

OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI VINIFICAZIONE PER MODULARE L'ESPRESSIONE TIOLICA DEL SAUVIGNON BLANC

La gestione biotecnologica di cantina è fattore rilevante nell'esaltazione dell'aroma tropicale dei vini. L'uso di enzimi di macerazione ha aumentato la concentrazione di precursori nel mosto e determinato un aumento delle molecole aromatiche nel vino. L'apporto di un attivante di fermentazione ha incrementato la capacità del lievito di produrre i tioli associati alla tipicità del Sauvignon Blanc, in particolare del 4-mercapto-4-metilpentan-2-one.



Di
Tomás Román¹
Sergio Moser²
Salvatore Crimi³
Nicola Cappello⁴
Loris Tonidandel⁵
Giorgio Nicolini⁶

Centro di Trasferimento Tecnologico
Fondazione Edmund Mach

* autore corrispondente:
tomas.roman@fmach.it

INTRODUZIONE

● Le caratteristiche olfattive definiscono in maniera importante la qualità sensoriale del vino. Queste sono ancora più importanti nei vini bianchi per i quali la pulizia, l'intensità e il profilo aromatico sono elementi indispensabili che non solo determinano in buona misura la piacevolezza, ma contribuiscono anche alla tipicità dei vini varietali.

● L'espressione dell'aroma nei vini gio-

vani si può ricondurre *in primis* all'interazione tra la cultivar e le condizioni pedoclimatiche nella zona di produzione.

● Queste ultime, congiuntamente agli interventi agronomici, regolano il biochimismo della vite e caratterizzano la composizione dell'uva e la concentrazione di metaboliti secondari che sono in grado di influire sulla qualità aromatica dei vini in modo più o meno evidente.

● Ciò è ben noto agli enologi, i quali sono sempre alla ricerca dell'espressione

aromatica che meglio si attaglia alla tipologia di vino ricercato e vedono come, anno dopo anno, le uve provenienti da determinate sottozone o vigneti portino a vini con caratteristiche aromatiche più o meno marcate.

● Tra le diverse famiglie di composti delle uve che - in maniera diretta o indiretta - influiscono sull'aroma dei vini in ragione della loro quantità e tipologia, si possono ricordare gli amminoacidi, i norisoprenoidi, i terpeni, le pirazine e i tioli

Tab.1 -Composizione dei mosti prima e dopo macerazione (valori medi, n=3). All'interno dello stesso lotto, valori medi dei parametri analitici contraddistinti da diversa lettera minuscola sono statisticamente differenti (p<0.05)

Lotto	Momento	°Brix	Zuccheri riduttori (g/L)	pH	Acidità totale (g/L)	Acido tartarico (g/L)	Acido Malico (g/L)	Potassio (g/L)	APA	GSH-3MH	Cys-3MH	Cys-4MMP
Controllo	Prima	21,82	220	2,99	7,7	6,15	3,74	1,15	119	114 b	38 b	8
	Dopo	21,50	216	3,20	6,8	5,53	2,93	1,60	113	190 a	56 a	10
Enzimato	Prima	21,61	218	3,02	7,5	6,28	3,50	1,16	106	121 b	35 b	8
	Dopo	21,57	217	3,19	6,8	5,87	2,97	1,60	106	204 a	64 a	10

varietali, classi di molecole che in buona parte si esprimono grazie e dopo la fermentazione alcolica.

● Sebbene la qualità potenziale di un vino si crei in vigneto, è anche vero che la capacità di comprendere e rendere esplicita questa potenzialità è in mano agli enologi i quali, attraverso l'applicazione delle diverse tecniche e tecnologie, riescono ad esprimere le caratteristiche del vino anche sulla base del necessario compromesso qualitativo ed economico del processo.

● Una porzione non indifferente dei composti sopra citati è localizzata nelle cellule della buccia, dal che si può facilmente dedurre come i meccanismi mirati alla loro estrazione nei mosti siano un elemento imprescindibile per l'espressione aromatica. Questo è di particolare importanza per i composti tiolici, molecole solforate estremamente odorose che caratterizzano l'aroma di alcune varietà, fra cui la più nota è il Sauvignon Blanc (Lund *et al.* 2009), ma che completano il profilo aromatico anche di altri vini.

● È il caso, ad esempio, del Traminer aromatico il quale, seppur fortemente caratterizzato dalla componente terpenica, si giova della presenza di tioli che ne aumentano la tipicità (Roman *et al.* 2018). I tioli varietali non sono presenti nell'uva in forma libera bensì legati ad alcuni composti, di cui i più importanti e noti sono il glutatone e la cisteina. La rivelazione di questi aromi richiede il necessario intervento del lievito il quale, grazie al *pool* enzimatico specifico di alcuni ceppi, riesce a liberare le molecole odorose.

● Le attuali conoscenze dei biochimismi permettono di spiegare l'origine solo del 50% dei tioli volatili riscontrati nel vino (Bonnafox *et al.* 2018). In attesa che la ricerca in questo campo completi i tasselli

mancanti, due aspetti rilevanti nella gestione pratica in cantina sono comunque noti: la correlazione con la concentrazione di precursori nel mosto e l'interdipendenza dei meccanismi di liberazione o di formazione con alcune delle vie di metabolizzazione dell'azoto da parte del lievito.

● Si è quindi voluto indagare in questa sede l'effetto di due interventi enologici sull'espressione tiolica del Sauvignon Blanc. Il primo, a livello di mosti, riguarda l'impatto sui precursori in relazione ad una macerazione realizzata con l'uso di enzimi espressamente sviluppati per migliorare i processi estrattivi dalle bucce.

● Il secondo riguarda la possibilità di modulare l'aroma tiolico dei vini attraverso la nutrizione azotata del lievito, valutando anche l'interazione fra le due opzioni tecnologiche.

MATERIALI E METODI

Uso di enzimi di macerazione

● Una partita di circa 600 Kg di Sauvignon Blanc è stata suddivisa in 2 lotti da 300 Kg, randomizzando l'uva grappolo a grappolo in modo da garantire l'omogeneità fra i lotti, operazione necessaria ai fini della sperimentazione data l'elevata variabilità compositiva che si riscontra anche all'interno dello stesso vigneto.

● Ciascun lotto è stato pigiadiraspato e la frazione liquida è stata campionata in triplicato per l'analisi dei parametri qualitativi di base e dei precursori tiolici del 3-mercaptoesan-1-olo (3MH) e del 4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4MMP) legati al glutatone (GSH-) o alla cisteina (Cys-).

● La macerazione è stata condotta per 16 h in presenza di una leggera solfitazione (30 mg/Kg) per limitare lo sviluppo

di microflora spontanea indesiderata in condizioni controllate di temperatura (12°C) e al riparo dell'ossigeno mediante copertura con CO₂.

● Uno dei lotti (enzimato) è stato previamente trattato con pectolitici da macerazione (Rapidase Expression Aroma, Oenobrand) alla dose di 3 g/100 Kg di pigiadiraspato.

● Alla fine della macerazione, sia il lotto enzimato che il relativo controllo non enzimato sono stati pressati fino al raggiungimento di una resa del 70% (p/p) e i mosti sono stati messi in decantazione statica a 4°C per 16 ore. La sfeccatura è stata realizzata allo stesso livello di torbidità (200 NTU) e i mosti illimpiditi sono stati campionati nuovamente in triplicato per l'analisi dei precursori tiolici.

Uso di attivanti di fermentazione

● Entrambi i mosti (controllo ed enzimato) sono stati successivamente suddivisi in 6 aliquote da 18 L ciascuna: 3 ripetizioni senza aggiunta di attivanti di fermentazione (No APA) e altre 3 cui sono stati addizionati 30 g/hL di lisato di lievito (APA; Natuferm Brigh, 30 g/hL, Oenobrand), per un totale di 12 processi fermentativi.

● I mosti sono stati inoculati (Fermivin TS28, 20 g/hL) dopo opportuna reidratazione dei lieviti a 37°C per 30 min. Il decorso fermentativo è stato monitorato rifrattometricamente mediante misura dei solidi solubili (°Brix).

● Al 4° giorno di fermentazione è stata realizzata un'aereazione del mosto mediante un travaso all'aria del 30% della massa. I vini a fine fermentazione alcolica sono stati analizzati per valutare il contenuto di composti aromatici di origine fermentativa e di tioli varietali in forma libera.

Metodi analitici e statistici

- L'analisi dei precursori tiolici nei mosti è stata realizzata in UHPLC-MS/MS alle condizioni proposte da Larcher *et al.* (2013). Per la quantificazione delle molecole libere si è applicato l'approccio LC-MS/MS proposto dagli stessi autori (Larcher *et al.* 2015) mentre la componente volatile di origine fermentativa è stata analizzata in GC-MS/MS secondo quanto riportato da Paolini *et al.* (2018).
- L'elaborazione dei dati è stata realizzata con le procedure del pacchetto software STATISTICA v. 13.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA), analizzando le differenze fra le varianze (ANOVA) mediante il test HSD di Tuckey ($p < 0.05$)

RISULTATI E DISCUSSIONE

Uso di enzimi di macerazione

- La **Tab.1** riporta la composizione media ($n=3$) dei parametri di controllo qualitativo del mosto e dei precursori tiolici prima e dopo la macerazione prefermentativa nelle due situazioni di macerazione: senza enzima, ossia il controllo, e di macerazione con enzima.
- Per quanto riguarda la frazione liquida del pigiadiraspato, precedentemente alla macerazione nessuna differenza statisticamente significativa si è trovata tra il lotto

“enzimato” e il lotto di “controllo”, a conferma dell'adeguata omogeneità ottenuta grazie alla separazione iniziale dell'uva grappolo per grappolo, presupposto per la corretta valutazione di ogni successivo intervento tecnologico.

- La macerazione prefermentativa - con o senza ausilio dell'enzima - ha portato alle note conseguenze derivanti dall'estrazione dalle bucce; ossia, principalmente, incremento del pH e del potassio e abbassamento dei parametri di acidità, benché la differenza tra i due momenti (prima, dopo) debba essere qui intesa - alla luce delle modalità di campionamento - come sommatoria dell'effetto di estrazione dovuto alla sola fase di macerazione più quello dovuto alla pressatura.

- Relativamente ai precursori dei tio- li varietali, in nessun campione è stata riscontrata la presenza di GSH-4MMP. Quanto agli altri precursori, nel lotto di controllo non enzimato la macerazione ha permesso di incrementare significativamente la concentrazione di GSH-3MH (~67%) e Cys-3MH (~49%) e, tendenzialmente, quella del Cys-4MMP (~29%).

- Nel caso della macerazione in presenza di enzimi, i precursori del 3MH sono ulteriormente accresciuti in media rispettivamente del ~8% e del ~42% rispetto a quanto ottenuto senza enzimi; il Cys-4MMP invece non è stato influenzato dall'utilizzo dell'enzima, forse per la maggior presenza di questo precursore nella polpa come riportato

da Peyrot des Gachons *et al.* (2002).

- Su base molare (**Fig.1**), gli enzimi pectolitici di macerazione hanno complessivamente incrementato la somma dei precursori del 68% circa rispetto a quanto misurato nella frazione liquida appena dopo pigiadiraspatura e del ~18% rispetto alla macerazione in assenza di coadiuvanti.

L'utilizzo di attivanti di fermentazione

- I due mosti (controllo ed enzimato) ottenuti dopo macerazione sono stati fatti fermentare separatamente realizzando per ciascuno di essi, in triplicato, una tesi addizionata di azoto assimilabile (APA) in confronto col controllo non addizionato (No APA).

- I dati del decorso fermentativo (**Fig. 2**) mostrano come le performance del lievito siano state condizionate principalmente dal trattamento con attivanti di fermentazione in forma organica. L'aggiunta di APA ha ridotto il tempo occorrente per il completamento della fermentazione alcolica ($p < 0.05$), valutato arbitrariamente al raggiungimento del 99% di essa, dalle 214 ore mediamente necessarie ($n=6$) nei mosti fermentati tale quale (No APA) alle 157 ore nei mosti aggiunti di APA.

- La diminuzione si è riscontrata sia nei mosti macerati di controllo (APA: 157 h; No APA: 218 h) che in quelli in cui sono stati applicati gli enzimi di macerazione (APA: 157 h; No APA: 210 h), senza differenze dovute alla modalità di gestione della macerazione.

- I dati acquisiti nel monitoraggio della fermentazione hanno consentito il calcolo della velocità massima (V_{max} ; $\Delta^\circ\text{Brix/gg}$), parametro correlabile con la biomassa di lievito prodotta durante il processo (Albertini *et al.* 2011). L'aggiunta di APA ha permesso, per entrambi i mosti di partenza, il raggiungimento di velocità massime (controllo: 4.68 $^\circ\text{Brix/gg}$; enzimato: 4.74 $^\circ\text{Brix/gg}$) più alte rispetto alle tesi non addizionate (controllo: 4.28 $^\circ\text{Brix/gg}$; enzimato: 3.94 $^\circ\text{Brix/gg}$), coerentemente con il maggior numero di cellule di lievito attive nelle fasi finali della fermentazione (dati non mostrati).

- I mosti addizionati di azoto organico hanno prodotto vini con contenuti di 3MH e 4MMP maggiori rispetto a quelli

Fig. 1 - Incremento medio della concentrazione nei mosti di precursori glutationilati (GSH-) e cisteinilati (Cys-) di 3-mercaptoesan-1-olo (3MH) e 4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4MMP) rispetto a quanto presente nella frazione liquida del pigiadiraspato in relazione all'aggiunta in fase di macerazione di enzimi pectolitici.

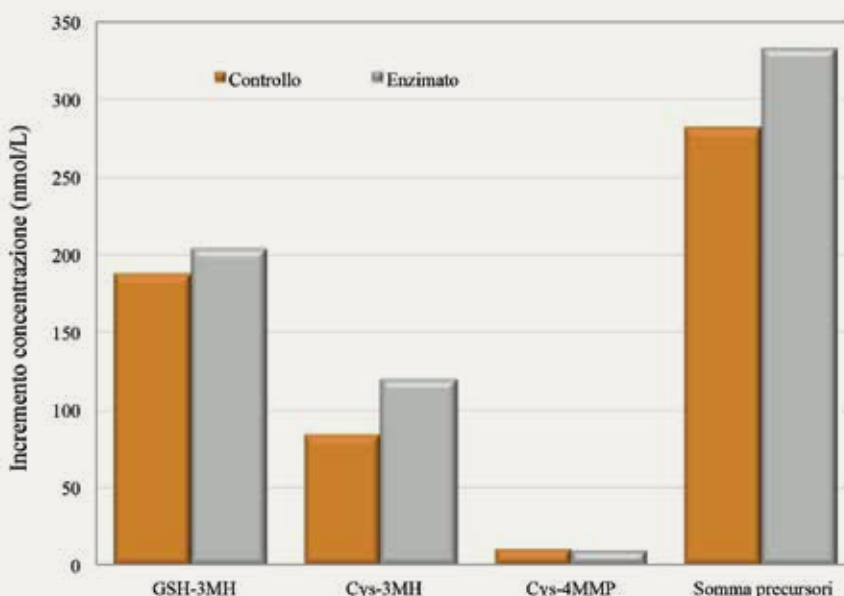
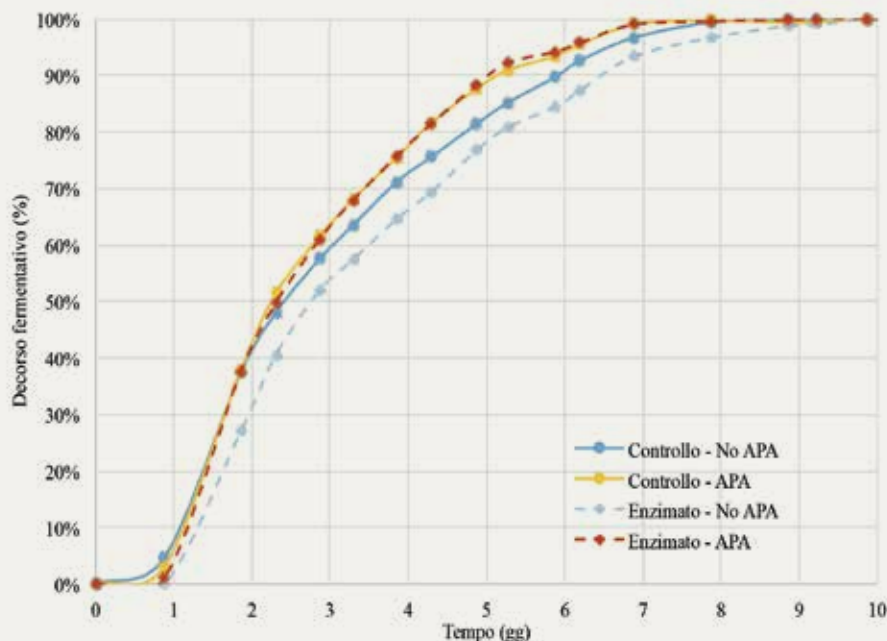


Fig. 2 - Decorso fermentativo medio (n=3) dei mosti macerati in assenza (linea piena) e in presenza di enzimi pectolitici (linea tratteggiata) in funzione dell'aggiunta (APA) o meno (No APA) di attivanti di fermentazione organici.



non addizionati (Fig.3) in entrambe le tipologie di mosto ottenute dall'originario approccio macerativo, con o senza enzima e diversamente dotati di precursori tiolici.

● L'utilizzo dell'attivante di fermentazione ha permesso di incrementare il contenuto di 3MH e di 4MMP rispettivamente del ~29% e ~299% nei vini ottenuti da mosti di controllo macerati senza enzimi, e del ~22% e ~225% in quelli macerati con enzimi.

notoriamente associati all'aroma fruttato, sono conseguenza del normale metabolismo del lievito e la loro produzione è molto influenzata dalla composizione del mosto e dalle condizioni di fermentazione (Masneuf-Pomarède *et al.* 2006; Nicolini *et al.* 2000a, 2002, 2011).

● Coerentemente con quanto riportato in letteratura (Nicolini *et al.* 2000b; Miller *et al.* 2007) l'aggiunta di composti di natu-

ra azotata ha influenzano in maniera più marcata la produzione degli acetati rispetto a quella degli esteri etilici.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

- Le osservazioni sperimentali hanno messo in risalto l'effetto positivo per l'aroma di alcune opzioni tecnologiche quali l'uso di enzimi pectolitici di macerazione e l'apporto di nutrienti azotati in forma di lisato; entrambe hanno agito positivamente sulle molecole responsabili dell'espressione varietale dei vini Sauvignon Blanc.
- La macerazione prefermentativa dell'uva è una fase ben nota agli enologi che mira all'estrazione di molecole presenti nella buccia per esaltare l'aroma dei vini varietali.
- Questo processo risulta critico durante il periodo di raccolta sia per il volume che occupa nel momento di maggior intensità di lavoro che in termini economici per la necessità di mantenere refrigerate le masse in lavorazione. I due fattori spesso condizionano il tempo di contatto delle bucce col mosto, e non quello teorico necessario per raggiungere gli obiettivi enologici.
- Il processo non è tuttavia esente di rischi che sono prevalentemente legati allo sviluppo di microflora spontanea indesiderata. Al di là di aumentare la resa di estrazione o ridurre i tempi di contatto per un determinato obiettivo enologico, gli en-

Ottimizzazione del processo i vinificazione

● Valutando i processi fermentativi nel loro complesso – enzima di macerazione più attivante di fermentazione – si può rilevare come l'utilizzo di entrambi gli ausili biotecnologici abbia incrementato nel vino la concentrazione di 3MH del 51% e addirittura del 261% per il 4MMP rispetto al protocollo in assenza di entrambi; aumenti che equivalgono rispettivamente a 2 e a 16 unità di flavour.

● Gli incrementi non si sono limitati alle sole molecole responsabili delle sensazioni da frutta tropicale poiché anche la concentrazione degli acetati degli alcoli superiori (+75%) e quella degli esteri etilici degli acidi grassi (+21%) è stata favorita dall'uso dei coadiuvanti enologici (Fig. 4). Tali composti di origine fermentativa,

Fig. 3 - Concentrazione di 3-mercaptoesan-1-olo (3MH) e 4-mercapto-4-metilpentan-2-one (4MMP) nei vini ottenuti da mosti macerati in assenza (Controllo) o in presenza (Enzimato) di enzimi pectolitici in funzione dell'aggiunta (APA) o meno (No APA) di attivanti di fermentazione. Lettere diverse indicano risultati statisticamente differenziati ($p < 0.05$)

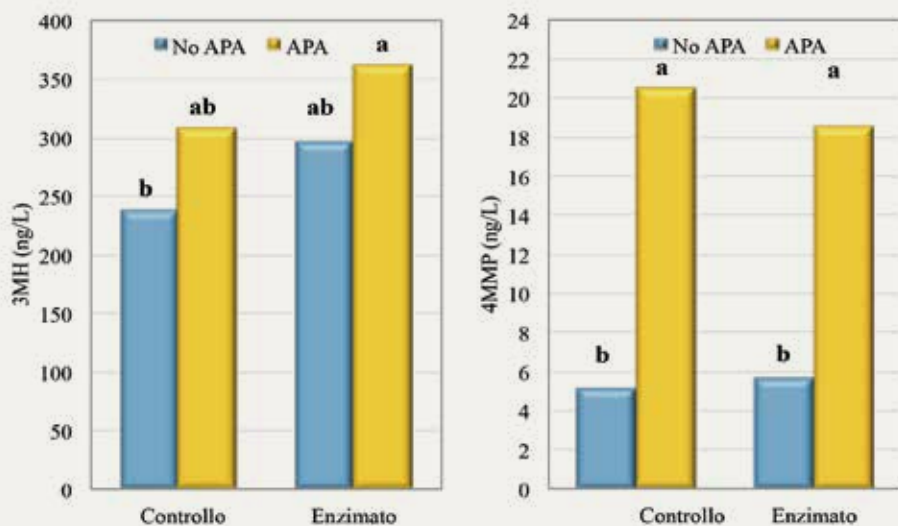
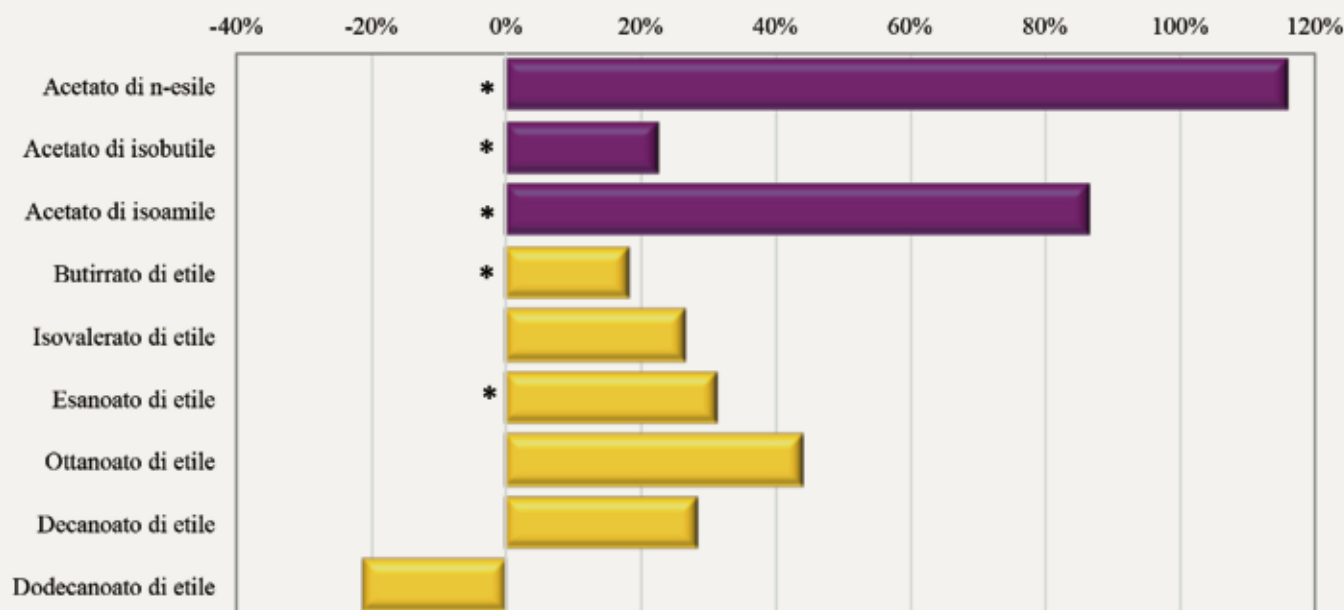


Fig. 4 - Variazione media percentuale (n=3) della concentrazione di acetati degli alcoli superiori (■) e degli esteri etilici degli acidi grassi (■) fra i processi gestiti con l'ausilio biotecnologico di coadiuvanti enologici (Enzimato + APA) o in assenza (Controllo + No APA). * indica differenze statistiche significative fra i processi.



zimi pectolitici di macerazione si sono comunque dimostrati un utile strumento per l'esaltazione dei composti della specifica famiglia dei tioli varietali.

- I risultati della sperimentazione permettono altresì di dimostrare come anche un intervento tecnologico relativo alla gestione azotata dei mosti in fermentazione consenta di aumentare i composti tiolici responsabili di sentori tropicali e di bosso. Questo è risultato particolarmente evidente per il 4MMP, composto che caratterizza i vini Sauvignon Blanc e la cui soglia di percezione organolettica è appena 1 ng/L.
- L'aggiunta di lisato nel mosto si è tradotta in un aumento medio di ben ~15 unità di flavour tutto ciò grazie naturalmente anche all'uso congiunto di un lievito capace di liberare specificatamente il 4MMP oltre che di liberare e/o formare 3MH.
- L'insieme degli interventi biotecnologici applicati ha permesso di arricchire in maniera evidente l'intensità e la complessità aromatica dei vini non solo per quanto riguarda i tioli, ma anche relativamente all'incremento degli altri composti fermentativi associati alle note fruttate. ■

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Pietro Azzolini, Marco Colapietro e Mario Malacarne per il supporto nella preparativa dei campioni e nell'analisi dei mosti e dei vini.

BIBLIOGRAFIA

- Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., & Sicard, D. (2011). Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(8), 2772-2784.
- Bonnafeux, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chem*, 268, 126-133.
- Larcher, R., Tonidandel, L., Villegas, T. R., Nardin, T., Fedrizzi, B., & Nicolini, G. (2015). Pre-fermentation addition of grape tannin increases the varietal thiols content in wine. *Food Chem*, 166, 56-61.
- Larcher, R., Nicolini, G., Tonidandel, L., Román Villegas, T., Malacarne, M. & Fedrizzi, B. (2013). Influence of oxygen availability during skin-contact maceration on the formation of precursors of 3-mercaptohexan-1-ol in Müller-Thurgau and Sauvignon Blanc grapes. *Aust J Grape Wine R*, 19(3), 342-348.
- Lund, C. M., Thompson, M. K., Benkwitz, F., Wohler, M. W., Triggs, C. M., Gardner, R., Hildgarde, H. & Nicolau, L. (2009). New Zealand Sauvignon blanc distinct flavor characteristics: Sensory, chemical, and consumer aspects. *Am J Enol Vit*, 60(1), 1-12.
- Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M. L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Int J Food Microbiol*, 108(3), 385-390.
- Miller, A. C., Wolff, S. R., Bisson, L. F., & Ebeler, S. E. (2007). Yeast strain and nitrogen

supplementation: Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations. *Am J Enol Vit*, 58(4), 470-483.

- Nicolini, G., Volonterio, G., Larcher, R., Moser, S., & Dalla Serra, A. (2000a). Prestazioni fermentative ed aromatiche di lieviti sudafricani di recente immissione in Italia. *L'Enotecnico*, 36(4), 87-94.
- Nicolini, G., Mocchiutti, R., Larcher, R., & Moser, S. (2000b). Lieviti ed aromi dei vini: comparazione tra ceppi commerciali di larga diffusione. *L'Enotecnico*, 36(3), 75-85.
- Nicolini, G., Volpini, A., Moser, S., & Cavazza, A. (2002). Caratteristiche fermentative ed aromatiche dei ceppi di lievito La Claire. *L'Enologo*, 38(10), 65-70.
- Nicolini, G., Moser, S., Román, T., Mazzi, E., & Larcher, R. (2011). Effect of juice turbidity on fermentative volatile compounds in white wines. *Vitis*, 50(3), 131-135.
- Paolini, M., Tonidandel, L., Moser, S., & Larcher, R. (2018). Development of a fast gas chromatography-tandem mass spectrometry method for volatile aromatic compound analysis in oenological products. *J Mass Spectr*, 53(9), 801-810.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: identification of S-3-[hexan-1-ol]-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J Agri Food Chem*, 50(14), 4076-4079;
- Román, T., Tonidandel, T., Larcher, R., Celotti, E., & Nicolini, G. (2018). Importance of polyfunctional thiols on semi-industrial Gewürztraminer wines and the correlation to technological treatments. *Eur Food R Tech*, 244(3), 379-386.