

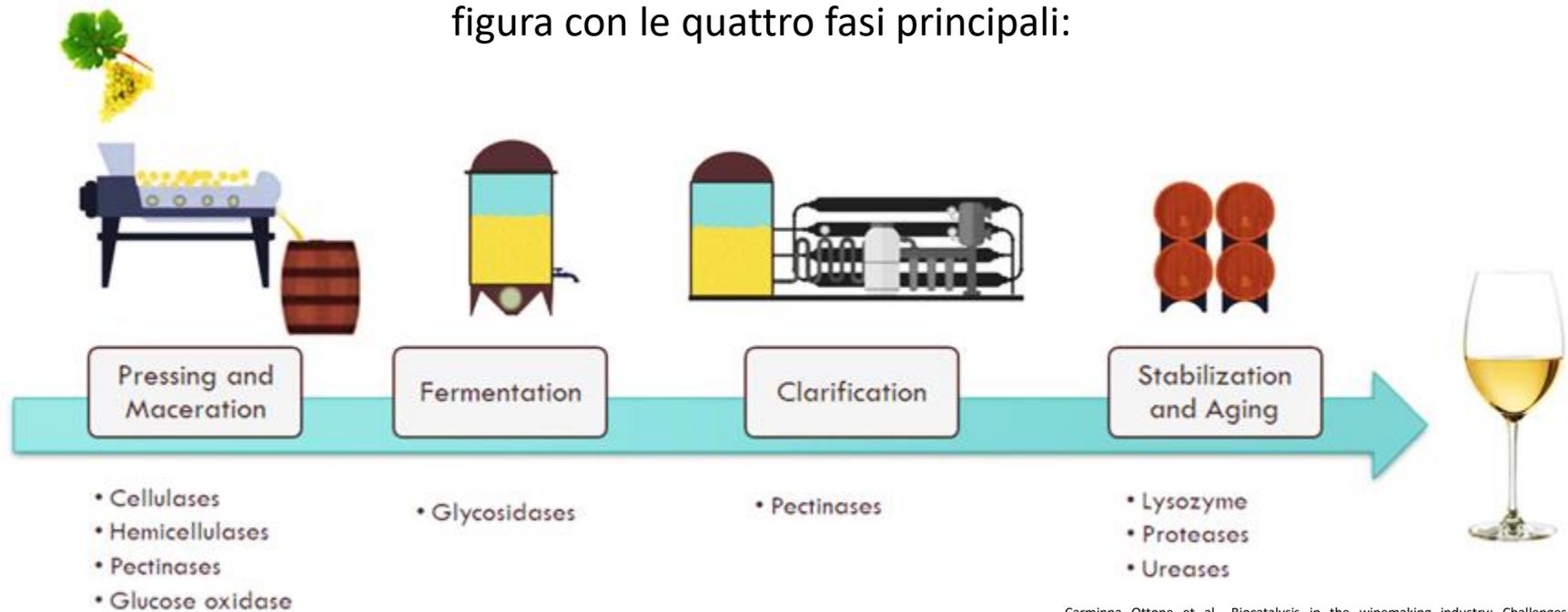


Enzimi coinvolti nel processo di vinificazione

Enzyme	Function
Grapes (<i>Vitis vinifera</i>)	
Glycosidases	Hydrolyse sugar conjugates of tertiary alcohols; inhibited by glucose; optimum pH 5-6.
Protopectinases	Produce water-soluble, highly polymerized pectin substances from protopectins.
Pectin methylesterases	Split methyl ester groups of polygalacturonic acids, release methanol, convert pectin to pectate; thermo-stable; opt. pH 7-8.
Polygalacturonases	Hydrolyse α -D-1,4-glycosidic bonds adjacent to free carboxyl groups in low methylated pectins and pectate; optimum pH 4-5.
Pectin lyases	Depolymerise highly esterified pectins.
Proteases	Hydrolyses peptide bonds between amino acid residues of proteins; inhibited by ethanol; thermo stable; optimum pH 2.
Peroxidases	Oxidation metabolism of phenolic compounds during grape maturation; activity limited by peroxide deficiency and SO ₂ in must.
Bacterial (<i>Lactic acid bacteria</i>)	
Malolactic enzymes	Convert malic acid to lactic acid.
Esterases	Involved in ester formation.
Lipolytic enzymes	Degrade lipids.

Enzyme	Function
Fungi (<i>Botrytis cinerea</i>)	
Glycosidases	Degrade all aromatic potential of fungal infected grapes.
Laccases	Broad specificity to phenolic compounds, cause oxidation and browning.
Pectinases	Saponifying and depolymerising enzymes, cause degradation of plant cell walls and grape rotting.
Cellulases	Multi-component complexes: endo-, exoglucanases and cellobiases; synergistic working, degrade plant cell walls.
Phospholipases	Degrade phospholipids in cell membranes.
Esterases	Involved in ester formation.
Proteases	Aspartic proteases occur early in fungal infection, determine the rate and extent of rotting caused by pectinases; soluble; thermo stable.
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
β -Glucosidases	Some yeast produce β -glucosidases which are not repressed by glucose.
β -Glucanases	Extra cellular, cell wall bound and intracellular, glucanases; accelerate the autolysis process and release mannoproteins.
Proteases	Acidic endoprotease A accelerates the autolysis process.
Pectinases	Some yeast degrade pectic substances to a limited extent; inhibited by glucose levels < 2%.

Enzimi utilizzati nel processo di vinificazione schematizzato nella figura con le quattro fasi principali:



Carminna Ottone et al., Biocatalysis in the winemaking industry: Challenges and opportunities for immobilized enzymes. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19:595–621

FIGURE 1 Diagram of the main steps in the winemaking process

- 1) Le uve vengono pigiate con lo scopo di estrarre la maggior quantità di succo possibile per la formazione del mosto. In questo stadio l'uso di enzimi è consigliato come una fase di pretrattamento che precede la vinificazione.
- 2) all'inizio della fermentazione alcolica, si ottengono le principali caratteristiche specifiche del vino; in questa fase c'è il rilascio dell'aroma che può essere potenziato mediante l'uso di alcuni enzimi specifici.
- 3) Il passaggio di chiarificazione ha lo scopo di ridurre la torbidità e la viscosità del vino, nonché evitare problemi operativi come l'otturazione dei filtri per l'elevata concentrazione di polisaccaridi. L'aggiunta di enzimi facilitano il processo di chiarifica e filtrazione.
- 4) Le operazioni di invecchiamento e stabilizzazione mirano ad ottenere le proprietà fisico-chimiche del prodotto finale, che può essere migliorata mediante l'uso di enzimi appropriati.

Gli enzimi aggiunti durante le fasi di estrazione e macerazione del vino hanno quattro obiettivi principali:

- Aumentare dell'attività antiossidante;
- Estrarre i precursori aromatici;
- Estrarre il colore;
- Controllare la gradazione alcolica.

Durante l'estrazione e la macerazione del mosto, gli enzimi cellulasi ed emicellulasi facilitano la rottura della cellulosa delle cellule dell'uva mentre, le pectinasi degradano i polisaccaridi strutturali che ostacolano l'estrazione del succo. Vengono rilasciati anche i principali componenti del colore del vino rosso. L'etanolo prodotto dalla fermentazione è fortemente correlato alla concentrazione di glucosio. Pertanto, per il controllo del contenuto di etanolo nel vino, viene regolata la concentrazione di glucosio nel mosto mediante l'aggiunta dell'enzima glucosio ossidasi (GOX; EC 1.1.3.4). La GOX ossida parte del glucosio nel mosto utilizzando l'ossigeno molecolare come accettore di elettroni:

Glucosio ossidasi



Tuttavia, si ottiene il perossido di idrogeno come sottoprodotto che può, a sua volta, ossidare altri componenti del vino, come i substrati fenolici. Per ridurre il H_2O_2 in acqua generalmente è inclusa nel mosto anche la catalasi (EC 1.11.1.6).

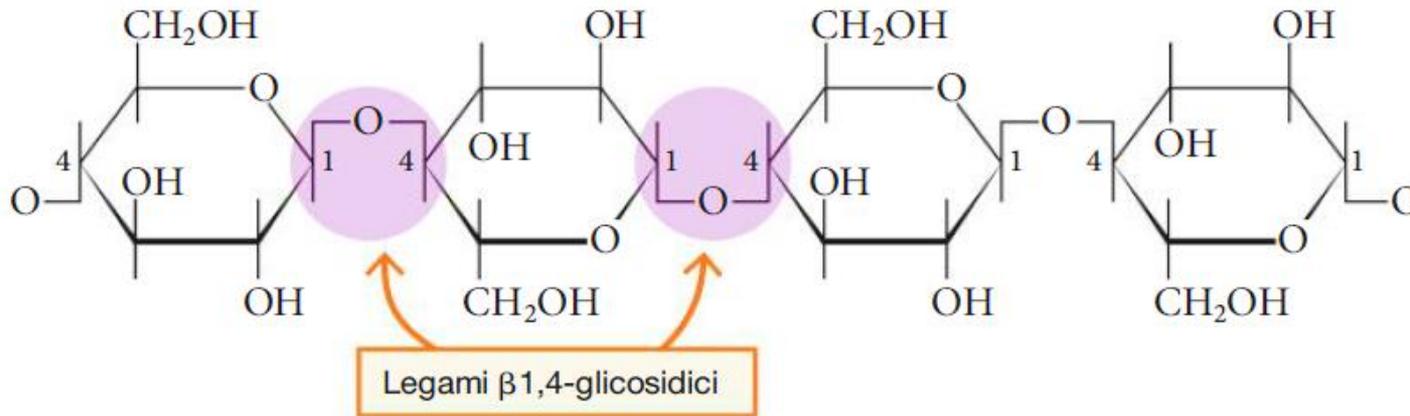


Enzimi dell'uva



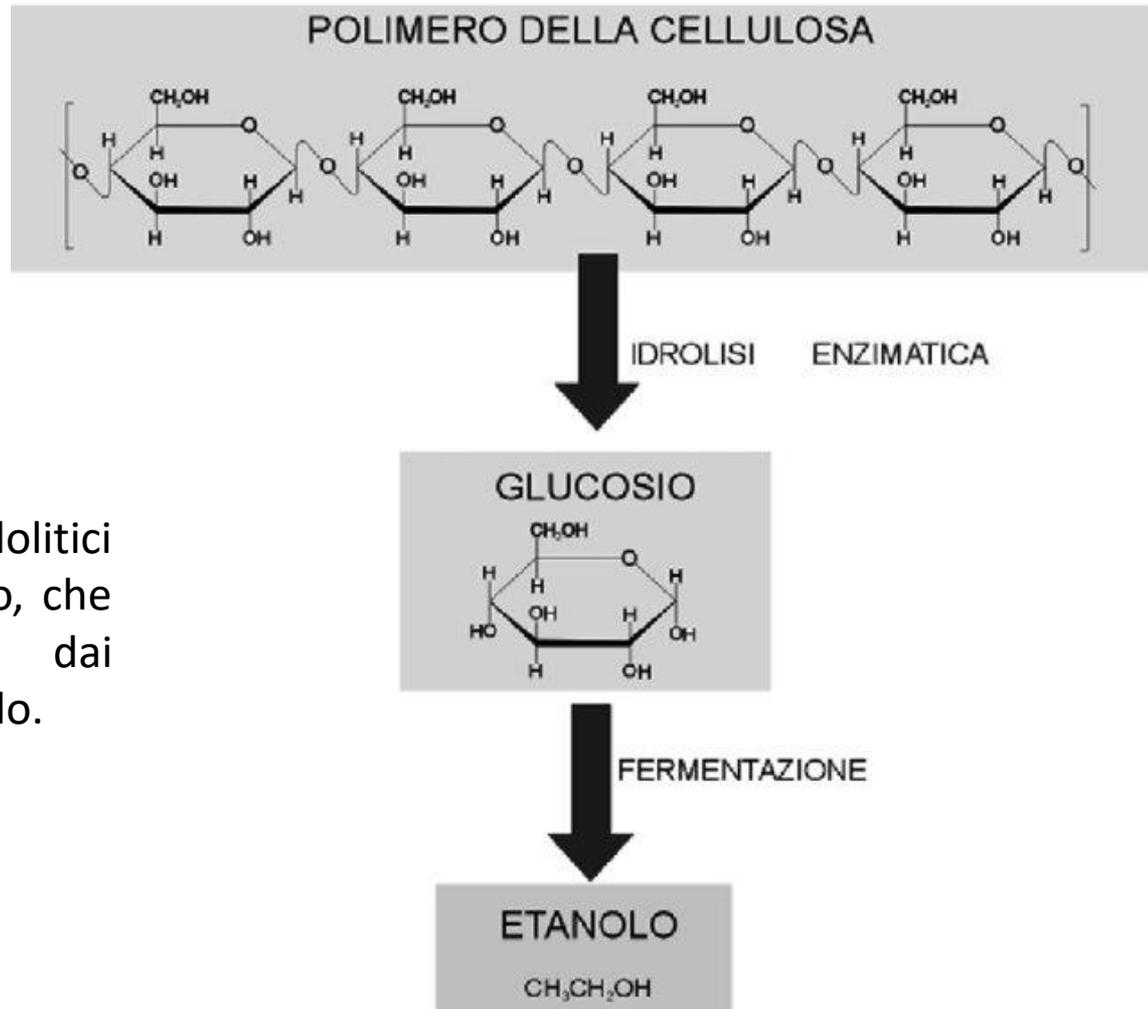
la cellulosa

La cellulosa è il principale costituente della parete delle cellule vegetali. È un omopolisaccaride insolubile costituito da numerose unità di β -D-glucosio unite fra loro con legami β 1,4-glicosidici a formare catene lineari, prive di ramificazioni.



I legami β -glicosidici della cellulosa possono essere idrolizzati dalla cellulasi prodotta da alcuni batteri e funghi

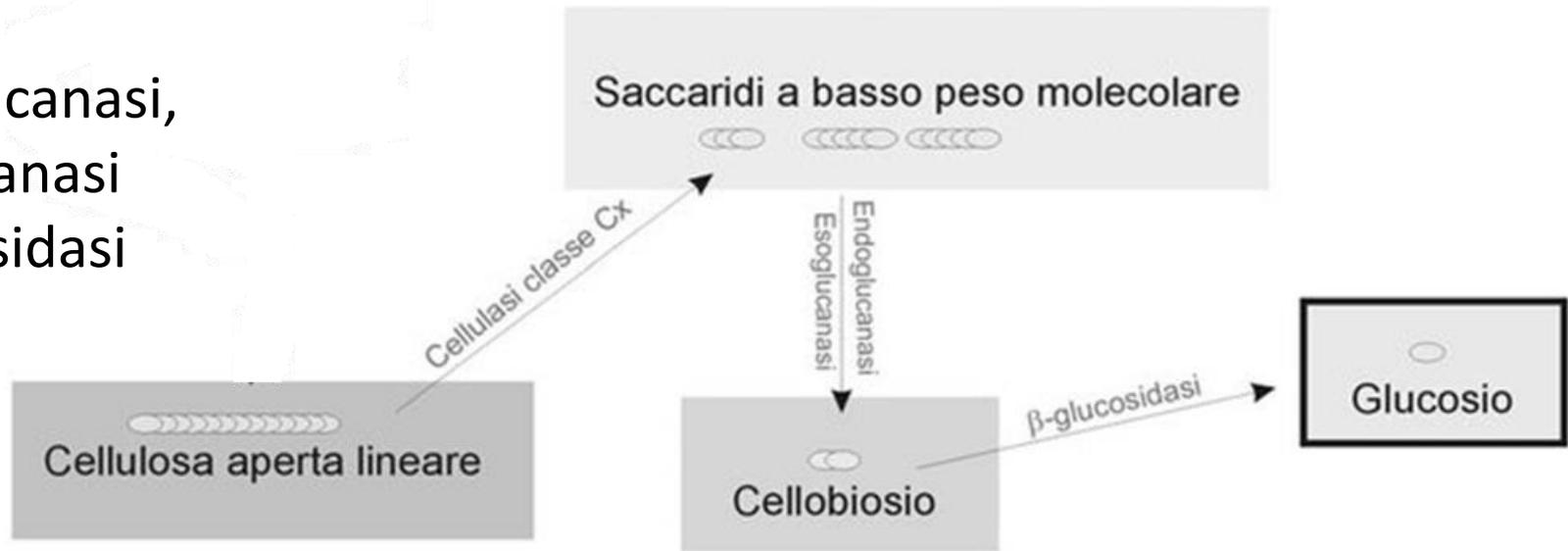
Schema del processo globale di trasformazione della cellulosa in etanolo.



L'azione dagli enzimi cellulolitici trasformano la cellulosa in glucosio, che a sua volta è metabolizzato dai microrganismi e convertito in etanolo.

La cellulasi è un insieme di enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi che scindono le catene di cellulosa per liberare le singole molecole di glucosio.

Endoglucanasi,
Esoglucanasi
 β -glucosidasi



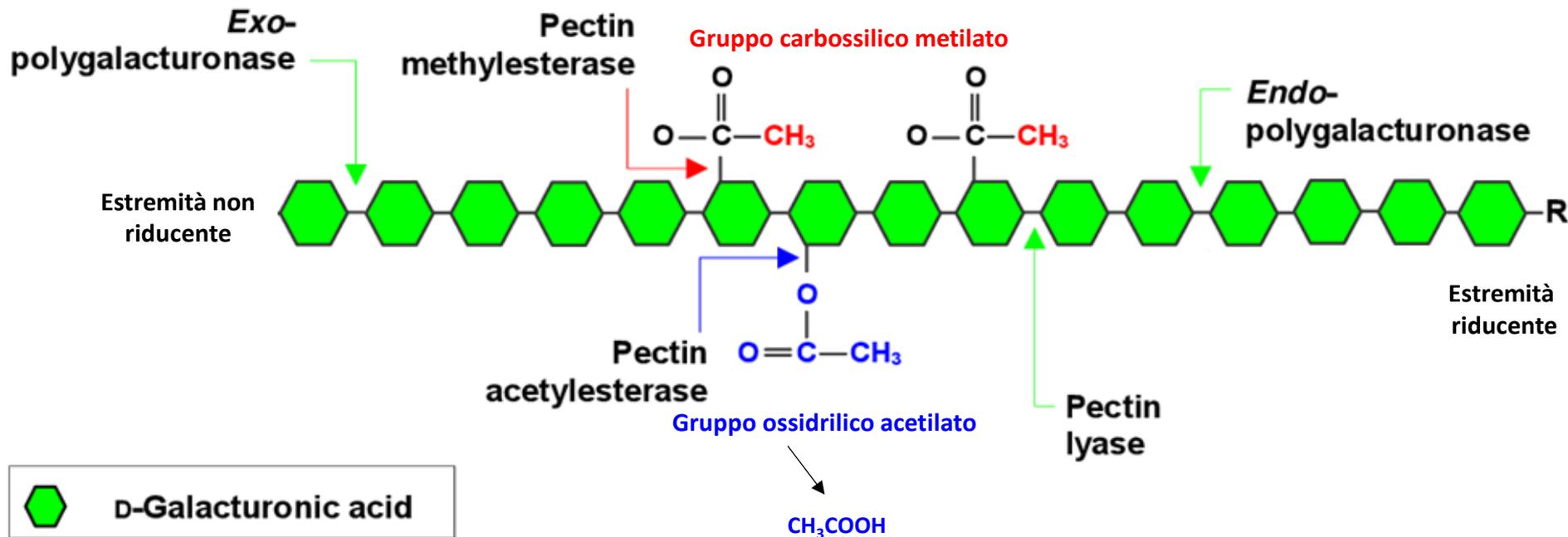
Esmeralda RICCI et al. Etanolo da biomasse lignocellulosiche.
«Produzione di etanolo da paglia di grano mediante
pretrattamento di steam explosion, idrolisi enzimatica e
fermentazione». Technical Report · May 2001 DOI:
10.13140/RG.2.1.1155.9925

Schema del meccanismo di idrolisi enzimatica della cellulosa: le catene lineari del polimero sono rese accessibili all'azione delle cellulasi di classe Cx (eso ed endoglucanasi), che producono cellobiosio. Quest'ultimo è convertito in glucosio dalle β -glucosidasi.

Pectinasi:

Fase pre-fermentativa: diversi enzimi sono coinvolti nell'attività di degradazione della pectina:

- **Poligalatturonasi (PG):** non riesce a scindere i legami dell'acido galatturonico quando i monomeri sono ancora metilati.
- **Pectinmetilesterasi (PME):** idrolizza i gruppi metossilici con rilascio di metanolo.
- **Pectiniasi (PL):** riesce a staccare le catene prima della demetilazione.
- **Pectinacetilesterasi (PAE):** scinde i residui di O-acetile (O-2 e/o O-3) dall'acido D-galatturonico con rilascio di acido acetico.

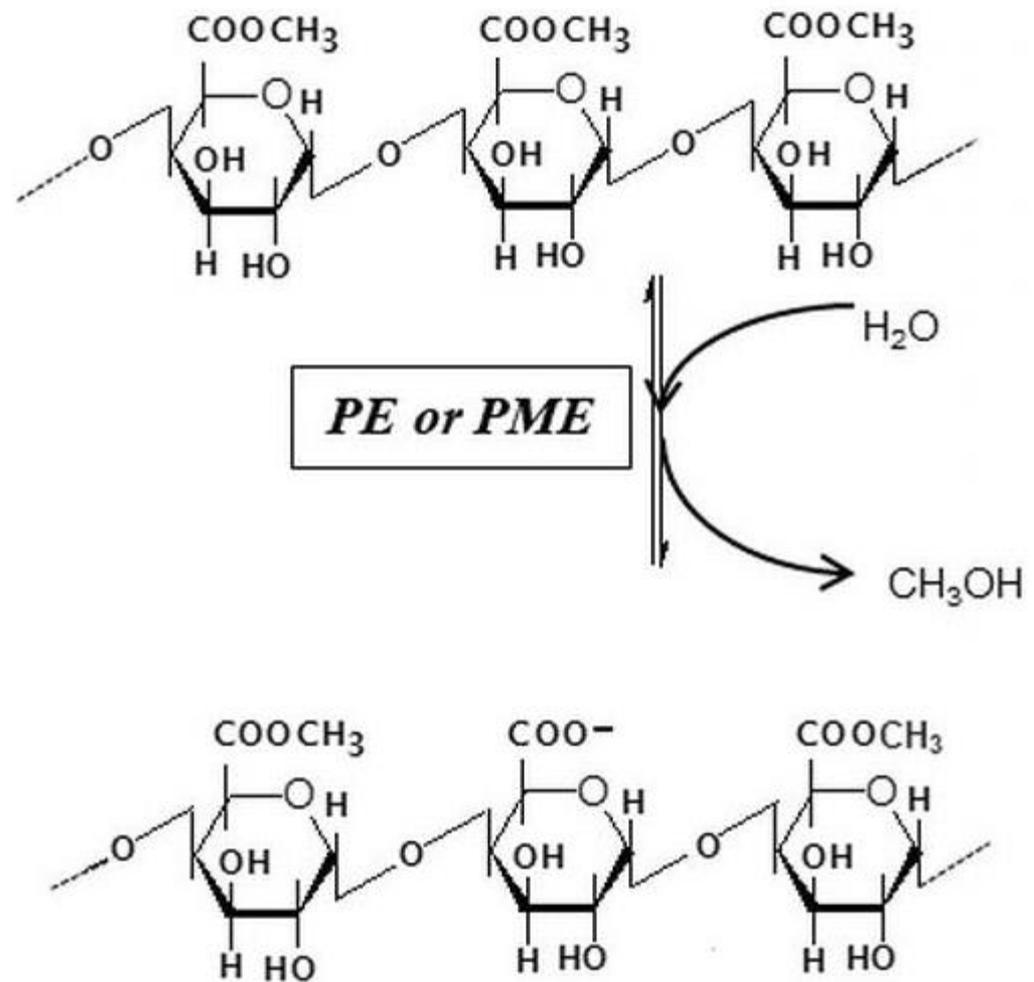


L'alcol metilico

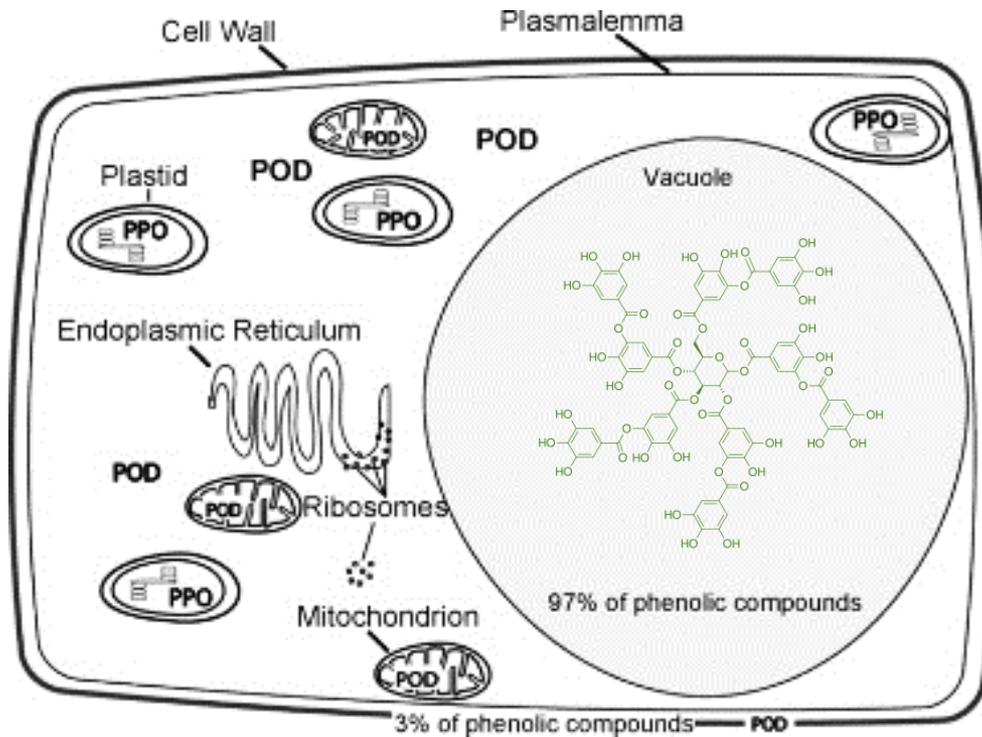
La pectinmetilesterasi catalizza l'idrolisi del legame estere tra il gruppo metossilico e il gruppo carbossilico dei residui di acido galatturonico nella struttura principale della pectina, rilasciando metanolo:



Dato che l'uva è un frutto relativamente povero in pectine, il vino è la bevanda fermentata a più basso contenuto di metanolo. Il contenuto in metanolo è funzione della durata della fermentazione in presenza delle parti solide dell'uva, in particolare delle bucce ricche in pectine; per questo i vini rossi ne sono più ricchi (152 mg/L) rispetto a quelli rosati (91 mg/L) e soprattutto i bianchi (63 mg/L).



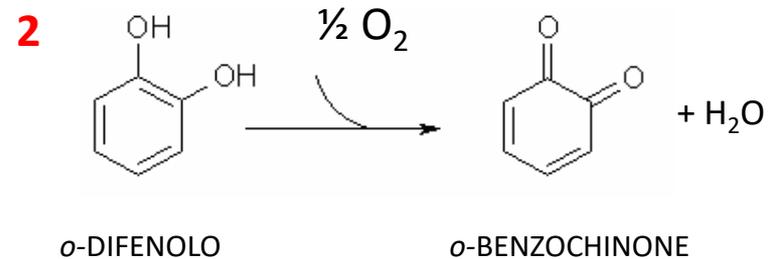
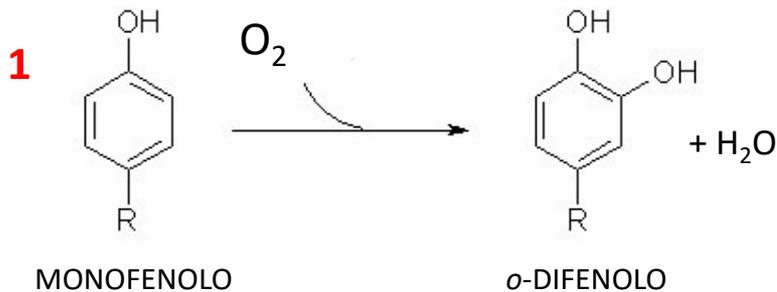
Polifenolossidasi



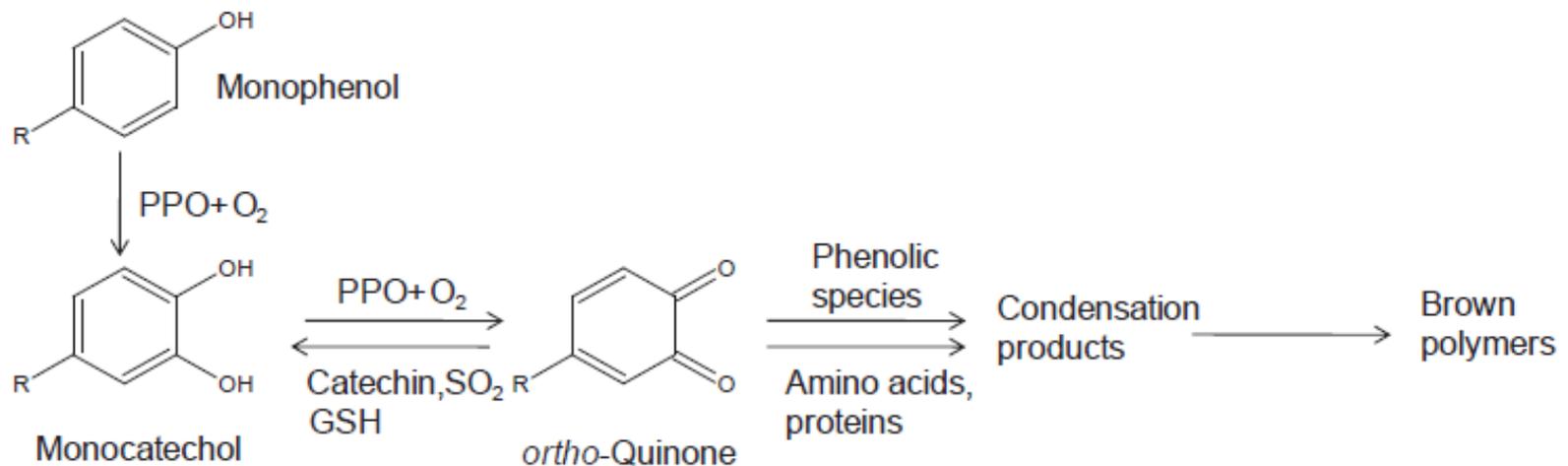
Compartimentazione interna e esterna di composti fenolici e della PPO in una cellula vegetale. POD: fenolo ossidasi; PPO: polifenolo ossidasi (da Toivonen & Brummell, 2008).

L'enzima catalizza due distinte reazioni coinvolte nell'ossidazione dei composti fenolici, in entrambe l'ossigeno molecolare è utilizzato come co-substrato:

1. o-idrossilazione dei monofenoli a o-difenoli definita come **attività cresolasica** (E.C.1.14.18.1), nota anche con il nome di monofenolo monossigenasi.
2. ossidazione degli o-difenoli a o-chinoni definita come **attività catecolasica** (E.C.1.10.3.1)



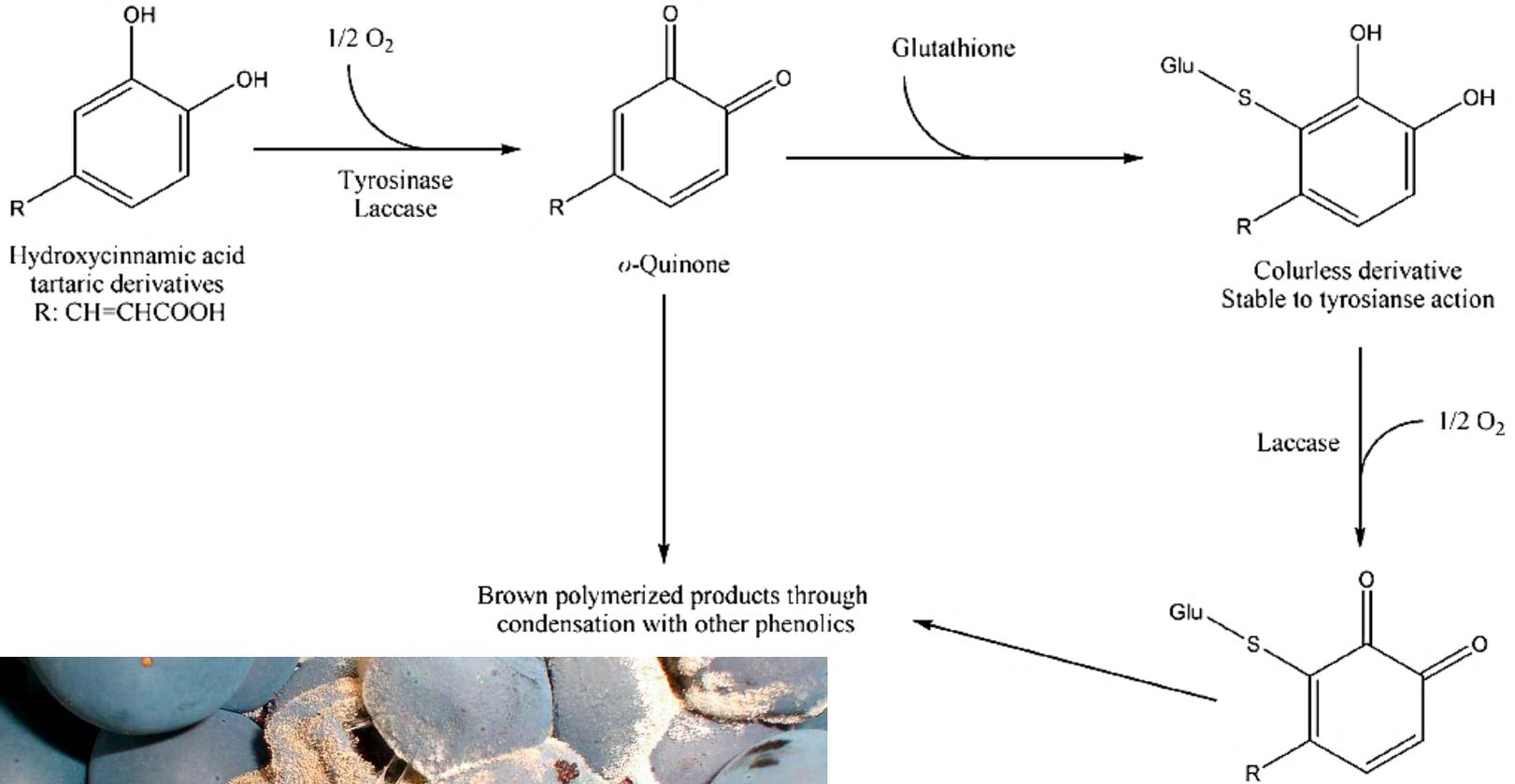
L'enzima PPO catalizza l'ossidazione dei composti mono fenolici, contenuti nelle cellule vegetali, in o-difenoli; questi ultimi sono ulteriormente ossidati a o-chinoni. Gli o-chinoni sono instabili ed esposti a nuove reazioni chimiche con amminoacidi e proteine, condensa con loro per dare origine a pigmenti bruni.



Enzymatic browning process in grape must (Li et al., 2008).

La modalità più diffusa per il controllo dell'imbrunimento enzimatico in mosti e vini è il trattamento con SO_2 , la quale già a basse dosi è in grado di inattivare l'attività catecolasica.

Meccanismo di ossidazione della PPO (tirosinasi/laccasi) nei mosti di uve sane e di uve bottrizzate



Imbrunimento
del vino causato
da *Botrytis*
cinerea





Enzimi che influenzano l'aroma

- Gli **aromi dei vini** possono essere distinti in tre categorie:
- **Primari:** provenienti dall'uva e dal suo grado di maturazione
- **Secondari:** provenienti dall'attività fermentativa prodotta dai lieviti o batteri lattici.
- **Terziari:** provenienti dall'invecchiamento del vino



<https://cartizepdc.com/it/blog/profumi-sentori-aromi-vino/>

TABLE 1 Enzymes used for aroma release in wine

Enzymatic activity	Aroma classification / Volatile compounds	Aroma attribute	Wine type	References
Glycosidases: β -glucosidase; α -arabinosidase; α -rhamnosidase; β -apiosidase.	Terpenes/ α -terpineol; geraniol; nerol; linalool; citronellol.	Fruity and floral	Muscat	Cabaroglu et al., 2003; Jesus, Campos, Ferreira, and Couto, 2017
			Gewürztraminer	Cabaroglu et al., 2003; Malherbe, Moine, and Kramer, 2014
			Riesling	Cabaroglu et al., 2003; Michlmayr et al., 2012

Le β -glucosidasi sono enzimi che rilasciano gli aromi dei mosti a partire dai loro precursori glicosilati.

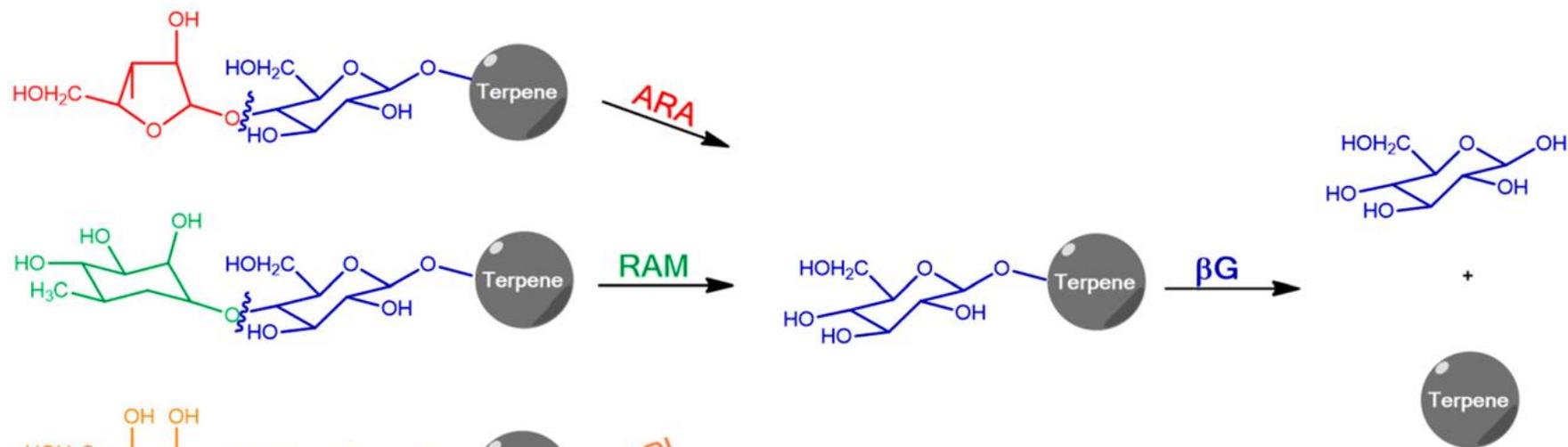


FIGURE 2 Scheme of the cascade reaction mechanism for the release of the glycosylated precursor molecules catalyzed by four different glycosidases: α -L-arabinofuranosidase (ARA), α -L-rhamnopyranosidase (RAM) and β -D-apiofuranosidase (API), and β -D-glucopyranosidase (β G). Modified from (Ahumada et al., 2016)

È un meccanismo che avviene in due tappe: l'enzima α -L-ramnosidasi (RAM), α -L-arabinosidasi (ARA) o β -D-apiosidasi (API) effettuano la rottura del primo disaccaride lasciando poi alla β -glucosidasi (β G) il compito di liberare l'aglicone odoroso.

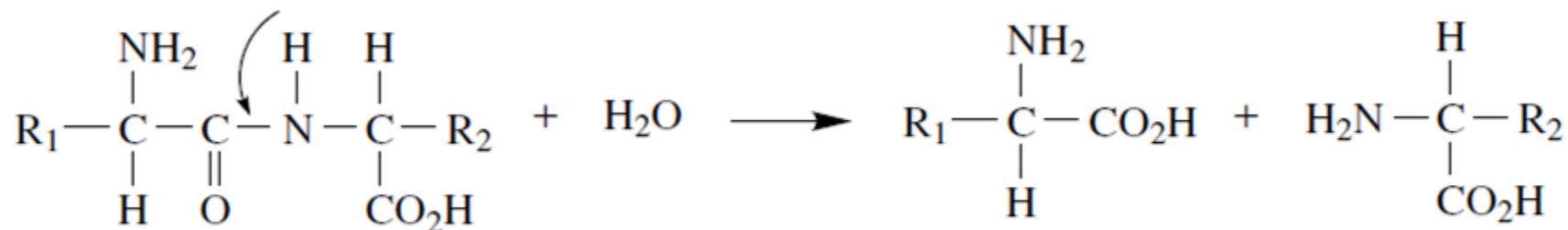
Enzimi della
chiarificazione

:

Proteasi,
Lisozima e
Ureasi



Proteasi



Modalità di azione delle proteasi nell'idrolisi dei legami peptidici

Chicco d'uva	Attività proteasica
Polpa + succo	81,6
Buccia	17
Vinaccioli	1,4

Ripartizione dell'attività proteasica nelle diverse parti dell'uva sana, espressa come percentuale dell'attività totale dell'acino

Lisozima

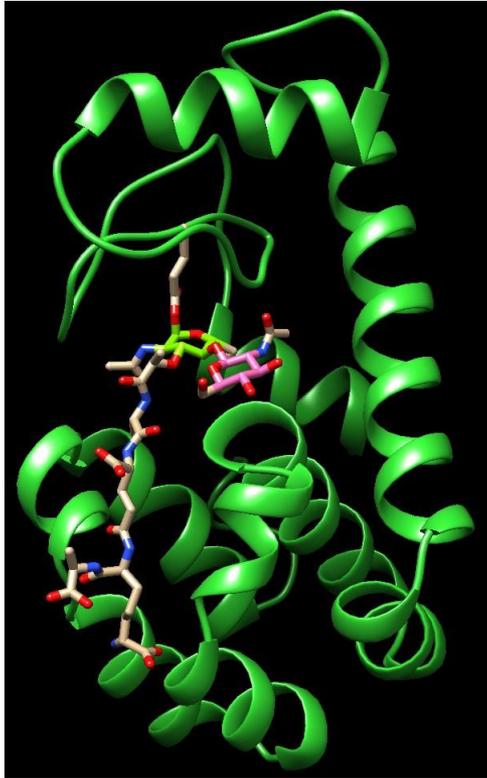


Table 1 –Lysozyme content (ppm fresh-weight basis [FW]) present in secretions, body fluids, and tissues of human and animal organisms (Lesnierowski and Kijowski 2007).

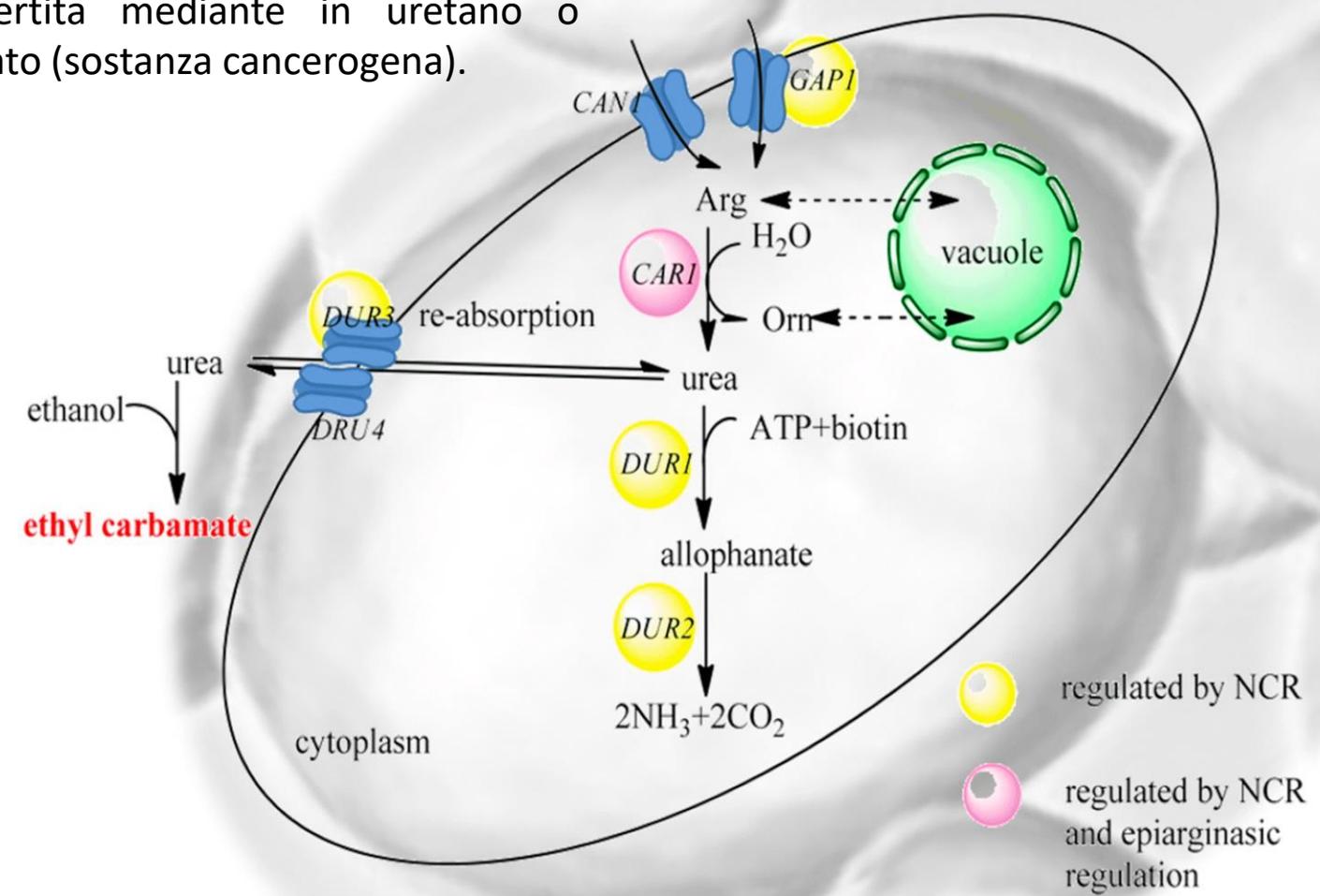
Source of lysozyme	Lysozyme (ppm FW)
Hen egg white	2500–3500
Duck egg white	1000–1300
Goose egg white	500–700
Human Tears	3000–5000
Human milk	55–75
Cow milk	10–15
Human spleen	50–160
Human thymus	60–80
Human pancreas	20–35
Cauliflower juice	25–28
Papaya juice	8–9
Cabbage juice	7–8

Il **lisozima** è presente in quantità nell’albume d’uovo di gallina e lisa i batteri Gram-positivi, compresi i batteri dell’acido lattico del vino, senza interferire con l’azione dei lieviti e con i batteri acetici.

Secondo le normative europee (Regolamento della Commissione (UE) n. 1622/2000, n. 2066/2001, e n. 423/2008) la dose massima consentita di lisozima è di **500 mg/L**.

A causa della suo potere allergenico la sua presenza deve essere scritta nell’etichetta anche se presente in tracce, oppure se utilizzato nella fase di vinificazione come coadiuvante tecnologico.

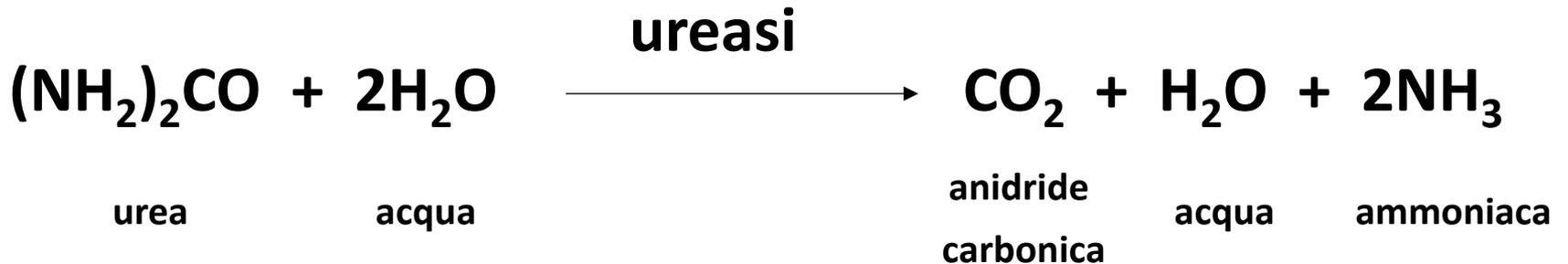
Durante la fermentazione, possiamo trovare quantità elevate di urea derivate dal metabolismo degli aminoacidi nei lieviti. Questa sostanza può reagire con l'etanolo per essere convertita in uretano o etilcarbammato (sostanza cancerogena).



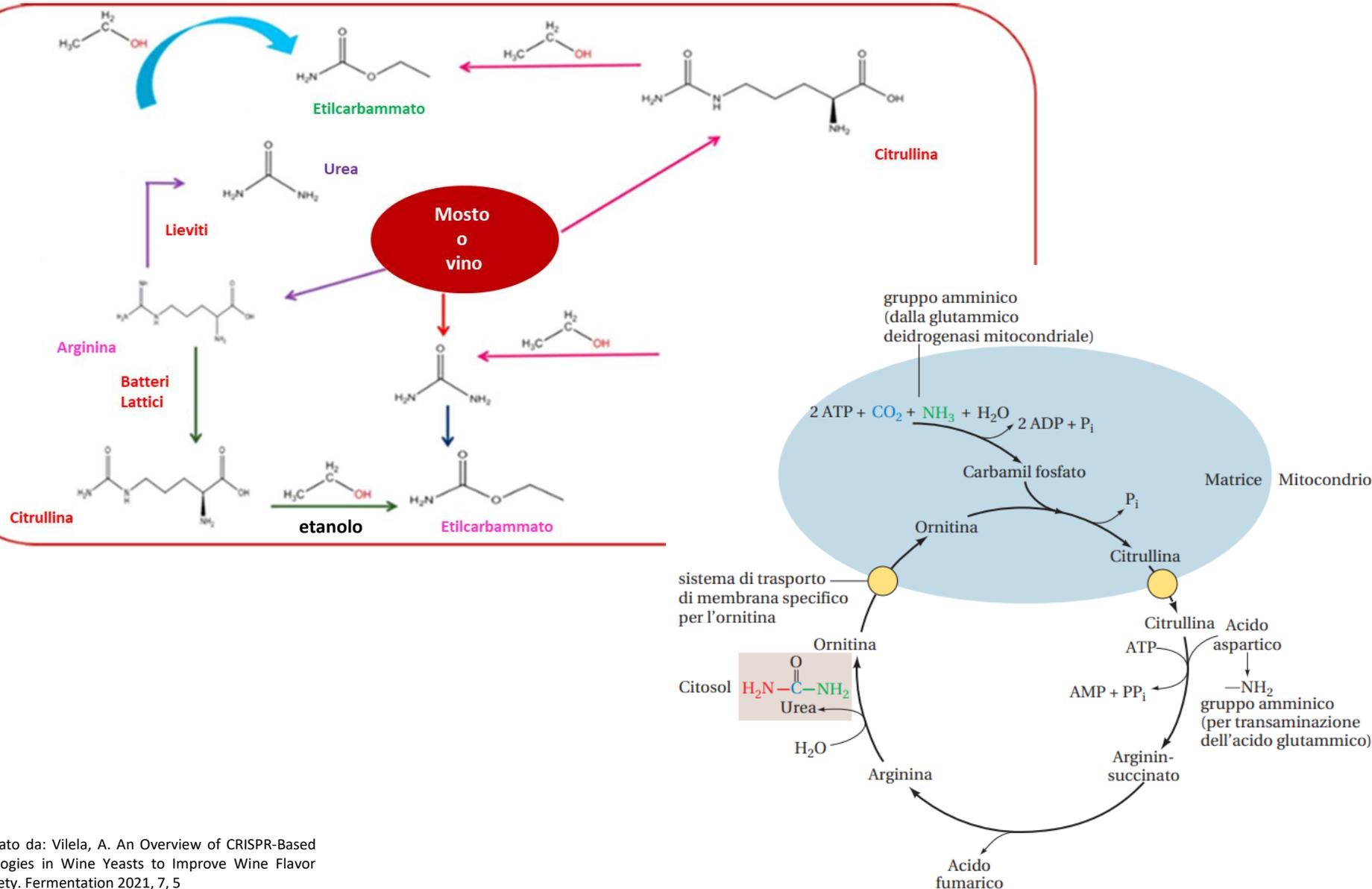
Urea + etanolo → etilcarbammato + ammoniaca

Ureasi

- L'enzima ureasi scinde l'urea in ammoniaca e anidride carbonica, prevenendo la formazione di uretano.
- L'ureasi commerciale del *Lactobacillus fermentum* è efficace sull'urea a dosi di 50 mg/L nei vini rossi e 25 mg/L nei vini bianchi.



Durante la fermentazione malolattica, i batteri lattici possono produrre alcuni precursori dell'etilcarbammato, come la citrullina che derivata dal catabolismo dell'arginina.



Modificato da: Vilela, A. An Overview of CRISPR-Based Technologies in Wine Yeasts to Improve Wine Flavor and Safety. Fermentation 2021, 7, 5