



GLI ENZIMI IN ENOLOGIA

■ COSA SONO

Gli enzimi svolgono la funzione di catalizzatori dei processi biologici: praticamente tutte le reazioni biochimiche esistenti in natura dipendono dalla presenza degli enzimi, i quali hanno la capacità di velocizzare enormemente reazioni che altresì avverrebbero da 10^5 a 10^{17} volte più lentamente.

Hanno la caratteristica comune di far avvenire solamente le reazioni termodinamicamente possibili, aumentandone la velocità di reazione col substrato (i reagenti delle reazioni chimiche) senza alterarne l'equilibrio e ritrovandosi inalterati alla fine del processo.

Quando i residui amminoacidici dell'enzima non sono sufficienti a garantire la sua azione sul substrato, gli enzimi necessitano della presenza di cofattori, i quali possono essere ioni organici come Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , o molecole più complesse dette coenzimi.

Ogni enzima catalizza una tipologia di reazioni (idrolisi, decarbossilazione, o ossidazione) e riconosce selettivamente i giusti substrati in base alla loro struttura chimica e alla loro configurazione spaziale. Grazie alla loro specificità, gli enzimi sono in grado di consentire altissime rese di reazione, spesso maggiori del 95 %.

Anche nel caso in cui la specificità sia meno stretta (ovvero nel caso in cui l'enzima sia in grado di reagire con più substrati), la reazione con i diversi substrati utilizzabili avviene con velocità ed affinità molecolari diverse, rendendo alcune reazioni più favorite di altre.

La velocità e la resa delle reazioni enzimatiche possono essere influenzate dalla presenza di molecole attivatrici o inibitrici, molecole in grado di interferire positivamente o negativamente con la catalisi.

L'inibizione può essere di tipo reversibile (quando è temporanea e capace di diminuire l'efficienza catalitica di un enzima) o di tipo irreversibile, nel caso in cui l'inibitore vi si combini o distrugga il gruppo funzionale dell'enzima, essenziale per la sua attività catalitica.

Alcune molecole svolgono un'attività inibitoria tale da non permettere lo svolgimento della reazione enzimatica.

IL MECCANISMO DI REAZIONE ENZIMATICA

La reazione enzimatica è sempre descritta come:



dove E, S e P rappresentano rispettivamente l'enzima, il substrato e il

prodotto, mentre ES ed EP sono i complessi transitori che si formano. La regione di un enzima a cui si lega il substrato (ed eventualmente i cofattori) viene detta "sito attivo": nel sito attivo si distinguono poi il "sito catalitico" – co-

stituito dai residui amminoacidici che partecipano direttamente alla formazione e alla rottura dei legami interessati nella catalisi – e il "sito di legame", ovvero la regione dove si lega il substrato. Il modello "chiave – serratura" proposto da Emil Fischer nel 1984 prevedeva che il sito di legame per un substrato fosse costituito da una fessura sulla superficie dell'enzima di forma complementare al substrato: tale modello è stato ad oggi sostituito dal modello più realistico definito "adattamento indotto", in cui i siti di legame enzima-substrato – sebbene in larga misura preformati – vanno incontro a modificazione conformazionale quando legano il substrato.

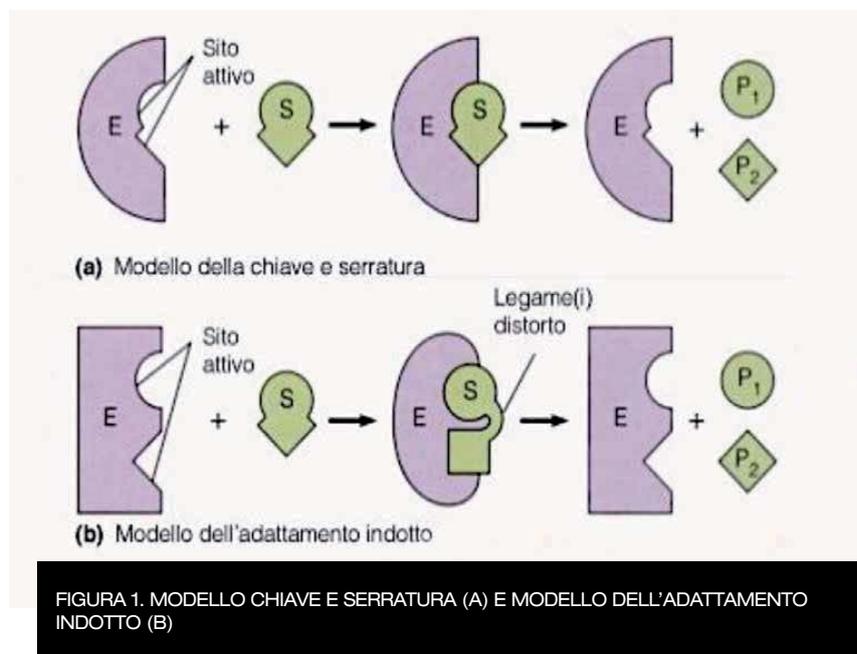


FIGURA 1. MODELLO CHIAVE E SERRATURA (A) E MODELLO DELL'ADATTAMENTO INDOTTO (B)

prodotto, mentre ES ed EP sono i complessi transitori che si formano. La regione di un enzima a cui si lega il substrato (ed eventualmente i cofattori) viene detta "sito attivo": nel sito attivo si distinguono poi il "sito catalitico" – co-

LE PREPARAZIONI ENZIMATICHE INDUSTRIALI

I primi preparati enzimatici industriali messi in commercio per il settore enologico risalgono agli anni '70 con l'introduzione delle pectinasi ottenute a partire

BOX 1. LA STRUTTURA DELL'ACINO D'UVA: LE PECTINE

Per comprendere il ruolo degli enzimi in enologia e il loro meccanismo d'azione nei riguardi della buccia e della polpa dell'acino, occorre prima di tutto capire la composizione di quest'ultime.

La buccia dell'acino è costituita da cellule dalla spessa parete cellulare, le quali - oltre a garantire la rigidità alla cellula - sono costituite da emicellulosa, cellulosa e - in misura minore - da sostanze pectiche, in grado di intrappolare una gran quantità di tannini, antociani, aromi e loro precursori, fondamentali per l'ottenimento di vini di qualità.

Le sostanze pectiche costituiscono invece la parte principale della sottile parete delle cellule della polpa, la quale è costituita da grandi cellule in grado di opporre una scarsa resistenza alla trasformazione meccanica dell'acino durante la vinificazione e formate da vacuoli cellulari contenenti principalmente zuccheri fermentescibili ed acidi organici.

LA PECTINA

La pectina è una macromolecola estremamente complessa presente in natura e le uve ne contengono in quantità variabile a seconda del grado di maturazione. La pectina è un polisaccaride strutturale, il quale viene solubilizzato durante la maturazione delle uve da enzimi endogeni presenti nell'acino e liberata nel mosto durante le operazioni di pigiatura, provocando un aumento della sua viscosità e rendendo difficili le operazioni di sfeccatura e chiarifica.

La pectina è composta da 3 principali costituenti:

- Gli omogalatturani (HG)
- I ramnogalatturani I (RG-I)
- Il ramnogalatturano II (RG-II)

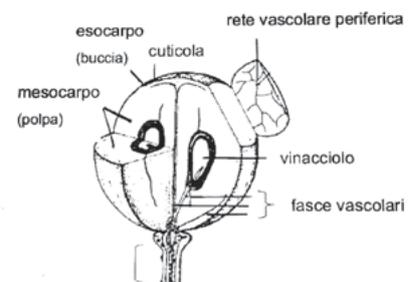
Gli omogalatturani rappresentano le zone dette "lisce" e sono composti da lunghe catene non ramificate di acido galatturonico, il quale può trovarsi in forma esterificata con il metanolo.

I ramnogalatturani rappresentano le parti ramificate delle pectine e sono composti da unità di ramnosio alternate ad unità di acido galatturonico. Le loro ramificazioni - dette anche "code peptiche" - sono costituite da catene laterali di arabinani ed arabinogalattani.

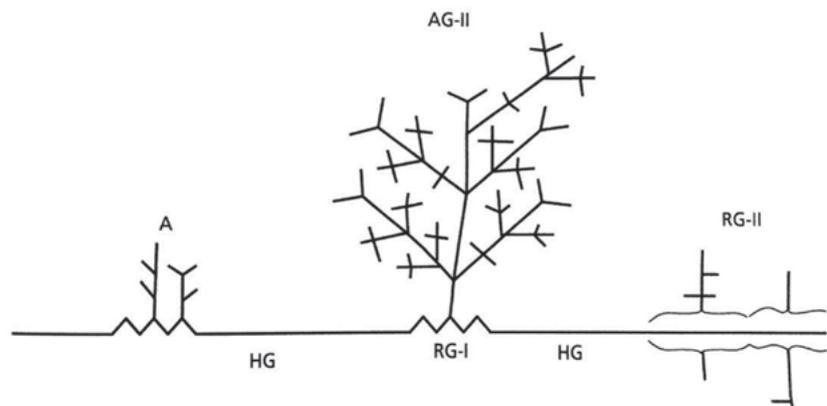
Il ramnogalatturano di tipo II è un polisaccaride costituito da una catena principale molto corta di acido galatturonico, sulla quale sono innestate quattro catene laterali oligosaccaridiche contenenti zuccheri ed acidi, le quali formano una struttura molto complessa. A causa dei numerosi legami osidici presenti all'interno della molecola, il ramnogalatturano II resiste all'azione degli enzimi.

A: arabinano; HG: omogalatturano; AG-II: arabinogalatturano II; RG-I: ramnogalatturano I; RG-II: ramnogalatturano II.

L'uva matura contiene grandi quantità di enzimi pectolitici, i quali sono in grado di idrolizzare praticamente la totalità delle pectine presenti in forma solubile nell'acino; di conseguenza, i mosti contengono poche pectine solubili (da 0,5 a 1 g/l sotto forma di acido galatturonico). Tuttavia, a causa dei trattamenti subiti dalle uve, parte delle pectine insolubili possono passare nel mosto causando un aumento della loro concentrazione (può elevarsi fino a raggiungere i 2,5 g/l) e rendendo necessario un trattamento dei mosti con enzimi pectolici esogeni.



LA STRUTTURA DELL'ACINO D'UVA



MODELLO STRUTTURALE PROPOSTO PER LE SOSTANZE PECTICHE ACIDE DELL'UVA (DOCO ET AL., 1995)

dall'industria di produzione dei succhi di mela, le quali venivano utilizzate allo scopo di facilitare la chiarifica dei mosti.

A causa dello scarso grado di purificazione che questi prodotti presentavano e alla presenza di attività enzimatiche collaterali negative, i mosti e i vini ottenuti dal trattamento con tali preparazioni presentavano sovente deviazioni organolettiche (vini con un carattere fenolico più o meno pronunciato, perdita del carattere fruttato nei vini bianchi) e per tale motivo si assistette ad un rapido abbandono della pratica di trattamento delle uve e dei mosti con enzimi.

Grazie ai progressi compiuti nella ricerca a partire dalla fine degli anni '80, l'industria di produzione degli enzimi ha iniziato a mettere in commercio preparati enzimatici purificati e oggi si trovano in commercio prodotti di altissima qualità, in grado non solo di preservare la qualità dei vini, ma anche di migliorarla notevolmente. Ad oggi gli enzimi vengono utilizzati non più solo per facilitare la chiarifica dei mosti, ma anche per moltissimi altri scopi (miglioramento delle fasi di chiarifica e di macerazione, estrazione di aromi o di colore, miglioramento della filtrabilità, etc.).

UTILIZZO DEGLI ENZIMI IN ENOLOGIA

I preparati industriali enzimatici presenti in commercio sono generalmente costituiti da un pool complesso di enzimi, ottenuti per la gran parte dalla fermentazione di alcuni ceppi di lieviti enologici: *Aspergillus niger* e *Trichoderma harzianum*.

Altri enzimi – utilizzati per altri scopi – vengono prodotti a partire dal bianco d'uovo essiccato (Lisozima) e da colture di *Lactobacillus fermentum* (ureasi).

In base all'obiettivo enologico prefissato, le principali tipologie di enzimi utilizzati in enologia sono le seguenti:

TABELLA 1

Preparato enzimatico	Utilizzo in enologia
Pectinasi concentrate	Chiarifica e sfeccatura dei mosti
Pectinasi con corredo di attività collaterali (cellulasi, emicellulasi)	Fase macerativa ed estrattiva
Pectinasi con attività collaterali di tipo glicosidasi (β-glucosidasi, arabinosidasi, ecc)	Valorizzazione del potenziale aromatico delle uve bianche
β-glucanasi	Filtrazione dei vini e affinamento sulle fecce
Lisozima	Stabilizzazione biologica dei vini

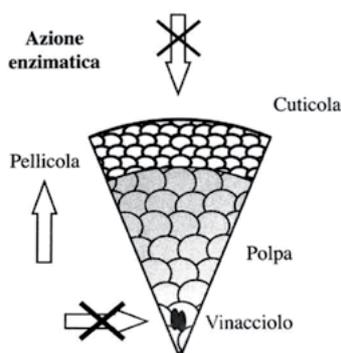
PRINCIPALI PREPARAZIONI ENZIMATICHE IMPIEGATE IN ENOLOGIA E LORO UTILIZZI

FASE PREFERMENTATIVA

■ Enzimi per la macerazione pellicolare

Indebolendo le pareti cellulari della polpa ed idrolizzando la pectina solubile, gli enzimi di macerazione nella vinificazione in bianco facilitano la liberazione dei succhi e aumentano le rese di sgrondo, evitando cicli di pressatura troppo forti.

Le cellule della polpa sono più sensibili all'azione degli enzimi, a causa dello scarso spessore delle pareti e dello scarso tenore in tannini. I preparati enzimatici agiscono anche sulle cellule della pellicola, ma con un effetto minore e decrescente verso le zone periferiche dell'acino, più ricche in tannini. A causa della presenza di uno strato lipidico protettivo sulla loro superficie, gli enzimi non svolgono alcun effetto sui vinaccioli.



AZIONE DEGLI ENZIMI PECTOLITICI ALL'INTERNO DELL'ACINO D'UVA

Le attività enzimatiche utilizzate durante la fase di macerazione pellicolare sono le pectinasi (PG, PL, PME), ma anche alcune attività che permettono l'idrolisi delle zone ramificate della pectina. L'enzimaggio effettuato al momento del riempimento del serbatoio di macerazione facilita la pressatura e la chiarifica del mosto e permette di ottenere un mosto di migliore qualità e più ricco in precursori aromatici, i quali si trasformeranno in forme volatili nel corso della fermentazione alcolica.

Se non si desidera effettuare una macerazione pellicolare, le pectinasi possono essere impiegate il più rapidamente possibile sulle uve in ingresso alla fase di pressatura, con un effetto positivo sulla liberazione dei succhi dall'acino alle basse pressioni ed un conseguente aumento della resa di pressatura di qualità (e una minore estrazione di composti erbacei sgradevoli). L'azione enzimatica continua anche dopo la pressatura e permette anche di ottenere una chiarifica ottimale del mosto.

■ Enzimi di chiarifica

La chiarifica dei mosti risulta ad oggi la pratica più diffusa e accettata nelle vinificazioni in bianco e rosato. Dopo la pressatura, il mosto si presenta torbido e contiene

particelle in sospensione che – se non allontanate prontamente dal mezzo – possono portare a deviazioni organolettiche sgradevoli derivanti dall'interazione del lievito con tali composti.

Nelle vinificazioni in bianco, gli enzimi di chiarifica vengono utilizzati per rompere le catene di acido galatturonico delle sostanze pectiche, le quali flocculano insieme alle proteine presenti nel mosto per poi precipitare sul fondo della vasca nell'arco di 1-2 ore, riducendo notevolmente la viscosità del mosto. L'efficacia dell'enzimaggio sulla chiarifica dipende dalla varietà e dal grado di maturazione, così come dal metodo di raccolta e dalle condizioni di pressatura delle uve. Gli enzimi vengono aggiunti solitamente in uscita dalla pressa, ma talvolta possono essere aggiunti già in pressatura o dosati direttamente sulle uve. Le dosi (generalmente di 1-2 g/Hl sui mosti), devono essere aggiustate in base alla temperatura del mosto e al tempo di chiarifica, mentre lo stato di avanzamento della chiarifica viene determinato misurando la torbidità del mosto con un nefelometro.

Gli enzimi di chiarifica permettono pertanto di ridurre i tempi di sfeccatura e il volume delle fecce prodotte; facilitano inoltre l'inoculo dei lieviti e impediscono la formazione di prodotti che conferiscono gusti erbacei al vino a partire dai lipidi e dagli acidi grassi presenti nel mosto (esanali, esenoli). Di contro, i limpidimenti eccessivi del mosto (NTU < 20) comportano un decremento eccessivo di acidi grassi e lipidi e di conseguenza inducono i lieviti a convertire i carboidrati in intermedi metabolici precursori dell'acidità volatile, utili per supplire a tale carenza. Nei vini rossi gli enzimi di chiarifica vengono utilizzati soprattutto per illimpidire i vini di pressa, generalmente molto ricchi in pectine. Dal punto di vista chimico i pre-

parati utilizzati per la chiarifica sono miscele di enzimi pectolitici con attività di poligalatturonasi (PG), pectiniasi (PL) e pectinmetilesterasi (PME): nella scelta del prodotto è importante considerare il rapporto PG/PL, fondamentale per l'ottenimento di una rapida idrolisi delle pectine solubili.

■ **Enzimi di estrazione**

Questa tipologia di enzimi permette di estrarre maggiormente dalle uve sia la loro componente colorata, sia la loro componente aromatica e i loro precursori: i mosti che si ottengono sono tipicamente più strutturati, più facili da chiarificare e ottenuti da rese di pressatura più alte. Al gusto, i vini trattati risultano tipicamente più rotondi, strutturati e fruttati, mentre il loro colore risulta più stabile.

L'aggiunta di enzimi viene effettuata o direttamente sulle uve rosse al momento della pigiatura, o all'inizio della macerazione, durante il rimontaggio della vasca. L'attività enzimatica è inibita dalla presenza di alcol, dal momento che i tannini più aggressivi si legano alle proteine dell'enzima denaturandolo.

Gli enzimi di estrazione agiscono sulle cellule della buccia dell'acino, permettendo un'estrazione molto rapida di antociani e tannini liberi ed un'estrazione lenta dei complessi tannini-polisaccaridi della parete delle cellule (grazie all'azione delle cellulasi e delle emicellulasi sulle sostanze tanniche meno astringenti ed amare); non svolgono però alcuna estrazione nei confronti dei tannini dei vinaccioli, impermeabilizzati da uno strato lipidico esterno.

L'efficacia enzimatica è legata alla dose di utilizzo, al tempo di contatto con le bucce (variabile dalle 2 alle 10 ore) e alla temperatura (10-20 °C): all'aumentare della dose e del tempo di azione, aumenta l'estrazione dei complessi tannino-polisaccaridi della parete.

FASE POST-FERMENTATIVA

■ **Enzimi glicosidasi per la liberazione di aromi**

Nelle uve e nei vini, i precursori aromatici si trovano sempre in forma combinata: l'aglicone aromatico è legato ad una molecola di glucosio, che a sua volta è legata ad un altro zucchero (ramnosio, arabinosio).

I precursori aromatici non sono volatili, ma lo diventano grazie all'idrolisi enzimatica che porta alla liberazione dell'aglicone: l'idrolisi avviene prima per intervento di una esoglicosidasi (ramnosidasi, arabinosidasi e apiosidasi), la quale scinde il legame con lo zucchero e successivamente di una β-glucosidasi, la quale scinde il legame tra il glucosio e l'aglicone, rendendolo volatile.

Le glicosidasi possono avere origine dall'uva, dai lieviti cosiddetti varietali, dalla botrite, oppure essere di origine commerciale: mentre le glicosidasi presenti nelle uve non sono efficaci perché inibite da concentrazioni di glucosio superiori ai 10 g/l e quelle dei lieviti varietali sono insufficienti per l'idrolisi completa nel vino, le glicosidasi secrete dalla *Botrytis cinerea* sono più attive, ma vengono anch'esse inibite da altri metaboliti del fungo stesso.

Le glicosidasi di origine fungina impiegate in enologia, estratte dall'*Aspergillus niger*, risultano molto più efficaci rispetto a quelle dell'uva o del vino, soprattutto quando il contenuto di zuccheri è inferiore a 50 g/L: dal momento che il glucosio ha un effetto inibente sull'enzima, è importante che i vini trattati non ne contengano. Tali preparati vengono pertanto utilizzati sui vini secchi, al termine della fermentazione alcolica: il contatto del vino con l'enzima deve avvenire ad una temperatura superiore ai 15 °C e la durata del trattamento – pur variando in funzione dell'obiettivo enologico – non è generalmente inferiore ai 15 giorni.

Nei vini bianchi l'enzima deve



necessariamente venire asportato mediante trattamento dei vini con bentonite, mentre nei vini rossi – più ricchi di polifenoli – il suo utilizzo è facoltativo.

Particolarmente indicate per il trattamento con questi enzimi sono risultate le varietà aromatiche ricche di terpeni come il moscato, il muscadette e il gewurztraminer; tuttavia, un miglioramento della qualità aromatica dei vini si riscontra spesso anche su varietà quali Sauvignon, Semillon, Riesling e Chardonnay.

■ Enzimi β -glucanasici per migliorare la filtrabilità e la stabilità dei vini

L'attacco delle uve in vigna da parte della *Botrytis cinerea* (il fungo responsabile del marciume grigio), fa sì che le trasformazioni a carico della pectina avvengano principalmente a causa della presenza di alcuni enzimi che il lievito nocivo sintetizza per degradare le pareti cellulari della buccia dell'acino.

Oltre a produrre enzimi di tipo pectolitico, il fungo produce una "liasi" che rompe le catene peptidiche eliminandole dal mosto; allo stesso tempo, *Botrytis cinerea* sintetizza un polisaccaride chiamato glucano, ritenuto il principale responsabile dell'aumento di viscosità dei mosti e dei vini.

L'impiego di preparati a base di β -glucanasi ottenuti da *Trichoderma harzianum* permette di migliorare notevolmente la filtrabilità dei vini: l'enzima rompe la molecola del glucano migliorando l'efficacia della chiarifica e agendo positivamente sulla filtrabilità dei vini. Le dosi di utilizzo sui vini variano tra i 2 e i 5 g/Hl e l'aggiunta deve essere eseguita a fine fermentazione alcolica, dal momento che l'enzima viene fortemente inibito dall'azione dei lieviti.

Le β -glucanasi vengono utilizzate anche per il miglioramento qualitativo dei vini mantenuti sulle proprie fecce: il trattamento accelera i processi di autolisi delle cellule

del lievito, liberando nel mezzo amminoacidi, acidi nucleici e soprattutto mannoproteine utili per la stabilità proteica e tartarica dei vini e per la valorizzazione della loro componente aromatica.

■ Lisozima per il controllo della fermentazione malolattica

Il lisozima è un enzima naturale estratto dal bianco d'uovo che svolge un'azione microbica selettiva nei confronti dei batteri gram-positivi (oenococchi, lattobacilli, pediococchi), senza interferire con l'azione dei lieviti e con i batteri acetici. È considerato un allergene, motivo per cui la dose massima consentita in vino è di 50 g/Hl. È utilizzabile sia sui mosti che sui vini e permette di razionalizzare l'utilizzo della solforosa in vinificazione, rendendo facile il riavvio di una fermentazione stentata e ostacolando l'avvio di una fermentazione malolattica indesiderata.

Di contro, la difficoltà di rimozione del lisozima dal vino può causare problemi all'avvio della fermentazione malolattica, quando questa è desiderata: allo scopo di eliminare i residui di prodotto dal vino, dopo il trattamento con lisozima, un'adeguata chiarifica della massa è sempre da prevedere.

L'enzima si è dimostrato efficace fino a concentrazioni batteriche dell'ordine di 104 ma pare avere un'azione inferiore su *L. plantarum* ed essere inibito dalla presenza di alte concentrazioni di polifenoli.

Bibliografia

LIBRI DI TESTO E PUBBLICAZIONI:

Bajard Sparrow et al., *Enzimi enologici: produzione, azione e impatto* – www.infowine.com, *Rivista internet di viticoltura ed enologia*, 2006 N. 7/2
 Bertrand A., Canal-Llaubères R.- M., Fuillat M., Hardy G., Lamadon F., Lonvaud-Funel A., Pellerin P., Vivas N. (2002) - *Prodotti di trattamento ed ausiliari di elaborazione dei Mosti e dei Vini*, V: 43-60
 Bucelli et al., *Applicazione in fase di macerazione di formulati enzimatici*

su Sangiovese - Vinidea.net - Rivista internet di tecnica viticola, 2002/N.1-DR
 Cagnasso et al., *Applicazione di un preparato enzimatico nella macerazione in rosso ed effetti sulla filtrazione del vino* - www.infowine.com, *Rivista internet di viticoltura ed enologia*, 2007, N. 9/3

Guerran & Scotti – *Impiego degli enzimi nella vinificazione dei vini bianchi di qualità* - *Vinidea.net - Rivista internet di tecnica viticola*, 2002

Canal-Llaubères, *La purificazione dei preparati enzimatici in enologia* - *Vinidea.net - Rivista internet di tecnica viticola*, 2003, N. 7

Enzimi per la vinificazione e l'affinamento: i preparati in commercio per ogni obiettivo enologico, www.asti.coldiretti.it, N. 10/9/2014

Institut Français de la vigne et du vin Enzymes in oenology: Production, Regulation, applications

Margalit Y. (2005) - *Elementi di chimica del vino*, 1, B: 18, D: 30-32

Nelson D. L., Cox. M. M., *introduzione alla biochimica di Lehninger*, 2007, 8: 80-91

Parodi G., *Lieviti, polisaccaridi e qualità dei vini*, *VigneVini* 7/8, 2004

Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2003) - *Trattato di Enologia. Volume 1*, 10: 256-257; 11: 317-328

Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2003) - *Trattato di Enologia. Volume 2*, 3: 72-84; 6: 196-197; 10: 290-291, 305; 11: 334-336.

Sicheri G., *Enologia con elementi di chimica-enologica*, 2015 - libreria-universitaria.it - Google libri: cap. 3 pag. 102-105

Usseglio - Tomasset L. Tarantola C., *Gli enzimi pectolitici del mosto*, *Vitis* 3, 1996

SITI WEB DI DISPENSE UNIVERSITARIE:
<https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegati/28-03-2014/5-enzimi-i.pdf>
www.distabif.unina2.it/Materiale.../Biochimica%20Farmacia/Lezione%2017.pdf

192.146.242.139/biologia/sites/default/files/lezioni_2014-enzimi_bio_1-2.pdf

www.med.unipg.it/fisioterapia/Materiale%20Didattico/.../06.Enzimi%20Coenzimi.pdf