

l'Enologo

DAL 1893 LA VOCE DELLA CATEGORIA

MENSILE DELL'ASSOCIAZIONE ENOLOGI ENOTECNICI ITALIANI. ORGANIZZAZIONE NAZIONALE DI CATEGORIA DEI TECNICI DEL SETTORE VITIVINICOLO - N° 6 GIUGNO 2018



73° CONGRESSO: UN IMPEGNO E UN PREMIO ALLA NOSTRA PROFESSIONALITÀ



ASSENNOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

STRUTTURA, COLORE E ASTRINGENZA: DAL LIEVITO NUOVE OPPORTUNITÀ PER PERFEZIONARE LA STABILITÀ E LA QUALITÀ FENOLICA DEI VINI ROSSI

Uno studio finalizzato all'approfondimento delle interazioni tra polisaccaridi e polifenoli ha permesso una caratterizzazione mirata della frazione mannoproteica di un lievito enologico che, aggiunto in macerazione sotto forma di lievito autolisato, si è dimostrato in grado di interferire positivamente su stabilizzazione del colore e riduzione dell'astringenza dei vini rossi.



Di
Julie Mekoue-Nguela¹
Lallemand Sas - Blagnac (Francia)
2 UMR 1083 Sciences pour l'Œnologie, INRA,
Montpellier SupAgro, Université de Montpellier
Montpellier (Francia)

Junio Francesco Lo Paro²
Lallemand Inc. Succ. Italiana - Castel D'Azzano (VR)

Jose-Maria Heras³
Anthony Silvano⁴
Nathalie Sieczkowski⁶
Lallemand Sas - Blagnac (Francia)

Marion Schiavone⁵
Lallemand Sas - Blagnac (Francia)
LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA,
Toulouse (Francia)

INTRODUZIONE

- Le richieste di vaste fasce di consumatori sono attualmente orientate verso vini fruttati, dal colore intenso e con un buon volume in bocca. Parallelamente, nei segmenti di mercato dei vini rossi da *premium ad icon* è importante proporre dei prodotti con spiccata personalità e longevità, dotati di una buona struttura senza eccessiva astringenza.
- L'affinamento sulle fecce fini è una tecnica enologica tradizionale ampiamente diffusa che, sfruttando gli effetti benefici dei lieviti morti o in fase di avanzata autolisi, permette di ridurre in parte astringenza ed amaro, incrementando allo stesso

tempo lunghezza e complessità con un contributo positivo finale sulla stabilizzazione del colore dei vini rossi (Rodriguez *et al.*, 2005).

- Per by-passare gli inconvenienti dell'affinamento tradizionale sulle fecce, da circa 15 anni si è sviluppata la tecnica dell'aggiunta di specifici lieviti inattivati come fonte di polisaccaridi (Guadalupe *et al.*, 2007, and Rodriguez-Bencomo *et al.*, 2010). Sebbene sia noto il concetto che certi polisaccaridi possano complessarsi con i tannini riducendo l'astringenza dei vini (Escot *et al.*, 2008), un recente studio dell'unità di ricerca delle scienze per l'Enologia dell'INRA Montpellier ha ripreso l'indagine dei fattori coinvolti nel fenomeno (Mekoue *et al.*, 2016).

Il lavoro condotto da questo gruppo di ricerca ha evidenziato come delle soluzioni, contenenti tannini di buccia d'uva con un grado medio di polimerizzazione di 27 unità e mannoproteine parietali di lievito, sono in grado di produrre degli aggregati di dimensioni submicroniche in grado di rimanere in sospensione stabilmente nel tempo.

- Questa scoperta supporta l'ipotesi che le mannoproteine rilasciate da specifici lieviti inattivi possano migliorare i caratteri gustativi dei vini rossi grazie alla capacità di legare i tannini. L'utilizzo di questo tipo di coadiuvanti ed elevata concentrazione di mannoproteine potrebbe limitare la precoce aggregazione dei tannini e degli antociani, migliorando perciò la stabilità del

colore e l'impatto gustativo dei vini rossi.

- Alcune tecnologie all'avanguardia hanno reso disponibili dei nuovi strumenti per una migliore caratterizzazione dei lieviti vinari e dei loro derivati permettendo lo sviluppo di un nuovo lievito autolisato con una frazione mannoproteica dalle caratteristiche peculiari, frutto della combinazione di un determinato ceppo di *S. cerevisiae* (WY1) con uno specifico processo di inattivazione (MEX).

Caratterizzazione fisico-chimica e proprietà del lievito autolisato MEX-WY1

- In una ricerca condotta grazie alla partnership tra Lallemand e l'INSA di Tolosa, la microscopia a forza atomica (AFM, *Atomic Force Microscope*) utilizzata per caratterizzare le proprietà della parete cellulare del lievito WY1, in comparazione con altri ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, ha confermato la forte e peculiare capacità di produzione mannoproteica del lievito WY1 (Schivone *et al.*, 2014).

- Il lievito WY1 si è dimostrato particolarmente adesivo, e grazie all'elevato contenuto e lunghezza delle catene mannoproteiche all'esterno della parete, è in grado di interagire fortemente con la Concavalina A, una lectina in grado di formare legami con i residui mannosilati delle mannoproteine.

- In laboratorio sono state testate differenti condizioni termiche e fisico-chimiche in grado di rilasciare le frazioni mannoproteiche a catena lunga del lievito WY1. Dopo una fase test in laboratorio, è stato selezionato uno specifico trattamento fisico-chimico (processo MEX) in grado di

disgregare la parete del lievito ottimizzando il rilascio di queste frazioni ad alto peso molecolare.

- La **Fig. 1** mostra l'immagine al microscopio del medesimo ceppo di lievito trattato con un classico processo di inattivazione termica (SWIT-WY1, Fig. 1A) in confronto con un processo di inattivazione più specifico (MEX-WY1, Fig. 1B).

- Il lievito WY1 inattivato con il processo standard mantiene una certa integrità cellulare (insolubilità > del 60%), mentre lo stesso ceppo inattivato con il processo MEX presenta una solubilità vicina all'80% ed è quindi classificabile come lievito autolisato. La cromatografia ad esclusione molecolare ha confermato che la frazione solubile di quest'ultimo presenta un livello di polisaccaridi a basso ed elevato peso molecolare superiore a quella ottenibile con un classico trattamento di inattivazione termica (**Fig. 2**).

Interazione con i composti fenolici a inizio fermentazione e interpretazione dei meccanismi d'azione

- Su scala di laboratorio, il lievito inattivo SWYT-WY1 e il lievito autolisato MEX-WY1 sono stati aggiunti ad inizio della fermentazione alcolica per valutarne il grado di interazione con i composti polifenolici. Le fermentazioni sono state condotte su mosto sintetico aggiunto di estratti polifenolici ricavati da un mosto di uve rosse termovinificate.

- Sui vini finali è stato effettuato un test di precipitazione con la sieralbumina bovina (BSA), una proteina ricca in prolina in grado di interagire con i polifenoli del vino, secondo la metodologia descritta da Bou-

Fig. 1 - Immagini di due derivati di lievito prodotti con un processo di inattivazione termico (1.A SWIT-WY1) ed un processo di inattivazione specifico (1.B MEX-WY1).

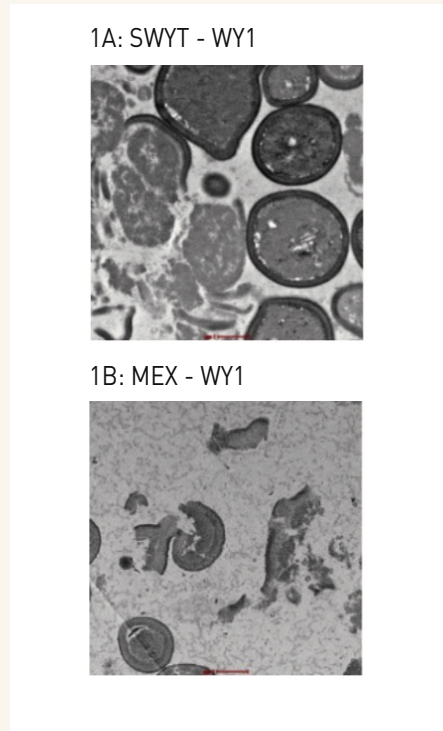
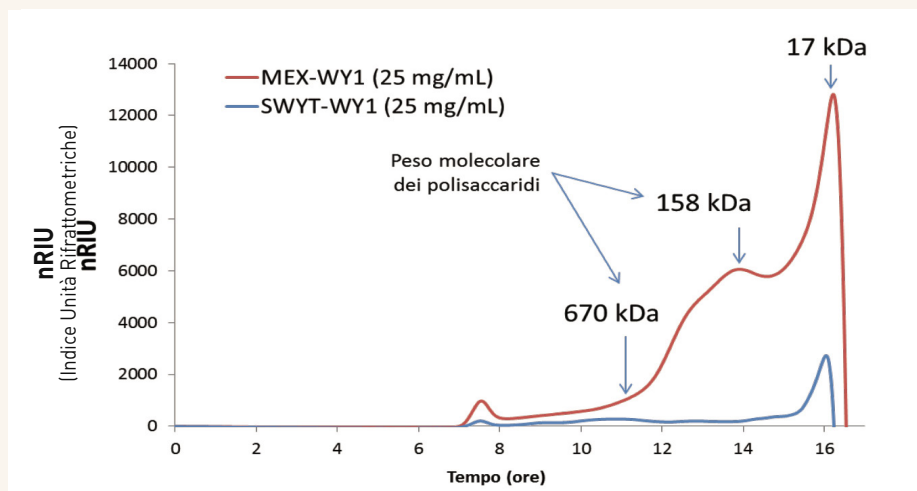


Fig. 2 - Cromatografia ad esclusione molecolare delle frazioni solubili dei derivati di lievito SWYT-WY1 e MEX-WY1.



let *et al.* 2016. Le differenze dell'assorbanza sulle lunghezze d'onda a 280 e 520 nm tra il vino trattato e non trattato con BSA dà una stima rispettivamente dei polifenoli totali (IPT) e dei pigmenti rossi totali (PRT) precipitabili dalla BSA.

- Se la quantità dei tannini rimossi dalla sieralbumina bovina è bassa, il vino è potenzialmente meno astringente. Questo modello interpretativo è analogo alle reazioni tra tannini e proteine salivari coinvolte con la percezione dell'astringenza durante la degustazione. Questo duplice effetto è stato confermato con il lievito inattivo SWYT-WY1 e si è manifestato in modo più marcato con l'autolisato MEX-WY1. Anche la quantità di pigmenti rimossi dalla BSA è risultata inferiore, indice di un colore più stabile (**Fig. 3**).

- Ulteriori esperimenti su scala di laboratorio sono stati dedicati alla comprensione del meccanismo di interazione del lievito autolisato MEX-WY1 con i polifenoli, con particolare riguardo all'effetto dei polisaccaridi rilasciati.

- Un mosto sintetico aggiunto di estratti fenolici di buccia d'uva Merlot e della sola frazione solubile del lievito autolisato oggetto della prova, denominata MEX-WY1-S, è stato mantenuto in agitazione 24 ore a temperatura ambiente, centrifugato e il surnatante analizzato. L'indice dei

polifenoli totali (IPT) e dei pigmenti rossi totali (PRT) è stato determinato mediante spettrofotometria UV-visibile (Boulet *et al.* 2016). L'interazione tra i polifenoli e la frazione solubile di MEX-WY1 non ha portato ad aggregazioni e precipitazioni significative. È stato misurato un decremento non significativo dell'IPT e del PRT (intorno al 5 e 6% rispettivamente) rispetto al mosto controllo aggiunto di polifenoli, indice della formazioni di complessi stabili con i tannini ed i pigmenti.

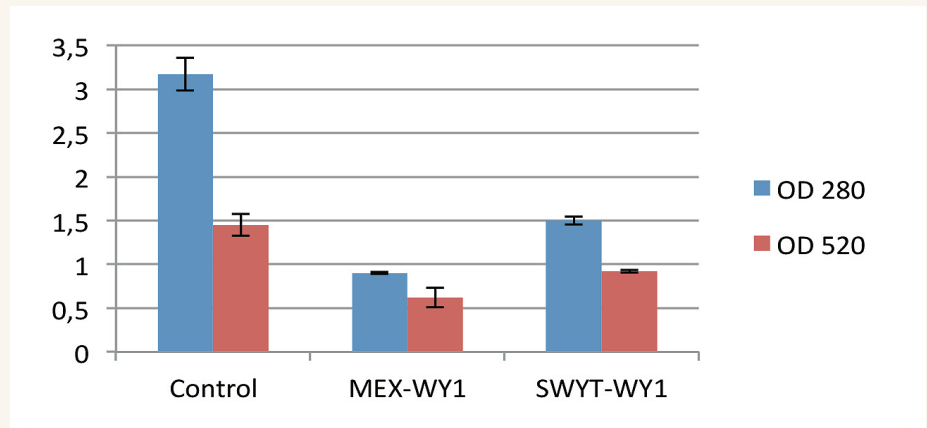
- La stessa matrice di mosto nel test con la sieralbumina bovina a DO 280 ha messo in luce una minore rimozione dei tannini nella tesi aggiunta delle frazioni MEX-WY1-S (**Fig. 4A**), interpretabile come una potenziale riduzione dell'astringenza vista la minore reattività dei tannini con la proteina aggiunta. Per indentificare i componenti solubili maggiormente coinvolti in questa interazione, MEX-WY1-S è stato frazionato in polisaccaridi a basso (< 10 kDa) ed alto (> 10 kDa) peso molecolare. Le componenti ad elevato peso molecolare si sono dimostrate più efficaci sulla stabilizzazione dei tannini (**Fig. 4B**).

- Questi studi, hanno dimostrato il potenziale di alcune macromolecole presenti nel lievito autolisato MEX-WY1 su alcuni parametri qualitativi come stabilità del colore e astringenza dei vini. Grazie agli studi di caratterizzazione della struttura parietale del lievito WY1 è ipotizzabile che le molecole attivamente coinvolte in queste reazioni siano principalmente delle mannoproteine dalle proprietà specifiche, la cui dissoluzione nel mezzo è facilitata dallo specifico processo di inattivazione.

Valutazione del lievito autolisato MEX-WY1 nella vinificazione in rosso: effetto su colore, composizione polifenolica e implicazioni sensoriali

- Lo studio si è concluso con la valutazione delle performance di questo nuovo autolisato su mosti reali con prove condotte sia su scala di microvinificazione (1 hl) che di cantina (50-250 hl), su uve provenienti da differenti vitigni ed in differenti aree viticole in entrambi gli emisferi. Le prove sono state svolte su masse di uve rosse omogenee vinificate con le medesime procedure di cantina; l'obiettivo di ogni prova era confrontare una modalità controllo con una aggiunta di 30 g/hl del prodotto MEX-WY1 ad inizio della mace-

Fig. 3- Valutazione dei tannini (DO 280 nm) e dei pigmenti (DO 520 nm) precipitabili con la BSA in un vino rosso sintetico fermentato con e senza i derivati di lievito SWYT-WY1 e MEX-WY1.



razione.

- Sono state monitorate le cinetiche della fermentazione alcolica, le quali non sono state influenzate dall'aggiunta del prodotto. I vini ottenuti sono stati analizzati in diverse fasi della vinificazione per valutarne l'omogeneità e l'evoluzione dei parametri colorimetrici del profilo polifenolico.

- Il colore dei vini è stato valutato con classica analisi spettrofotometrica o, in modo più rigoroso, attraverso le tre coordinate spaziali del metodo Cielab. I vini stabilizzati sono stati sottoposti all'analisi sensoriale e alla misurazione dell'indice di precipitazione delle proteine salivari (SPI).

- Nelle numerose prove svolte, l'aggiunta dello specifico autolisato ad inizio della macerazione ha confermato il positivo effetto sul colore. Un esempio significativo è presentato in **Fig. 5**, che mostra i parametri del colore L*, a*, b* (Cielab) misurati su un Pinot Noir 2016 del Marl-

borough in Nuova Zelanda.

- Il vino fermentato con MEX-WY1 ha un colore più scuro (parametro L*), più rosso e meno giallo (parametri a* e b*). Il ΔE (parametro che misura la differenza tra due colori in base ai valori dei parametri Cielab) calcolato sui vini della prova è risultato pari a 4,7, ovvero superiore alla soglia minima ΔE=3 con cui un l'occhio umano può distinguere una differenza di colore visibile tra due vini rossi.

- Su scala industriale anche alcune esperienze italiane su varietà Sangiovese, Merlot, Cabernet Sauvignon, Barbera e Croatina hanno confermato l'effetto positivo sulla stabilità del colore.

- A titolo di esempio in un test su Croatina 2016 l'omogeneità della prova è stata garantita grazie alla suddivisione omogenea di ogni rimorchio d'uva in due vinificatori da 250 hl, come confermato dalle analisi chimiche dei vini (dati non mostrati). L'intensità colorante è risultata più elevata

Fig. 4a e 4b - Valutazione dei tannini precipitabili dalla BSA (DO 280 nm) dopo interazione con la porzione solubile del lievito autolisato (MEX-WY1-S, Fig. 4A) e della stessa porzione solubile frazionata in componenti a basso (< 10 kDa) ed alto peso molecolare (> 10 kDa) (4.B). La porzione solubile di MEX-WY1 è stata aggiunta in concentrazione corrispondente a 30 g/hl di MEX-WY1 (parte solubile + parte insolubile).

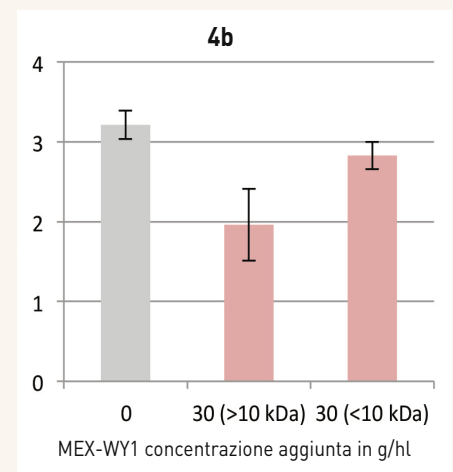
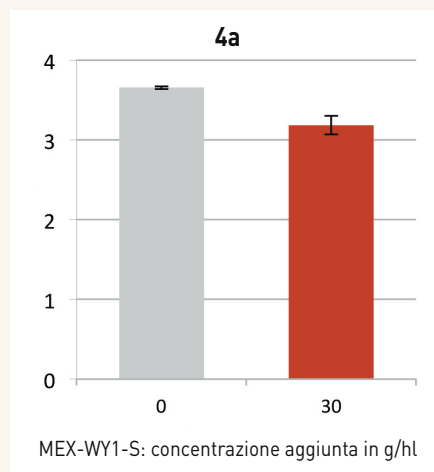
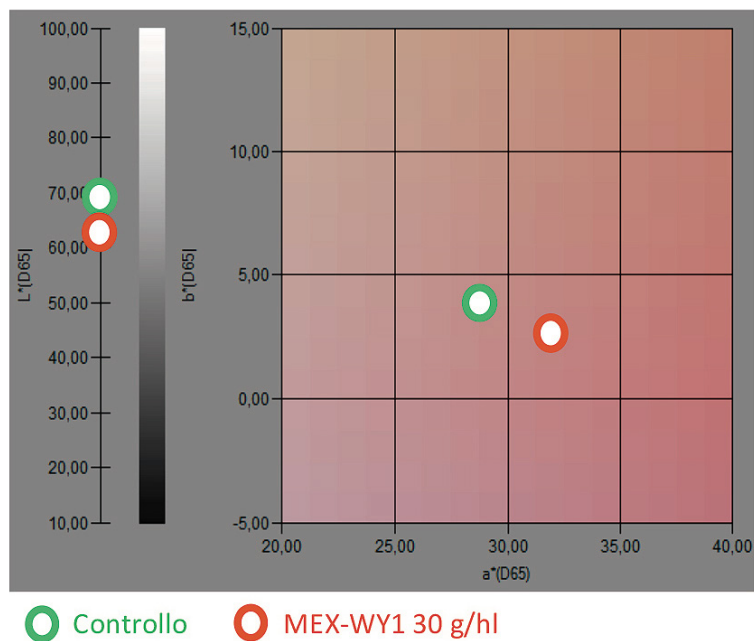


Fig. 5 - Differenze colorimetriche determinate con il metodo CieLab (parametri L*, a*, b*) su due vini Pinot Noir 2016 (Marlborough, Nuova Zelanda.). Confronto tra una tesi controllo ed una tesi aggiunta con il derivato di lievito MEX-WY1 al dosaggio di 30 g/hl ad inizio fermentazione alcolica.



nella tesi trattata con MEX-WY1 sia dopo la fermentazione malolattica che nella successiva fase di conservazione (Fig. 6). L'analisi del colore CieLab ha confermato un $\Delta E = 2,75$, ovvero molto vicino ad una differenza percepibile in modo chiaro ad occhio nudo. Va segnalato che in questo caso anche il vino controllo era stato aggiunto di un derivato di lievito (Opti-RED®, Lallemand) con un'efficacia testata sull'intensità colorante.

● I test con lo specifico autolisato MEX-WY1 hanno messo in luce anche un miglioramento di alcune caratteristiche sensoriali dei vini: oltre alla riduzione dell'astringenza, i vini presentavano una struttura più interessante ed una miglio-

re pulizia aromatica. Come indicatore per valutare l'astringenza dei vini è stato preso in considerazione l'indice di precipitazione salivare (SPI) che misura la reattività delle proteine salivari con i polifenoli del vino (Rinaldi *et al.*, 2012). Nella prova su Croatina è interessante notare che l'indice dei polifenoli totali (IPT) era più elevato nel vino trattato con MEX-WY1 senza tuttavia comportare un incremento della precipitazione delle proteine salivari (SPI) a conferma di una maggiore struttura senza effetti negativi sull'astringenza (Fig. 6).

● La Fig. 7 mostra l'SPI di un vino Grenache prodotto da uve trattate con la termovinificazione, tecnica ad elevata efficienza estrattiva ma che può dare origine a vini

con elevata astringenza. Nella prova in esame è stato verificato che il vino trattato con MEX-WY1 aveva una un'astringenza significativamente inferiore (38 contro 52) rispetto al controllo. Stesso effetto sull'SPI è stato confermato su due vinificazioni comparative di 80 hl su Sangiovese 2017, in cui i vini presentavano un quadro analitico ed un indice di polifenoli totale perfettamente comparabile (Fig. 7).

● Parallelamente alla riduzione dell'astringenza un altro aspetto interessante verificato nelle prove è stato il miglioramento della struttura e della texture (consistenza tattile) dei vini. In Fig. 8A è riportato un esempio dell'analisi sensoriale di un Cabernet Sauvignon 2016 (Paso Robles, Central Coast, California). In un test alla cieca condotto un panel esperto e istruito sulla valutazione dei parametri di struttura e texture è stata notata una tendenza significativa su 5 descrittori: freschezza, volume/rotondità, struttura tannica, concentrazione e lunghezza in bocca.

● Il meccanismo d'azione individuato in soluzione modello ha messo in luce che in condizioni reali di cantina oltre all'effetto sull'astringenza vi è un impatto anche su volume, struttura e corpo dei vini. Nella stessa prova, dopo la fermentazione malolattica, è stata misurata un'assorbanza a 520 nm più elevata nella tesi trattata ed una minor perdita della componente rossa del colore (Fig. 8B).

● A livello aromatico i vini trattati con il lievito autolisato MEX-WY1 sono stati giudicati comparabili al controllo e riconducibili alle caratteristiche originarie del vitigno. In alcune prove sono state notate delle differenze positive sui descrittori "frutta matura" e "vegetale". In un Cabernet Sauvignon 2016 (IFV Bordeaux, Francia), un panel di degustatori professionisti

Fig. 6 - Valutazione di alcuni parametri inerenti la composizione polifenolica in una prova comparativa su Croatina 2016 (Lombardia), analisi a 6 mesi dalla vinificazione. Aggiunta di 20 g/hl di lievito autolisato MEX-WY1 ad inizio macerazione in confronto con un controllo senza aggiunta.

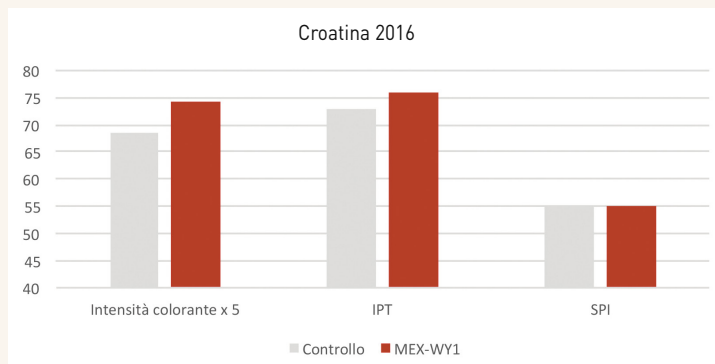


Fig. 7 - Indice di precipitazione salivare (SPI) misurato su prove comparative di Grenache 2016 (Francia, Côtes du Rhône) e Sangiovese 2017 (Toscana). Vinificazioni con aggiunta di 30 g/hl di lievito autolisato MEX-WY1 ad inizio macerazione in confronto con un controllo senza aggiunta.

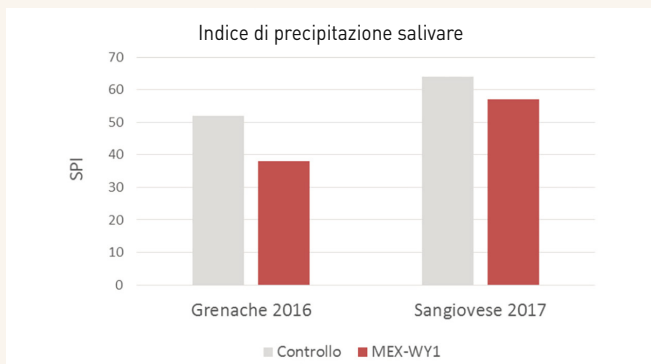
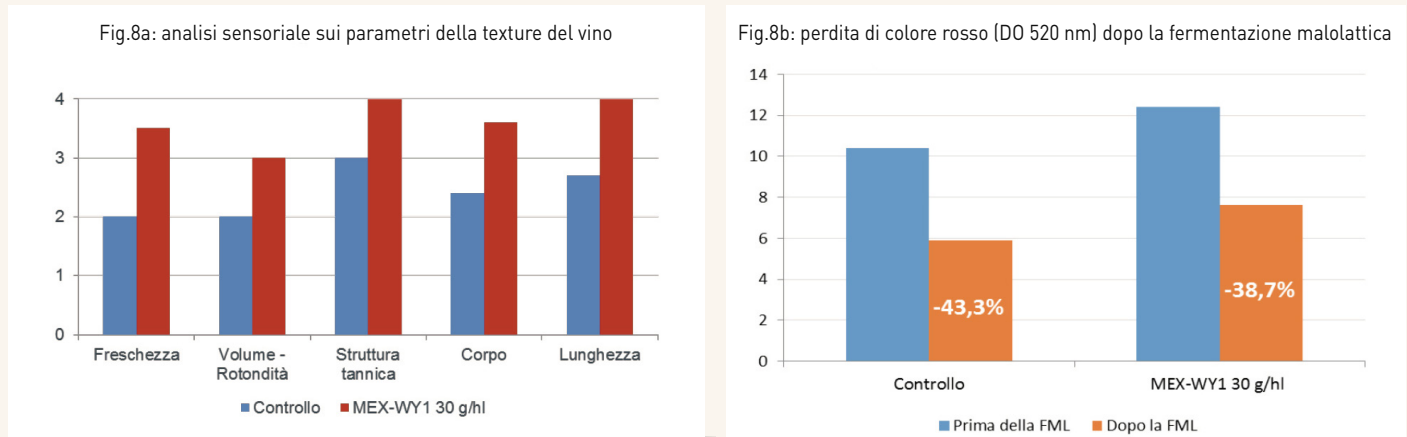


Fig. 8a e 8b - Risultati dell'analisi sensoriale condotta da un panel di esperti ed evoluzione del colore rosso su due Cabernet Sauvignon 2016 (Paso Robles, California). Vinificazione con aggiunta di 30 g/hl di lievito autolisato MEX-WY1 ad inizio macerazione in confronto con un controllo senza aggiunta.



ha individuato una differenza significativa nel descrittore "frutta matura" a favore del vino trattato con MEX-WY1 (intervallo di confidenza del 10%). Il vino controllo è stato considerato leggermente più vegetale del trattato, il quale presentava anche degli aromi di frutta a bacca rossa/nera ed una persistenza più marcati (**Fig. 9**).

CONCLUSIONI

- Recenti studi hanno permesso di comprendere meglio alcune interazioni tra lievito e composti fenolici nella vinificazione in rosso, permettendo una caratterizzazione fisica e biochimica di un ceppo con caratteristiche enologiche peculiari. Questo lievito, prodotto in forma di lievito autolisato (MEX-WY1, nome commerciale OPTI-MUM RED™), nei test su mosto e vino modello ha confermato il coinvolgimento della frazione mannoproteica solubile nella formazione di complessi in grado di contribuire alla stabilizzazione del colore e alla riduzione dell'astringenza.
- In condizioni reali di vinificazione il lievito autolisato MEX-WY1 è stato aggiunto ad inizio della macerazione confermando gli effetti positivi sulle caratteristiche organolettiche dei vini rossi con particolare riguardo a colore, struttura, corpo e minore astringenza.

Ringraziamenti. I risultati presentati in questo articolo sono frutto della collaborazione scientifica tra INRA/Montpellier, Supagro, LISBP/INSA Toulouse e Lallemand. Uno speciale ringraziamento va alle cantine che hanno collaborato alle sperimentazioni ed alla dottoranda Elissa Abi Habib.

BIBLIOGRAFIA

- Boulet J.C., Trarieux C., Souquet J.M., Ducasse M.A., Caille S., Samson A., Williams P., Doco T., Cheynier V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency, Food chemistry 190: 357-363.
- Escot S., M. Feuillat, L. Dulau, C. Charpentier. (2008). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. Australian Journal of Grape and Wine Research, 7(3): 153-159.
- McRae M., Kennedy J.A. (2011). Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research. Molecules 16: 2348-2364.
- Guadalupe, Z., Palacios A., and Ayestaran B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 4854-4862.
- Harbertson J., Kennedy J., Adams D. (2002). Tannins in skins and seeds of cabernet-sauvignon, syrah and pinot noir berries during ripening. American

- Journal of Enology and Viticulture, 53: 54-59.
- Mekoue Nguela J., Poncet-Legrand C., Siczkowski N., Vernhet A. (2016). Interactions of grape tannins and wine polyphenols with a yeast protein extract, mannoproteins and b-glucan. Food Chemistry 210: 671-82.
- Rinaldi A., Gambuti A., and Moio L. (2012). Application of the SPI (Saliva Precipitation Index) to the evaluation of red wine astringency, Food Chemistry 135 (4): 2498-2504
- Rodriguez M., Lezaun J., Canals R., Llaudy M. C., Canals J. M., Zamora F. (2005). Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. Food Science and Technology International, 11: 289-295.
- Rodriguez-Bencomo J.J., Ortega-Heras M., Perez-Magarino S. (2010). Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. European Food Research and Technology, 230: 485-496.
- Schiavone M., Siczkowski N., Castex M., Dague E., and François J. M. (2015). Effects of the strain background and autolysis process on the composition and biophysical properties of the cell wall from two different industrial yeasts, FEMS Yeast Res. Mar, 15(2).

Fig. 9 - Analisi sensoriale di un panel professionale sui descrittori aromatici di un Cabernet Sauvignon 2016 (IFV Bordeaux, Francia). Vinificazione con aggiunta di 30 g/hl di lievito autolisato MEX-WY1 ad inizio macerazione in confronto con un controllo senza aggiunta.

