preparazioni enzimatiche ad uso enologico

Gli enzimi utilizzati in enologia sono in realtà cocktail di differenti attività, tra cui primeggiano una o più attività principali, contenenti anche numerose altre attività definite secondarie.

#### La degradazione della parete pectico-cellulosica

La composizione della pectina varia in funzione del vitigno e, per uno stesso vitigno, in funzione dello stadio di sviluppo, dello stato sanitario, dell'andamento climatico ecc. È noto che le pectine sono normalmente metilate con grado di metilazione medio del 70%. Questo grado di metilazione varia in funzione del livello di maturità ed è inversamente proporzionale alla rigidità della pectina.

Tenuto conto della diversità dei substrati che formano la parete vegetale, la sinergia di azione tra diverse attività enzimatiche assume importanza fondamentale per assicurare un'adeguata idrolisi dei complessi polisaccaridici. Per semplificare prendiamo l'esempio della poligalatturonasi (PG). Questa riesce ad idrolizzare la catena pectica solo nelle posizioni già demetilate da parte della pectin metil esterasi (PME). Alla stessa stregua le attività secondarie come le arabinasi, galattasi o ancora le ramno-galatturonasi, che staccano grosse catene laterali, liberando nel mezzo polisaccaridi complessi, *sgomberano il campo* permettendo l'accesso da parte delle pectinasi alla catena pectica principale. Chiaramente il tutto contribuisce ad accelerare l'opera di demolizione della struttura portante delle pectine e permette di arricchire il mezzo liquido di composti polisaccaridici.

#### Le attività secondarie indesiderate

Può capitare che nel cocktail enzimatico siano presenti attività che esplicano durante la vinificazione un'azione indesiderata. È il ca-

so ad esempio della cinnamoil esterasi, nota anche come cinnamil esterasi (CE), a volte chiamata anche depsidasi o tannasi. Il suo meccanismo d'idrolisi conduce alla liberazione di acidi cinnamici, precursori della formazione di vinil fenoli ed etil fenoli, composti odoranti temuti ed indesiderati soprattutto nella vinificazione in bianco. Per far fronte a questo rischio da tempo sono state messe a punto tecniche di purificazione degli enzimi che hanno permesso di proporre ai vinificatori più attenti preparati enzimatici esenti da queste attività.

#### Le attività secondarie che supportano l'attività principale

Si tratta di attività che possono giocare un ruolo importante durante la vinificazione, venendo a supporto dell'effetto ricercato, come accade per alcune cellulasi o emicellulasi. Queste a volte finiscono per avere un'importanza fondamentale, tanto che la loro assenza risulta limitare l'azione di degradazione dei polisaccaridi. In loro carenza o mancanza può capitare che un enzima, anche molto concentrato, ma in una sola o poche attività, risulti poco efficace perché impossibilitato ad accedere al suo substrato.

#### Le attività secondarie che apportano benefici collaterali

Sono attività la cui utilità viene colta solo in maniera empirica. I benefici che procurano, solitamente di tipo sensoriale ed apprezzabili in fase di degustazione, sono spesso all'origine dell'affezione a determinati prodotti da parte dei consumatori.

La preferenza, che si ripropone quasi sistematicamente, si basa su una maggiore percezione di qualità globale, aumento del volume in bocca o ancora qualità della struttura nei vini ottenuti con l'impiego di enzima.

### Un miglioramento organolettico dimostrato

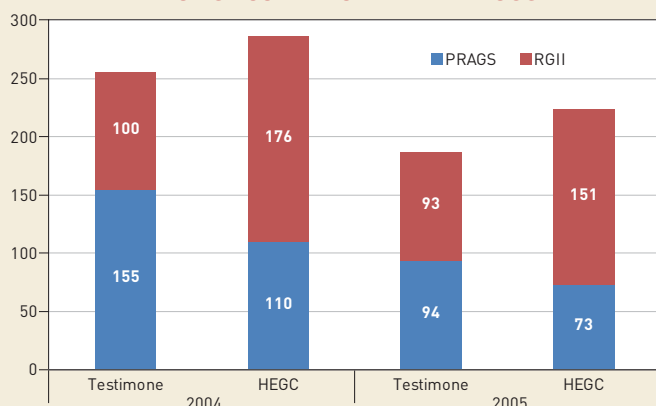
Troppo sovente, quando ciò che si osserva sfugge all'evidenza di una teoria scientifica, si confonde ciò che non si spiega con ciò che non è spiegabile mettendo in dubbio le cose. D'altro canto invece l'approccio empirico passa dalla concretezza dei fatti alla loro giustificazione scientifica. Questo approccio si basa sul principio che la conoscenza deriva dalla catalogazione ed archiviazione dei fatti e fenomeni osservati. È un metodo ricorrente nel campo enologico, che ovviamente richiede rigore ed una grande fiducia nella capacità di misurare e giudicare correttamente determinati fenomeni e le loro espressioni.

### Enzimi e volume dei vini rossi in fase gustativa

Malgrado l'osservazione ripetuta su più annate e da panel di degustazione di diverse regioni del mondo, l'impatto positivo dell'impiego di enzimi specifici per la vinificazione in rosso sul volume in bocca per molti resta un mero argomento commerciale, dato che non può essere sostanziato da dati analitici alla stessa stregua dell'aumento del colore e del tenore in tannini. I lavori di tesi di Marie Agnès Ducasse pubblicati sul *Journal of Agricultural*



## IMPATTO DEGLI ENZIMI SULLA COMPOSIZIONE POLISACCARIDICA DEI VINI ROSSI



HG = omo galatturonano; RGI e II = Ramno galatturonani;  
AG I e II = Arabino galattani;  
PRAG = Polisaccaridi Ricchi in Arabinosio e Galattosio



Lo sviluppo di un nuovo preparato enzimatico prevede sempre una fase di severa sperimentazione pratica in cantina.

*and Food Chemistry* (2011.059. 6558-6567) sono tuttavia riusciti a dimostrare l'impatto positivo dell'impiego di enzimi sulla composizione del vino in polisaccaridi, in funzione del tipo di enzima applicato. In effetti questi lavori mettono in evidenza differenze nella composizione polisaccaridica, non solamente tra vini enzimati e non, ma anche a seconda delle attività secondarie presenti nel preparato enzimatico applicato in fase di macerazione/estrazione.

Come regola generale, l'utilizzo di pectinasi induce una diminuzione di PRAG, polisaccaridi ricchi in arabinosio e galattosio, e l'assenza di residui di omogalatturonani (HG). I vini enzimati presentano una maggiore limpidezza ed attitudine ad essere filtrati nettamente superiore.

Lo specifico preparato LAFASE® HE GRAND CRU, preso in considerazione nella tesi, grazie ad una attività RGII-asi, induce la liberazione nel vino di RGII, polisaccaride complesso a basso peso molecolare, non ulteriormente degradabile per via enzimatica, dunque stabile nel vino. La forte presenza di RGII, a cui altri autori hanno imputato la capacità di ridurre l'astringenza e di conferire rotondità alla degustazione, oltre alla capacità di interagire con le proteine salivari, potrebbe spiegare la netta preferenza alla degustazione di questi vini.

I meccanismi d'azione e i siti d'intervento delle diverse pectinasi presenti nei preparati commerciali conducono alla liberazione nei vini di polisaccaridi strutturalmente differenti, a seconda del preparato applicato. Oltre alle implicazioni tecnologiche evidenti, come quelle registrabili sulla viscosità, limpidezza e filtrabilità, questi polisaccaridi, derivati dai differenti meccanismi di degradazione delle complesse catene pectiche hanno certamente un diverso impatto sulle sensazioni gustative, oltre che sulla stabilità colloidale dei vini.

### Valutare l'offerta del mercato

Che sia per un'applicazione di chiarifica, di macerazione o di filtrabilità, un preparato enzimatico ad uso enologico deve possedere un pool di attività molto diversificato, in grado di idrolizzare l'insieme dei legami delle differenti strutture pectiche. Tuttavia, benché i preparati commerciali siano formulati per possedere tutto ciò, dobbiamo comunque essere consapevoli del fatto che non tutte le attività presenti nei preparati sono caratterizzate e misurabili.

### Misurare l'attività enzimatica

**Unità di misura globali o unità arbitrarie dei produttori:** queste unità sono strumenti utilizzati dai produttori industriali per

standardizzare le proprie produzioni (FDU, AVJP ...). Hanno il pregio di misurare le prestazioni globali dell'insieme delle attività del cocktail enzimatico sulla diminuzione di viscosità di una soluzione modello di pectine. Per contro, le misure vengono fatte su soluzioni modello di pectine standard di mele, di conseguenza non sono rappresentative delle pectine dell'uva, dato il diverso grado di metilazione, e neppure delle condizioni di vinificazione.

Occorre tenere presente che:

- le unità arbitrarie dei diversi produttori non sono confrontabili tra loro;
- un valore elevato di un'unità arbitraria non sempre corrisponde ad un'elevata efficacia enologica.

**Le unità che misurano l'attività di una sola molecola enzimatica:** il Katal (unità internazionale SI) rappresenta la quantità di enzima che trasforma 1 mole di un determinato substrato al secondo. Le attività degli enzimi sono espresse in nano Katal (nKat). L'attività specifica è invece l'attività catalitica per unità di massa di proteina (I.U./mg di s.s. dell'enzima). BGU per la beta glucosidasi, PGNU per la Poli-Galatturonasi ...

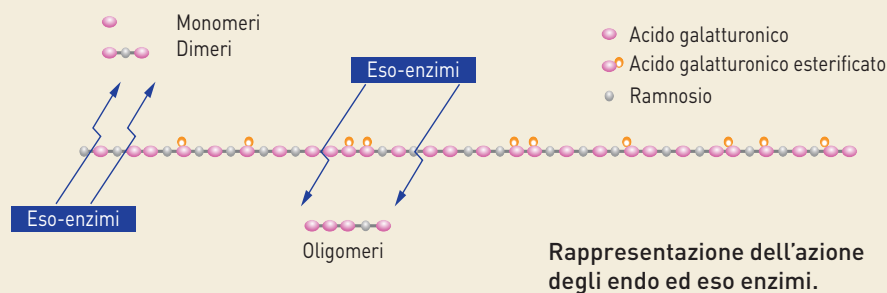
### Effettuare prove!

Come per numerosi altri aspetti della vinificazione, l'impiego di enzimi è una pratica suggerita dalla scienza che deve essere sup-

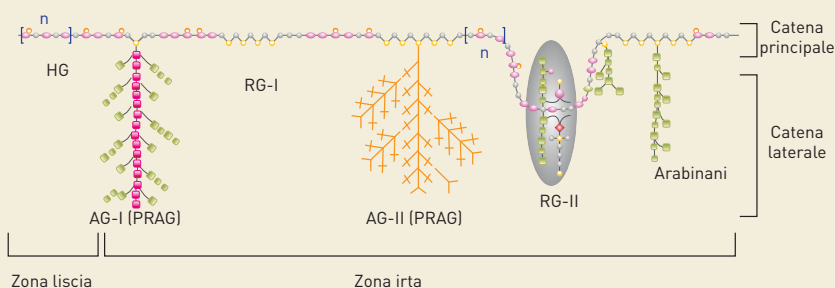
## PREPARATI COMPLESSI

Nell'insieme delle miscele enzimatiche utilizzate in enologia si trovano:

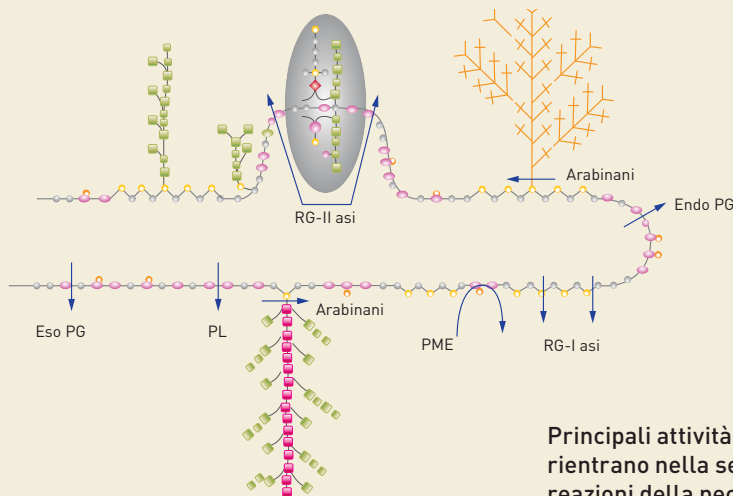
- endo-enzimi, che tagliano a caso le catene liberando polimeri di taglia media;
- eso-enzimi, che attaccano le estremità delle catene liberando monomeri e dimeri;
- attività annesse, in grado di staccare gruppi sostituenti o catene laterali. Queste attività in genere facilitano l'accesso alla catena principale da parte delle altre attività viste precedentemente..



Representazione dell'azione degli endo ed eso enzimi.



Representazione schematica semplificata delle diverse zone di una catena pectica.



Principali attività enzimatiche che rientrano nella sequenza delle reazioni della pectinasi.

portata dall'esperienza, ossia dalla sintesi di risultati analitici, di osservazioni pratiche e di analisi sensoriali. È per questo che dopo aver preselezionato alcune formulazioni sulla base di conoscenze scientifiche, lo sviluppo di un nuovo preparato enzimatico passa sistematicamente ed obbligatoriamente attraverso una fase di severa sperimentazione pratica in cantina. Questa fase sperimentale è necessaria anche per confrontare le prestazioni dei diversi preparati enzimatici. È estremamente importante confrontare, in condizioni reali di impiego, le prestazioni dei preparati enzimatici che si vorrebbero adot-

tare in vinificazione, tenendo conto della dose, della temperatura e del tempo di contatto, valutando i risultati ottenuti in termini di degradazione delle pectine, parametri fisico/chimici dei vini ed impatto organolettico. Infine una valutazione del costo del trattamento, che tenga in giusta considerazione costo del preparato commerciale, dosaggio da applicare e risultato ottenuto, potrà aiutare nella definizione della scelta.

### Conoscere per scegliere

I formulati enzimatici oggi disponibili per l'enologia sono sottomessi ad una rigida norma-

tiva, che per ognuna delle attività ammesse ne definisce con precisione i contorni. In questo articolo ci si è soffermati in particolare sulle pectinasi e le loro diversità, cercando di far comprendere l'importanza dell'insieme delle attività secondarie che le accompagnano e che ne possono rappresentare in alcuni casi la forza in altri la debolezza.

I cataloghi di prodotti da vinificazione non propongono mai una pectinasi, ma piuttosto cocktail di pectinasi, che si differenziano tra loro per pH e temperatura ottimali, nonché per il meccanismo d'azione, e sono accompagnate da una miriade di attività satellite. Ogni preparato conduce ad una propria e specifica sequenza di passaggi di degradazione della estremamente complessa molecola pectica. Le difformità nella composizione dei mosti, che si ottengono in seguito all'applicazione di uno o dell'altro preparato, portano sui vini finiti a risultati tecnologici ed organolettici significativamente differenti. Per formulare una scelta oculata e continuare a far crescere le proprie conoscenze, è di primaria importanza per gli enologi realizzare prove applicative, che mettano a confronto diversi preparati, valutandone infine i risultati tecnici e sensoriali.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

### DA SAPERE

- Due prodotti con lo stesso livello di attività espressa in una delle unità menzionate possono avere comportamenti tecnologici anche molto differenti.
- Anche iso-enzimi, enzimi dotati della stessa attività enzimatica, possono avere intervalli di pH e di temperature ottimali differenti.
- Gli enzimi enologici sono dei cocktail. Ogni attività agisce in sinergia ed in successione con le altre per raggiungere l'obiettivo.
- Alcune attività dette principali sono note e standardizzate; altre dette secondarie o ausiliarie possono essere note e misurate ma non standardizzate, ed infine esiste un pool di attività non identificate (attive o meno in condizioni enologiche).
- Un livello molto elevato di una sola attività può essere superfluo se l'azione dell'enzima è limitata dall'assenza di attività ausiliarie che operano nel liberare l'accesso dell'attività principale al proprio sito d'azione.