

## **Esperienze di affinamento di vini bianchi “sur lies”**

### **Introduzione**

L'affinamento dei vini sui lieviti (“sur lies”) che hanno condotto la fermentazione è una pratica usuale in certe zone vitivinicole, per la produzione di vini di qualità, resistenti al tempo, dotati di stabilità chimico fisica e sensoriale. Tale tecnica, nelle stesse zone, è stata anche estesa all'affinamento dei vini rossi. Le reazioni che avvengono durante il contatto del vino con i lieviti sono state studiate principalmente presso la Facoltà di Enologia dell'Università di Bordeaux.

Esse si possono così riassumere:

- autolisi delle cellule di lievito inattive con rilascio di materiale endocellulare e di glicoproteine parietali,
- degradazione delle proteine del lievito con produzione di amminoacidi e tioli volatili (nella maggior parte dei casi di odore sgradevole,
- interazione con i polifenoli delle glicoproteine rilasciate,
- rilascio di sostanze lipidiche provenienti dalla degradazione delle membrane cellulari.

Mentre i biopolimeri e il materiale endocellulare esercitano un'azione positiva sulla qualità e sulla stabilità del vino, i composti tiolici rappresentano un fattore negativo che può portare alla perdita della qualità del vino. Per ovviare a questo inconveniente, tradizionalmente, il contatto vino “lies” di fermentazione viene condotto in “barrique”, che assicura un microarricchimento continuo del vino in l'ossigeno dell'aria. Per aumentare l'intensità di questo contatto e per disperdere le “lies” nell'intero volume del recipiente, facilitando così la cessione di materiale cellulare, vengono effettuati periodici “batonnages”. Come risultato si ha che il vino sottoposto a tale processo possiede un potenziale di ossidoriduzione superiore a quello dei vini chiarificati conservati in vasca di acciaio e gli eventuali tioli volatili vengono continuamente ossidati. L'ossigeno assorbito, inoltre, viene rapidamente consumato per la presenza di lipidi insaturi facilmente ossidabili, senza indurre pericolose reazioni di ossidazione dell'etanolo presente.

Come sopra accennato, tale processo, attualmente viene riservato alla produzione di vini di qualità. Tentativi ed esperienze vengono condotti in tutte le regioni vitivinicole per estendere i suoi benefici anche alla produzione dei vini comuni da pasto e ai vini di qualità media e medio alta, abbassandone sensibilmente i costi, necessariamente alti nel caso dell'impiego della “barrique”.

Per una migliore comprensione di quanto avviene durante il contatto vino “lies” viene sotto riportata una sintesi delle conoscenze dedotte dalla bibliografia internazionale.

### ***Stato delle conoscenze***

#### ***Definizione e composizione delle “lies”***

Le “lies”, denominate volgarmente “fecce”, nella lingua italiana, rappresentano il residuo solido presente nei vini, alla fine della fermentazione alcolica. Esse, nella vinificazione in bianco, sono costituite soprattutto da lieviti, se i mosti sono stati previamente chiarificati, da lieviti e particelle d'uva se la chiarifica è stata parziale o

non è stata effettuata del tutto; nella vinificazione in rosso, dopo la separazione dalle vinacce, rappresentano l'insieme di una parte dei lieviti che hanno fermentato il mosto e delle particelle d'uva. Possono far parte delle "lies" anche cristalli di bitartrato di potassio e di tartrato di calcio, proteine, altri sali minerali (ad es., solfuri) e polifenoli assorbiti dalle pareti e dalle membrane dei lieviti o precipitati in complessi costituiti da tannini, proteine e polisaccaridi. Anche i batteri lattici, normalmente, fanno parte delle "lies". Inoltre, le "lies totales" rappresentano la totalità della fase solida presente nei vini alla fine della fermentazione in bianco, le "lies fines" quella rimasta dopo il primo travaso.

Nella fermentazione in bianco le "lies totales" rappresentano dal 3 al 5% del volume totale del vino e contengono circa il 25% di materia secca costituita da:

- 25 – 35% di sali tartarici,
- 35 – 45% di microrganismi (in maggioranza lieviti),
- 30 – 40% di residui organici.

I *Saccharomyces cerevisiae*, che vengono aggiunti ai mosti prima della fermentazione, rappresentano la maggioranza dei lieviti che di solito si trovano nelle "lies", dove, tuttavia, è possibile trovare anche altre specie di lieviti, provenienti dall'uva (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata* e *Pichia membranefaciens*).

### ***Conseguenze della conservazione dei vini "sur lies"***

La composizione chimica delle "lies" cambia durante il contatto con il vino a causa di reazioni di carattere idrolitico che vanno sotto il nome di autolisi.

#### 1) Definizione e descrizione dell'autolisi

Salkowski, come riportato da Feuillat (1998) per primo utilizzo nel 1875 il termine "autolisi", ma i primi studi sulle basi biochimiche di questo processo si devono a Vosti e Joslyn (1954).

Il termine "autolisi" è usato per descrivere le reazioni che avvengono nei lieviti presenti nelle "lies" che hanno perso la propria vitalità e che, di conseguenza, non sono più in grado di riprodursi. Si tratta dell'idrolisi dei biopolimeri intracellulari catalizzata da varie endoidrolasi, che si attivano alla morte delle cellule dei lieviti e che portano alla formazione di molecole dotate di più bassi pesi molecolari (Babayan et al., 1981). Questi ultimi Autori hanno individuato nel meccanismo dell'autolisi le seguenti fasi:

- disorganizzazione delle strutture intracellulari (membrana citoplasmatica e lisosoma) con rilascio di enzimi idrolitici e dei loro substrati;
- attivazione degli enzimi idrolitici, loro interazione con i polimeri intracellulari e accumulazione dei prodotti di idrolisi nello spazio periplasmatico definito dalla parete cellulare;
- diffusione dei prodotti dell'idrolisi (monomeri e polimeri) nel mezzo.

La contemporanea degradazione dei componenti della parete cellulare del lievito (glucani e mannoproteine) provoca l'aumento della dimensione e del numero dei pori in essa presenti facilitando il rilascio dei prodotti dell'idrolisi nell'ambiente extracellulare.

In enologia la comprensione dell'autolisi e dei suoi effetti è essenziale per spiegare quanto avviene durante l'affinamento dei vini in presenza dei lieviti di fermentazione, per lunghi periodi di tempo, come avviene nella produzione dei vini spumanti con il metodo classico e nella produzione di vini bianchi di elevata qualità. Per realizzare le reazioni idrolitiche, tuttavia occorrono tempi lunghi, variabili da 6 a 12 mesi (Feuillat e Charpentier, 1982; Todd, 1995).

## 2) I prodotti derivati dall'autolisi utilizzati in enologia

Per diminuire i tempi di affinamento e i rischi che questo processo comporta, è stato proposto l'uso dei prodotti della lisi dei lieviti quali ad es., le mannoproteine o gli idrolizzati di lieviti per attivare la fermentazione malolattica o le pareti cellulari di lieviti per asportare prodotti che potrebbero avere un effetto inibitore dell'attività fermentativa dei lieviti quali, ad es., acido decanoico e decanoato di etile. Qualcuno di questi additivi (mannoproteine) è stato usato per la stabilizzazione del vino nei riguardi delle precipitazioni tartariche, proteiche e polifenoliche. Queste stesse sostanze avrebbero anche una influenza sensoriale positiva.

## 3) Fattori esterni che influenzano l'autolisi

La naturale autolisi dei lieviti, che avviene a causa del catabolismo e della diminuzione della vitalità cellulare, è diversa dall'autolisi indotta che può essere provocata deliberatamente attraverso l'aumento della temperatura, l'aggiunta di agenti plasmolitici o di altri fattori che diminuiscono l'integrità della membrana citoplasmatica o per attivazione degli enzimi idrolitici.

Solo l'autolisi naturale del lievito è prevista in enologia, pur essendo questa influenzata da fattori quali la temperatura, il pH, etc. La quantità di azoto rilasciato è utilizzata come parametro per controllare l'effetto del trattamento sull'autolisi.

### a) La temperatura

L'autolisi è attivata da un incremento di temperatura che induce un aumento dell'attività degli enzimi coinvolti in questo processo; il limite critico essendo rappresentato dalla temperatura alla quale gli enzimi sono denaturati. Differenze nelle condizioni operative, probabilmente, sono responsabili dei risultati contraddittori riportati sugli effetti di questo parametro sull'autolisi.

È stato dimostrato che, durante l'induzione dell'autolisi in un mezzo sintetico, la distruzione delle strutture endocellulari e l'attivazione degli enzimi idrolitici dipende dalla temperatura. La temperatura ottimale è 60 °C per le proteasi e 70 °C per le nucleasi (Babayan et al., 1981). Queste temperature ottimali diminuiscono in presenza di agenti plasmolitici (etanolo, acetato di etile, lecitina, ..). Secondo Babayan et al., (1981) la temperatura ottimale per l'autolisi varia nell'intervallo 45 – 60°C, a pH 5. Queste condizioni, tuttavia, sono sensibilmente diverse da quelle enologiche.

Feuillat et al., (1982) studiarono gli effetti della temperatura sull'autolisi determinando la quantità di azoto rilasciato dai lieviti nel tempo. Più alta è la temperatura, più alto è risultato l'azoto liberato. Per riscaldamento per 4 ore a 55 °C,

tuttavia, non aumentò la quantità di azoto rilasciato, mentre a più bassa temperatura il fenomeno è durato per lunghi periodi di tempo. Questo risultato è dovuto all'inibizione del processo enzimatico ad alta temperatura.

Molnar et al., (1980) trovarono che la velocità di idrolisi è generalmente lineare fra 4 e 40 °C in mezzo acido e che un aumento di 10 °C di temperatura provoca un aumento del 6 – 7% della velocità di autolisi. La temperatura ottimale per l'attività proteolitica nei vini spumanti è fra 10 e 12 °C. Oltre 40 °C, l'attività delle proteasi intracellulari si blocca. Se l'autolisi procede troppo rapidamente (ad es., ad alta temperatura), i componenti rilasciati non possono subire certe reazioni chimiche secondarie che favoriscono la formazione del "bouquet" o che possono produrre un aroma poco piacevole di lievito (Kelly – Treadwell, 1988).

#### b) Altri fattori

L'autolisi può essere accelerata da fattori di natura chimica quali:

- la forza ionica,
- il pH: se il pH è più basso di quello del vino, i componenti intracellulari sono rilasciati più rapidamente (Breddam e Beenfeldt, 1991; Feuillat e Charpentier, 1982; Miguel – Gordillo et al., 1990)
- la composizione ionica del mezzo: calcio e magnesio favoriscono l'autolisi a 30 °C (Hough e Maddox, 1970),
- il contenuto in etanolo del mezzo: la proteolisi in presenza del 10% di etanolo (v/v) avviene meglio che in presenza del 12% (Miguel – Gordillo et al., 1990),
- infine, l'aerazione e la carenza di azoto o di energia del mezzo può interferire con i processi strutturali e funzionali delle cellule e accelerare l'autolisi (Babayán e Bezrukov, 1985).

#### 4) Meccanismi e conseguenze dell'autolisi in enologia

Dopo la diminuzione della vitalità delle cellule, l'autolisi dei lieviti consente il rilascio di proteine cellulari, acidi nucleici, lipidi e polisaccaridi ed è correlata con la diminuzione della biomassa.

#### a) Proteolisi

Una delle più ovvie conseguenze dell'autolisi è l'idrolisi delle proteine con il conseguente incremento dei metaboliti azotati nel vino. Gli studi di Lurton (1988) e di Lurton et al. (1989), confermati da quelli di Sato et al. (1997), mostrano che le proteasi sono coinvolte negli scambi che avvengono fra i lieviti e il vino durante il processo di autolisi. *S. cerevisiae* ha altamente diversificato il proprio corredo enzimatico (Achstetter e Wolf, 1985). Molti di questi enzimi probabilmente, sono coinvolti nella proteolisi dei lieviti vinari. Le normali condizioni in cui si svolgono i processi enologici, tuttavia, non favoriscono l'azione della maggior parte di queste proteasi a causa del basso pH (fra 3 e 4) e della temperatura (fra 10 e 15 °C). Secondo Lurton (1988) e Lurton et al. (1989), l'uso di specifici inibitori delle quattro classi di proteasi rilevate in *S. cerevisiae* (serina proteasi, gruppi tiolici proteasi, proteasi acide e metalloproteasi) suggeriscono che la proteasi A gioca un ruolo predominante nel

processo proteolitico. Recenti lavori, tuttavia, hanno rivelato che l'attività della proteasi A si riscontra alla fine della fermentazione alcolica, ben prima dell'inizio dell'autolisi e non è l'attività proteasica predominante durante questo processo (Alexandre et al., 2001). Al pH del vino, questa proteasi acida rilascia un gran numero di peptidi. Essa, inoltre, attiva altre proteasi quale, ad es., una carbossipeptidasi Y. L'attività della forma extracellulare di questa peptidasi, che è 25 volte più bassa della proteasi A, è stata rivelata solo nel vino all'inizio del processo di affinamento "sur lies". La sua forma intracellulare fu riscontrata per almeno 6 mesi (Sato et al., 1997). La possibilità che altre proteasi diverse dalla proteasi A siano coinvolte nell'aumento del contenuto in amminoacidi dei vini affinati "sur lies" non può essere sostenuta ancora (Lurton, 1988).

L'intensità delle attività proteasiche varia considerevolmente in funzione del ceppo di lievito. Leroy et al., (1990) trovarono sensibili variazioni nell'attività durante la seconda fermentazione alcolica dei vini di Champagne effettuata con due tradizionali ceppi di *S. cerevisiae*. Questa variabilità fu anche osservata da Arizumi et al., (1994) nello studio di tre ceppi di lieviti (due *S. cerevisiae* e un *S. Bayanus*) e da Suzzi (1990) che studiò il rilascio di amminoacidi da parte di 10 ceppi di lieviti. Quest'ultimo autore non ha quantificato con precisione le attività proteasiche dei ceppi di lievito, ma ha ipotizzato che le significative differenze fra i contenuti di amminoacidi rilevate, possono essere attribuite alle diverse attività proteasiche.

Queste attività proteasiche furono ancora riscontrate dopo 5 e 7 mesi di affinamento, in dipendenza dal tipo di vino: vini bianchi dalla regione della Borgogna (Ferrari e Feuillat, 1988) e vini Koshu (Arizumi et al., 1994). È stato anche mostrato che le attività proteasiche dei vini Champagne cambiano nel tempo; esse, inoltre, sembrano diminuire per diversi mesi dopo la fine della seconda fermentazione, aumentano, poi, regolarmente per diversi anni e raggiungono un massimo dopo circa sei anni (Feuillat e Charpentier, 1982; Leroy et al., 1990).

#### b) Il potere autolitico dei lieviti

Certi autori hanno tentato di definire e standardizzare il "potere autolitico dei lieviti", basandosi sulla capacità proteolitica di questi microrganismi. Charpentier et al. (1986) definirono questa capacità come "la quantità di azoto solubile rilasciata per grammo di lievito, in peso secco per unità di tempo". Leroy et al., (1990), perfezionarono questa definizione stabilendo che l'autolisi dovesse avvenire in mezzo idroalcolico a pH 3,5 e a 37 °C per 48 ore. Suzzi (1990), determinò solo la massima quantità di amminoacidi rilasciata da differenti ceppi di *S. cerevisiae*, in seguito alla fermentazione in un dato mezzo per 10 giorni, a varie temperature. A causa della variabilità nell'attività autolitica dei lieviti, questo autore suggerì che il potere autolitico di *S. cerevisiae* può dipendere dal ceppo. Hernawan et al. (1995) studiarono il potere autolitico di altre specie di lieviti come ad es., *Kloeckera apiculata* e *Candida stellata* che, sebbene in parte, possono condurre le fermentazioni.

#### c) Degradazione delle pareti cellulari

Conseguenza della proteolisi è che le rigide strutture della parete cellulare del lievito subiscono cambiamenti durante l'autolisi (Feuillat, 1998). La microscopia elettronica ha evidenziato la formazione di creste durante l'autolisi in ambiente idroalcolico (Charpentier et al., 1986). Piton et al. (1988) confermarono che le pareti cellulari subiscono variazioni durante l'invecchiamento dei vini di Champagne. La trasformazione della parete cellulare inizia durante i primi sei mesi di invecchiamento con la scomparsa dello strato interno della parete. I polisaccaridi nello strato esterno cambiano solo molto più tardi, fra 8 e 11 anni (Piton et al., 1988).

Le pareti delle cellule di *S. cerevisiae* sono composte essenzialmente di polisaccaridi (circa 90%). Il rimanente 10% è costituito da lipidi e proteine (Charpentier e Feuillat, 1992). La frazione dei polisaccaridi è composta di glucani ramificati (essenzialmente catene di  $\beta$ -(1→3)-D-glucosio, ma anche catene di  $\beta$ -(1→6)-D-glucosio), mannoproteine (proteoglicani) e chitina (1% dei polisaccaridi totali) (Manners et al., 1973a; Manners et al., 1973b). I cambiamenti nella parete dipendono dalle condizioni iniziali di crescita dei lieviti (mezzo sintetico o mosto naturale).

I cambiamenti includono:

- una riduzione dal 20 al 50% nello spessore della parete durante la crescita in un mezzo sintetico (Hernawan e Fleet, 1995; Charpentier et al., 1986),
- un aumento del 10% nello spessore della parete durante la crescita su mezzo contenente 10% di etanolo, accompagnata da un incremento del 26% nello spessore dello strato polisaccaridico (Charpentier et al., 1986).

Indipendentemente dalla natura del mezzo, la parete cellulare conserva la sua integrità. Viene anche osservato un incremento del rapporto mannosio/glucosio, che indica una complessiva diminuzione del contenuto in glucani. La diminuzione nel contenuto in polisaccaridi (che conferiscono struttura e rigidità) insieme ad una perdita in amminoacidi, giustifica il collasso della struttura della parete (Freyssiner et al., 1989). È stato riportato che le  $\beta$ -(1→3)-glucanasi, localizzate nella parete e ancora presenti dopo 4 mesi di conservazione "sur lies", sono responsabili di questo fenomeno (Charpentier et Freyssinet, 1980; Feuillat et al., 1989). La debole attività ramnosidasi riscontrata nelle pareti gioca un ruolo molto minore delle attività glucanasiche (Freyssinet et al., 1989). Gli studi di Freyssinet et al. (1989) sulle pareti isolate, sotto condizioni simili a quelle del vino, hanno consentito di individuare tre fasi durante la degradazione della parete:

- l'idrolisi dei glucani per azione delle  $\beta$ -glucanasi che porta al rilascio di mannoproteine legate con legami covalenti ai glucani,
- la successiva idrolisi dei glucani da parte di una  $\beta$ -glucanasi solubile, presente nel mezzo,
- l'idrolisi delle mannoproteine, liberate durante la proteolisi, da parte di una  $\beta$ -mannosidasi o di proteasi.

Preparati commerciali di enzimi sono stati prodotti con l'obiettivo di ottimizzare e di accelerare l'autolisi durante la conservazione del vino "sur lies". Tali prodotti consistono essenzialmente di miscele di pectinasi e di glucanasi. Essi incrementano sensibilmente la quantità di mannoproteine liberate nei vini bianchi e nei vini rossi (Pellerin et al., 2001; Trioné et al., 2001).

#### d) Riduzione del peso secco

Una delle conseguenze della produzione di proteine e della demolizione delle pareti cellulari durante l'autolisi dei lieviti è la diminuzione nella quantità totale di sostanza secca delle "lies" nel tempo. Tale diminuzione è stata osservata in numerosi esperimenti condotti in condizioni diverse:

- dopo 25 mesi di contatto col vino, il peso secco delle "lies" di Champagne è solo 50% di quello rilevato all'inizio del processo e raggiunge il 30% dopo 18 anni di conservazione (Leroy et al., 1990),
- Ferrari e Feuillat (1988) trovarono che dopo conservazione per 5 mesi "sur lies" di un vino di Borgogna non spumante, l'estratto secco era diminuito dal 30 al 22% e questo decremento era accompagnato da una diminuzione nel peso secco,
- in condizioni modello, Fornairon-Bennefond (2000) osservarono che dopo 21 giorni di autolisi a 28°C il peso secco delle "lies" era diminuito del 17-19%,
- Hough e Maddox (1970) trovarono che durante l'autolisi dei lieviti della birra per 14 giorni a 45°C e pH 5-6 il peso diminuiva almeno del 20%,
- Hernawan e Fleet (1995) riscontrarono anche una diminuzione del 26-33% nella biomassa durante l'autolisi di diversi ceppi di lieviti per 10 giorni a 45°C e a pH 4,5,
- infine, Pueyo et al. (2000) incubarono tre ceppi di lieviti in un mezzo sintetico simile al vino, a 30 °C e a pH 3 per 12 giorni, sotto costante agitazione. Dopo 2 giorni notarono una rapida diminuzione (circa 30%) nel peso secco che si stabilizzò dopo 6 giorni al 40% del valore iniziale.

#### 5) I prodotti dell'autolisi

Durante l'autolisi, dovuta soprattutto alle attività idrolitiche sopra descritte, il mezzo si arricchisce in nuove sostanze che hanno origine principalmente dalle pareti cellulari dei lieviti. Esse sono essenzialmente di natura azotata (amminoacidi, oligopeptidi e peptidi, ma anche polisaccaridi, lipidi ed acidi nucleici). La loro liberazione durante la conservazione contribuisce alle proprietà sensoriali e fisico-chimiche del vino. Più precisamente, i prodotti dell'autolisi possono essere di due tipi: 1) prodotti primari dell'autolisi che agiscono direttamente sul vino, 2) prodotti di reazioni secondarie fra i prodotti dell'autolisi e altri composti del vino (Todd, 1995).

##### a) Sostanze azotate

Generalmente si considera che le sostanze azotate siano i prodotti principali dell'autolisi. Circa 50% dell'azoto dei lieviti può diffondere nel mezzo extracellulare ad un dato pH (da 5 a 6) (Babayan e Bezrukov, 1985). Lo studio di queste sostanze durante l'autolisi mostra che sono liberate proteine e peptidi che poi sono idrolizzati nel mezzo per dare amminoacidi (Babayan e Bezrukov, 1985; Martinez-Rodriguez e Polo, 2000; Moreno-Arribas et al., 1996; Moreno-Arribas et al., 1998). L'attività enzimatica aumenta fino all'autodigestione degli enzimi (Babayan e Bezrukov, 1985). Secondo Feuillat (1998) gli amminoacidi non sono markers dell'autolisi

particolarmente buoni in quanto quelli liberati per autolisi appaiono dopo la liberazione delle proteine e dei peptidi nel mezzo. Infatti è difficile distinguere le varie fasi della liberazione degli amminoacidi, che non dovrebbero essere confusi con l'autolisi. Gli amminoacidi sono in un primo tempo assimilati dai lieviti durante la fermentazione alcolica e sono usati per la moltiplicazione cellulare o immagazzinati soprattutto nei vacuoli. Dopo l'esaurimento degli zuccheri, i lieviti usano le loro stesse riserve per mantenere l'attività metabolica. Successivamente le cellule degenerano e il pool di amminoacidi è rapidamente e passivamente liberato per desorbimento (questa fase non è influenzata da inibitori delle proteasi rappresentati soprattutto da acido glutammico ed alanina). Questo fenomeno non deve essere confuso con l'autolisi vera e propria. Vi è poi un breve periodo di latenza, durante il quale il tenore in amminoacidi non sembra variare. Successivamente altri amminoacidi sono liberati, ma molto più lentamente di prima, per autolisi vera e propria (Feuillat e Charpentier, 1982; Kelly-Tradwell, 1988).

La liberazione di sostanze azotate è correlata con l'attività proteolitica intracellulare che, come sopra ricordato, dipende dal ceppo di lievito e dal mezzo di coltura (Charpentier et al., 1986). Hernawan e Fleet (1995) sostengono che la composizione in proteine, peptidi e amminoacidi degli autolisati non possa essere confrontata facilmente, in quanto le proteasi e le peptidasi sono anche liberate nel mezzo dopo un certo tempo e rimangono attive. Di conseguenza, secondo questi ultimi autori, è difficile usare l'esatta composizione in proteine e peptidi degli autolisati come marker di autolisi, in quanto le concentrazioni cambiano col tempo e la presenza di amminoacidi nel mezzo non dipende solo dall'autolisi.

Diversi autori hanno analizzato e stimato gli amminoacidi e le proteine liberate durante la conservazione dei vini "sur lies" (Arizumi et al., 1994; Moreno-arribas et al., 1998). Il tenore di ciascun amminoacido è difficile da determinare, in quanto esso varia sensibilmente da un anno all'altro e da ceppo a ceppo (Ferrari e Feuillat, 1988) e da vino a vino. Come regola generale, indipendentemente dal mezzo (sintetico o vino), durante l'autolisi diminuisce il tenore in amminoacidi nel lievito, mentre aumenta nel mezzo. Tuttavia, variazioni nel tenore dei singoli amminoacidi non sembrano mostrare che l'autolisi preferenzialmente favorisca la rottura di certi legami peptidici o agisca in modo specifico su certe proteine parietali (Charpentier et al., 1986). La natura degli amminoacidi liberati dipende soprattutto dalla composizione in peptidi e proteine del vino e dal tempo di contatto fra vino e lieviti (Moreno-Arribas et al., 1998). Vi sono sempre più peptidi nei vini spumanti e Champagne che nei corrispondenti mosti, in quanto i peptidi derivano dai lieviti (Carnevillier, 1999; Moreno-Arribas et al., 1996). Quando la seconda fermentazione è finita, il tenore in peptidi aumenta, raggiunge un massimo dopo 12 – 15 mesi e successivamente diminuisce (Moreno-Arribas et al., 1996). Questo risultato è coerente con la lenta degradazione dei peptidi nel tempo. Il rapporto fra peptidi idrofobici e idrofili aumenta durante il processo di conservazione. L'idrofobicità dei peptidi liberati può influenzare la qualità delle bolle, così che il miglioramento della qualità della spuma, con la conservazione "sur lies", può essere associato all'aumento del tenore in peptidi.



## b) Polisaccaridi

Anche i polisaccaridi liberati in seguito all'azione delle  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucanasi sono fra i composti quantitativamente più importanti prodotti durante l'autolisi. Numerosi metodi analitici sono stati usati per quantizzare queste sostanze con differenze di un fattore 20 (fra 100 e 2230 mg/L) (Feuillat et al., 1989; Llauberes e Doubourdieu, 1987). Molto poco glucosio o zuccheri riduttori sono stati riscontrati negli autolisati, confermando che le molecole liberate sono polisaccaridi (Hernawan e Fleet, 1995). Feuillat et al. (1989) mostrarono che molto più glucosio che mannosio viene liberato; i mannani nella parete sono liberati senza idrolisi, mentre i glucani sono idrolizzati fino a corte catene o monomeri. L'azione della  $\beta$ -mannosidasi sulla parte cellulare, caratterizzata da Fleet e Manners (1977) è minima (Freyssinet et al., 1989).

Llauberes e Doubourdieu, 1987), mostrarono che le mannoproteine sono i composti maggioritari fra i polisaccaridi extracellulari nei lieviti, sebbene il loro tenore vari in dipendenza dal ceppo, dalla temperatura di fermentazione e dal tempo di contatto fra le "lies" e il mezzo; il tenore in mannoproteine liberate, aumenta con l'agitazione delle "lies". Chrpentier e Feuillat (1992) osservarono che le mannoproteine e il peptidomannano liberati durante l'autolisi esercitano un'azione significativa sulle qualità sensoriali del vino, in particolare le dimensioni e la persistenza delle bolle, di rilevante importanza nei vini spumanti. Inoltre, è stato dimostrato che la liberazione delle mannoproteine ha un effetto positivo sulla stabilità dei vini e che la liberazione di polisaccaridi neutri da parte dei lieviti durante l'autolisi in vini Chardonnay si traduce in un miglioramento della qualità delle bolle (Andrés-Lacueva et al., 1997).

## c) RNA

Il rilascio di acido ribonucleico (RNA) nel mezzo è un'altra conseguenza dell'autolisi dei lieviti. La liberazione di questi composti che induce un aumento del *flavour* nei prodotti alimentari, è importante anche nei vini non spumanti conservati "sur lies", che contengono più "lies" dei vini spumanti prodotti con il metodo Champenois (Courtis et al., 1998).

Leroy et al., (1990) notarono una correlazione molto buona fra l'attività Rnasi delle cellule e il rilascio di acidi nucleici in Champagne. L'attività Rnasi che si manifesta durante la fermentazione in bottiglia, finisce dopo due anni di invecchiamento. Da 400 a 480 mg/L di acidi nucleici sono liberati in due anni e la quantità di acidi nucleici rispetto a quella presente nella biomassa all'inizio del processo di invecchiamento, diminuisce del 50%. Se l'autolisi avviene in un tampone fosfato a pH 4,5, più dell'85% dell'RNA presente nei lieviti diminuisce (da 6 a 8% del peso secco in *S. cerevisiae*) (Hernawan e Fleet, 1995). Solo alcuni (15%) dei prodotti di degradazione dell'RNA (probabilmente nucleotidi, nucleosidi, purine e pirimidine) possono essere riscontrati negli autolisati (Hernawan e Fleet, 1995; Hough e Maddox, 1970). Infine, esperimenti preliminari "sur lies" in mezzo modello simile ai vini non spumanti hanno mostrato che in 80 giorni il contenuto di acidi nucleici presenti aumenta del 160% (da 130 a 340 mg/L). Dopo questo periodo modesti trasferimenti di RNA avvengono (4% durante gli ultimi 50 giorni) (Courtis et al., 1998).

#### d) Lipidi e steroli

##### - Composizione lipidica dei lieviti

In condizioni di fermentazione, la frazione lipidica, che si trova soprattutto nelle membrane cellulari, è essenzialmente presente sotto forma di trigliceridi costituenti riserva di lipidi e sotto forma di fosfogliceridi e steroli di membrana. I lipidi di *S. cerevisiae* costituiscono una classe di composti minori e rappresentano da 37 a 147 mg/g di materia secca (dal 3 al 15%) (Rattray, 1988). Anche il contenuto in steroli è molto basso, rappresentando solo da 0,03 a 4,3% del peso secco dei lieviti (Giovannelli et al., 1996). In confronto agli altri lieviti, *S. cerevisiae* è particolarmente ricco in steroli.

Gli acidi più comuni di cui sono formati i trigliceridi e i fosfolipidi sono: l'acido palmitico (C16:1) e i suoi esteri e l'acido oleico (C18:1). Il contenuto in acidi grassi, tuttavia, dipende dalla disponibilità di ossigeno molecolare. Inoltre, è difficile dare valori esatti in quanto le condizioni di coltura (temperatura di crescita, composizione del mezzo di coltura, etc.) influenzano il tenore e il tipo di lipidi nei lieviti (Slaughter e Minabe, 1994).

##### - Autolisi e contenuto in lipidi dei vini

I vini contengono naturalmente piccole quantità di lipidi in quanto i processi di chiarifica causano la loro rimozione. L'autolisi dei lieviti, al contrario, porta ad un loro incremento nel vino. Il passaggio dei lipidi dai lieviti al vino, tuttavia, è meno marcato di quello di altri composti liberati durante il processo di autolisi.

Il fenomeno della liberazione dei lipidi dipende dalle condizioni in cui l'autolisi avviene ed è difficilmente generalizzabile a partire dai dati fino ad ora disponibili. Secondo Babayan e Bezrukov (1985), i lipidi tendono ad aggregarsi e a restare dentro la cellula se il pH è compreso fra 5 e 6. In queste condizioni, solo il 3% del contenuto iniziale in lipidi è rilasciato dalla cellula. Durante la produzione di autolisati in vitro, Ferrari et al. (1987) trovarono che in condizioni acide (pH 3,5) piccole quantità di lipidi erano liberati nel mezzo e che la maggior parte dei lipidi rimaneva negli involucri cellulari. Al contrario, gli studi di Chen et al. (1980) sulla liberazione di acidi grassi da parte di lieviti della birra, mostrarono che gli acidi grassi sono dei buoni markers dell'autolisi dei lieviti. Questi autori indussero l'autolisi con il riscaldamento, attraverso variazioni di pH e con aggiunta di alcol. Gli acidi grassi più comunemente ottenuti erano del tipo a media catena come l'acido decanoico (C10:0) e l'acido ottanoico (C8:0) che sono i principali responsabili dell'odore caprilico (detto anche odore di lievito o di grasso). Nelle tipiche condizioni birrarie, tuttavia, l'autolisi non può avvenire durante il tempo in cui la birra è a contatto con il lievito e, d'altra parte, non è desiderabile se non in tipi particolari di birra. Solo variazioni nella temperatura di conservazione o un prolungato contatto fra la birra e il lievito può consentire di indurre l'autolisi.

I lipidi liberati durante l'autolisi sono sicuramente importanti in quanto sono coinvolti nella formazione di composti volatili (ad es., esteri, aldeidi e chetoni) (Charpentier e Feuillat, 1992; Puyeo et al., 2000). La presenza dei lipidi è importante nei vini

spumanti (Champagne), per la dimensione delle bolle, per la qualità della spuma e per le influenze sensoriali. Puyeo et al. (1995) riferiscono di una relazione positiva fra la stabilità delle bolle e la presenza di acido linolenico (C18:3). Essi trovarono anche che la presenza di acido palmitico (C16:1) ha un benefico effetto sulla dimensione delle bolle. Altri studi effettuati sulla birra, tuttavia, mostrano che i lipidi hanno un effetto negativo sulle bolle. Dussaud et al. (1994) hanno suggerito che queste differenze sono dovute al diverso contenuto in alcol della birra e del vino.

I più comuni acidi grassi che si trovano nei vini conservati “sur lies” sono: il palmitico (C16:0), lo stearico (C18:0) e il palmitoleico (C16:1) (Ferrari et al, 1987). Questi stessi autori mostrarono che i lieviti contengono più acidi grassi saturi che insaturi (questi ultimi solo 13% del totale degli acidi grassi) se mantenuti in contatto col vino per circa otto mesi. Al contrario, gli acidi grassi insaturi rappresentano circa 60% del totale degli acidi grassi nei lieviti secchi attivati (Ferrari et al, 1987).

Similmente, l’aggiunta di pareti cellulari di lievito o di “lies” fresche porta ad un aumento iniziale nel contenuto di acidi grassi a lunga catena nel vino, seguita da una continua diminuzione. Infatti, dopo un certo tempo gli acidi grassi liberi sono adsorbiti dalle “lies” o dalle pareti cellulari di lievito (Ancin et al., 1998; Ferrari e Feuillat, 1988; Ferrari et al., 1987; Soufleros e Bertrand, 1988) sebbene nessun meccanismo sia stato proposto per spiegare questo fenomeno. Herraiz et al. (1990) ipotizzarono che i lieviti possiedano residue attività enzimatiche.

Nei vini spumanti, il contenuto di lipidi polari diminuisce drasticamente, mentre aumenta quello dei lipidi neutri.

Pare che i mono e i digliceridi neutri siano convertiti in trigliceridi. Questi lipidi neutri sono predominanti, rappresentando più del 90% dei lipidi determinati. Slaughter et al. (1994) riferiscono di un incremento nel contenuto in trigliceridi ma non in mono e digliceridi. Essi ipotizzano che gli acidi grassi e gli acil – gliceroli vengano rapidamente esterificati e osservano anche la formazione di cere nel mezzo di coltura in cui le cellule non permangono vive per tempi lunghi.

Più recentemente, il contenuto di lipidi liberato da tre ceppi di lieviti in mezzo modello, fu monitorato per 12 giorni durante l’autolisi a 30 °C sotto costante agitazione (Puyeo et al., 2000). Trigliceridi, 1,3-digliceridi, 2-monogliceridi e acidi grassi liberi furono rilasciati nell’arco di due giorni, periodo corrispondente alla massima perdita di vitalità e di materia secca nei lieviti. La generale diminuzione nel contenuto in lipidi nel mezzo può essere attribuita all’azione di enzimi idrolitici che sono liberati nel mezzo durante la modificazione della parete cellulare. Fra l’ottavo e il decimo giorno altri lipidi sono liberati. Nel corrispondente autolisato non furono rilevati fosfolipidi o 1-monogliceridi, sebbene essi facciano parte integrante dei lipidi costitutivi del lievito. La degradazione dei fosfolipidi fu inizialmente osservata da Hernawan e Fleet (1995) e da Slaughter e Minabe (1994) che non trovarono tracce di questi composti nel mezzo. Essa viene descritta come la reazione più significativa a carico dei lipidi durante l’autolisi dei lieviti.

È stato anche osservato che alla fine del processo di autolisi il contenuto di digliceridi diminuisce a causa di azioni enzimatiche (probabilmente lipasi). Questi composti

sono poi ritrovati come acidi grassi (acidi palmitoleico, palmitico, stearico e oleico e glicerolo) (Hernawan e Fleet, 1995).

Troton et al. (1989) tentarono di identificare il meccanismo che sta alla base dei cambiamenti nel contenuto in lipidi durante la seconda fermentazione alcolica. Tuttavia, furono Piton et al. (1988) che studiarono i cambiamenti nei tenori in lipidi di lieviti di Champagne durante l'invecchiamento sulle "lies" in bottiglia. Per microscopia identificarono numerose vescicole eterogenee nei lieviti, le più piccole delle quali sembravano di origine lipidica. Dopo la fine della seconda fermentazione, la microscopia evidenziava che i lieviti subivano un processo di plasmolisi. Appariva che certe membrane interne dei lieviti venivano degradate e che lipidi neutri venivano accumulati nelle vescicole che man mano crescevano. Dopo la cessazione del funzionamento di tutte le strutture dei lieviti, dopo 15 anni di invecchiamento, restavano solo una parete molto sottile (0,1 µm di spessore), una doppia membrana e le vescicole lipidiche (Piton et al., 1988).

Anche l'analisi degli steroli in un mezzo modello è stata utilizzata per stimare il contenuto di queste sostanze liberate durante il processo di autolisi (Lefur et al., 1999). È noto che gli steroli influenzano l'interazione proteine fosfolipidi e, di conseguenza, la fluidità della membrana e le attività enzimatiche di membrana. In questo studio, dieci steroli furono separati ed identificati, ciascuno di essi essendo esterificato o no durante l'autolisi accelerata di un lievito in un mezzo modello acido. Sembra che l'autolisi induca nei lieviti una diminuzione nel contenuto di steroli esterificati, in particolare di quelli sotto forma di intermedi primari nella sintesi dell'ergosterolo, mentre non cambia il tenore delle forme non esterificate. Il contenuto in steroli varia da 0,92 a 0,43% del peso secco dei lieviti. D'altra parte, la liberazione di steroli nel mezzo è trascurabile in quanto rappresenta solo 0,015% del totale degli steroli della biomassa.

Gli studi di Puyeo et al. (2000) mostrano anche che gli steroli esterificati e gli steroli semplici sono liberati dal secondo giorno di inizio dell'autolisi. Formairon-Bonnefond (2000) utilizzano lieviti provenienti dalla fermentazione prima dell'inizio dell'autolisi, come base di partenza per studi sulla differenza fra conservazione in presenza e in assenza di ossigeno. Essi trovarono che la sola differenza fra i due processi consisteva nel tenore in steroli, in particolare ergosterolo, la concentrazione del quale diminuiva più dell'80% durante la conservazione in presenza di ossigeno.

### c) Vitamine

Solo Chen et al. (1980) hanno riscontrato che certe vitamine, quali ad es., la tiamina (vitamina B1), la niacina (acido nicotinico) e la biotina sono prodotti durante l'autolisi nella preparazione della birra.

### ***Le proprietà fisico-chimiche delle "lies"***

1) Fenomeni ossidoriduttivi connessi con la presenza delle "lies"

Una delle proprietà più interessanti delle "lies" è il loro forte potere riducente. A causa di questa proprietà certi enologi ci pensano due volte prima di conservare il vino "sur lies". Infatti, se un vino è conservato sulla biomassa totale, presto appare un

odore sgradevole che è inevitabile durante il primo mese di contatto. Per questo motivo molti ritengono che sia meglio chiarificare rapidamente il vino, dopo la fermentazione alcolica in modo da prevenire l'odore di "ridotto" che può ulteriormente peggiorare. Solo la conservazione in "barrique", che permette minimi contatti con l'ossigeno, rende possibile la conservazione del vino "sur lies totales" per tempi lunghi (Chatonnet, 1991). Il mosto, tuttavia deve essere ben chiarificato e il vino trattato con quantità opportune di anidride solforosa. Recenti studi hanno mostrato che le "lies" dei lieviti possono consumare sensibili quantità di ossigeno dopo la fermentazione alcolica, per periodi di conservazione sopra i tre o quattro anni a 14 °C (Fornairon et al., 1999; Salmon et al., 2000). La capacità dei lieviti di consumare ossigeno non è univocamente legata alla loro vitalità. Essa decresce durante il processo di conservazione "sur lies". Con la diminuzione della vitalità dei lieviti, l'ossigeno è ancora consumato, probabilmente, per reazioni chimiche. La massima quantità di ossigeno consumata dalle "lies" è stata stimata in 4 mg/L sotto specifiche condizioni operative (ceppo di lievito, composizione del mezzo e temperatura) simulanti la composizione media del vino contenente circa 4% di "lies". Questi risultati mostrano che il consumo di ossigeno da parte delle "lies" è dovuto, probabilmente, soprattutto all'attacco dei lipidi delle membrane delle cellule da parte di questo elemento (Salmon et al., 2000). La capacità delle "lies" di consumare ossigeno sembra legata alla composizione delle cellule, in particolare alla frazione degli steroli (Fornairon-Bonnefond, 2000). Tuttavia, l'interazione fra l'ossigeno e le "lies" non sembra influenzare l'autolisi dei lieviti (Fornairon-Bonnefond, 2000). L'interazione fra l'ossigeno e le "lies" non è stata mai presa in considerazione, sia in termini del suo effetto sull'integrità delle "lies", sia sulla possibile produzione di sostanze che possono influenzare la qualità finale del vino invecchiato.

## 2) Interazione fra "lies e polifenoli

### a) Rimozione del colore non gradito dal mosto da parte delle "lies"

Vasserot et al. (1997) mostrarono che i lieviti possono assorbire antocianine. Questo assorbimento dipende dalla struttura delle antocianine, dalla presenza di attività  $\beta$ -glucosidasica nei lieviti e da certi fattori ambientali quali il contenuto in etanolo e in  $\text{SO}_2$ , la temperatura, il pH. Grazie a questa proprietà, le "lies" possono fissare le molecole delle antocianine che si trovano nei mosti bianchi provenienti dalla pressatura di uve rosse. È possibile così rimuovere il colore indesiderato dai vini, come osservato da Vasserot e Maujean (1998) nel corso di esperimenti su mosti colorati di Pinot noir di Champagne. Sulla base di questi risultati, le "lies" del vino possono essere utilizzate come alternativa ai carboni organici, attualmente di uso generale, che possono alterare i caratteri sensoriali, la brillantezza e la proprietà delle bolle dei vini spumanti.

### b) Reattività nei riguardi dei polifenoli nei vini

Recentemente diversi studi sono stati effettuati per determinare la natura delle potenziali interazioni fra le "lies" dei lieviti e i polifenoli durante la conservazione dei vini "sur lies". Per primi, Vivas e Saint-Cricq de Gaulejac (2000) trovarono che il

potenziale di ossidazione del vino rosso conservato “sur lies” è più basso dello stesso vino senza “lies” e che i composti liberati nel vino durante l’autolisi rallentano sensibilmente l’ossidazione di numerosi polifenoli purificati, aggiunti. Secondo Feuillat et al. (2001), la conservazione dei vini rossi “sur lies” non sembra influenzare il contenuto in antocianine. Al contrario, dopo agitazione, la frazione delle antocianine totali sembra aumentare sensibilmente. Dallo stesso studio risulta anche che il tenore in tannini colloidali sembra aumentare nei vini agitati, indicando che i tannini sono meno attivi nei confronti delle proteine. In un mezzo modello, si è riscontrato che le “lies” dei lieviti sono molto reattive nei confronti dei polifenoli dei vini se i lieviti sono stati allevati in assenza di polifenoli (Salmon et al., 2001). Questo tipo di interazione porta ad una forte diminuzione nel contenuto in polifenoli liberi nel vino, similmente a quanto osservato per le antocianine libere nei mosti (Vasserot et al., 1997). Tuttavia, la reattività delle “lies” e dei polifenoli del vino nei confronti dell’ossigeno sembra dipendere dalla durata dell’interazione: la frazione dei polifenoli liberi nel vino sembra acquistare maggior reattività nei riguardi dell’ossigeno, mentre le “lies” che hanno assorbito i polifenoli del vino sono solo debolmente reattive nei riguardi dell’ossigeno (Salmon et al., 2001).

### 3) Arrossamento (pinking) ossidativo dei vini bianchi

La presenza di “lies” durante la conservazione dei vini bianchi aiuta anche a prevenire il “pinking” ossidativo dei vini (Ribéreau-Gayon et al., 1998b). Il “pinking” ossidativo, che fa virare il colore di certi vini bianchi verso tonalità rosa-grigio, come conseguenza di una debole ossidazione, è stato da tempo descritto (Simpson, 1977). Dubourdieu (1955) confermò che le “lies” possono assorbire i precursori o le molecole responsabili del “pinking” diversamente da altri trattamenti inefficaci (trattamento con caseina, con PVPP o SO<sub>2</sub>). Esse, inoltre, riducono l’attitudine al “pinking”.

### 4) Assorbimento di tioli sulle pareti delle cellule dei lieviti che costituiscono le “lies”

Le “lies” possono eliminare completamente certi tioli volatili dai vini (Lavigne e Dubourdieu, 1996). Esperimenti condotti su “lies” fresche o su pareti di lievito in soluzioni modello contenenti tioli (metantiolo o etantiolo), mostrarono che le “lies” dei lieviti possono eliminare completamente questi due composti. Lavigne e Dubourdieu (1996) suggerirono che ponti disolfuro sono originati fra la cisteina costitutiva delle mannoproteine (localizzate nello strato esterno della parete cellulare) e il gruppo SH dei tioli volatili, consentendo ai lieviti di fissare i tioli.

### 5) Ruolo delle “lies” nella stabilità tartarica e proteica

Dopo essere stati a contatto con le “lies”, i vini sono più stabili nei riguardi delle precipitazioni tartariche e degli intorbidamenti proteici. Infatti, la stabilità delle proteine nei vini bianchi migliora sistematicamente se essi sono conservati “sur lies” in “barriques”. Quando vini nuovi sono lasciati sulle “lies” essi sono meno portati ad intorbidarsi col calore (Moine-ledoux e Dubourdieu, 1998). Similmente, minori quantità di bentonite (stabilizzante delle precipitazioni proteiche) sono richieste per

mantenere la stabilità delle proteine. Tuttavia, le proteine dell'uva responsabili dell'instabilità proteica nei vini bianchi (sei principali frazioni di proteine) non sono digerite o assorbite dai lieviti durante la conservazione. Esse diventano termostabili in presenza di certi colloidali derivati dalle pareti cellulari (Ledoux et al., 1992). La stabilità delle proteine nei vini conservati "sur lies" è dovuta alla presenza di una settima frazione proteica che appare solo durante la conservazione del vino "sur lies". Questa frazione contiene una mannoproteina di 32 kDa, MP32, che è un frammento della invertasi parietale di *S. cerevisiae*. Questa proteina è stata caratterizzata e chiaramente descritta come termostabile e termostabilizzante delle proteine nei vini conservati "sur lies". In seguito all'autolisi dei lieviti, questo frammento di proteina è liberato dalla parete del lievito per azione combinata delle glucanasi e proteasi vacuolari. Questa mannoproteina è stata ottenuta in vitro dalle pareti del lievito digerite enzimaticamente con glucanasi (Glucanex<sup>TM</sup>) e potrà diventare parte integrante di un nuovo prodotto per rimpiazzare, almeno in parte, la bentonite (Dubourdieu e Moin-Ledoux, 1996).

Similmente, altre mannoproteine altamente glicosilate di circa 40 kDa, ottenute dalla digestione delle pareti dei lieviti, inibiscono le precipitazioni tartariche dei vini bianchi, rossi e rosé (Moin-Ledoux et al., 1997; Ribéreau-Gayon et al., 1998b). Sulla base di queste conoscenze, è stato registrato un prodotto col nome di Mannostab<sup>TM</sup> per la prevenzione delle precipitazioni tartariche nei vini. Tuttavia, il suo uso è ancora sperimentale.

Recentemente, Dupin et al. (2000a e b) hanno proposto un meccanismo per spiegare l'azione delle mannoproteine di *S. cerevisiae* sulla stabilità proteica. Essi hanno ipotizzato che questo fenomeno è dovuto alla competizione fra le mannoproteine protettive e le proteine del vino per un composto, la cui natura rimane incognita, necessario per la formazione degli aggregati insolubili, presente nel vino.

### ***Implicazioni sensoriali della conservazione del vino "sur lies"***

L'autolisi del lievito durante la conservazione "sur lies" (processo lento e costoso) è indotta allo scopo di migliorare l'espressione aromatica del vino. Essa favorisce la liberazione di certi composti (lipidi, sostanze azotate, acidi ribonucleici, vitamine e polisaccaridi) alcuni dei quali possono essere considerati precursori d'aroma e possono, di conseguenza, influenzare il bouquet finale del vino conservato "sur lies". Si pensa, comunemente, che la conservazione "sur lies" aggiunga "corpo" e "rotondità" al bouquet del vino e, potenzialmente, gli conferisca migliore "armonia". Sebbene questi termini enologici siano un po' indefiniti e soggettivi sono state analizzate le loro evoluzioni durante l'affinamento "sur lies". In generale, le macromolecole liberate dal lievito, nel processo di autolisi, influenzano la qualità aromatica del vino. Ad es., la chiarifica troppo spinta (diminuzione del 30% del tenore in macromolecole) può indurre difetti enologici, quale la diminuzione della persistenza aromatica. Al contrario, vini lasciati a contatto con i lieviti per diversi mesi, contengono una maggior quantità di macromolecole dei lieviti che hanno un effetto positivo sulle qualità sensoriali del vino (Feuillat, 1997). Questo fenomeno è stato attribuito all'esistenza di interazioni fra le macromolecole dei lieviti e i

composti aromatici presenti nel vino. Tuttavia, diversi esperimenti condotti con polisaccaridi isolati dal vino e purificati (mannoproteine derivate dalla fermentazione e dall'autolisi) hanno mostrato un effetto non significativo sulle qualità sensoriali del vino (Will et al., 1991; Schobinger et al., 1992).

In mezzo modello, le interazioni fra composti volatili e macromolecole del vino dipendono dalla natura idrofobica delle molecole aromatiche e della parte proteica delle macromolecole (Lubbers et al., 1994) la cui influenza non è univoca, potendo incrementare o diminuire la volatilità relativa delle sostanze aromatiche. Questi due fenomeni possono coesistere (Feuillat et al., 1998). Ad es., le molecole non polari del mosto sono molto spesso fissate dalle macromolecole del vino.

Chung (1986) usò un particolare mezzo modello per monitorare le variazioni nei tenori in composti volatili liberati dai lieviti durante il processo di autolisi simulato. La maggior parte dei composti volatili erano presenti in tenori tanto più elevati quanto più il tempo di conservazione era lungo. Tuttavia, un incremento nella biomassa iniziale non implicava necessariamente un proporzionale incremento nel tenore in composti volatili.

Molnar et al. (1981) studiarono le variazioni nella composizione in sostanze aromatiche nei vini spumanti, utilizzando cellule intere o frantumate. Questi autori trovarono che la temperatura influenza il tenore di certi composti, come ad es., quelli ad alto punto di ebollizione (certi esteri etilici di acidi grassi). Inoltre, il tenore in composti volatili può essere da due a cinque volte più alto per i vini spumanti conservati in presenza di lieviti frantumati che di lieviti interi. Tuttavia, non tutti i composti volatili liberati hanno un effetto positivo sulle proprietà sensoriali dei vini spumanti.

Secondo Zoecklein et al. (1997) la conservazione del vino Riesling “sur lies” (10 °C per 45 giorni) riduce il tenore in precursori glicosilati non volatili di composti aromatici del 52% rispetto ai vini che non sono stati conservati “sur lies”. Questi composti glicosilati sono idrolizzati dalle glicosidasi che sono presenti nello spazio periplasmatico del lievito e sono rilasciati nel mezzo durante l'autolisi.

Gli esperimenti di Chatonnet (1991), effettuati in barrique, con mosto, mostrarono che l'intensità e l'apparente velocità di diffusione delle sostanze aromatiche del legno è diversa nella conservazione “sur lies fines” o “sur lies totales”. La biomassa, probabilmente, gioca due ruoli: 1) i polisaccaridi della parete cellulare possono fissare certi composti aromatici (fenoli volatili,  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octalattoni, etc.) e 2) certi sistemi enzimatici dei lieviti sono ancora attivi e possono limitare l'intensità del caratteristico “odore di legno (woody)” trasformando certe molecole, così come la vanillina e le aldeidi furaniche in prodotti meno odorosi e meno “woody”.

Infine, l'autolisi dei lieviti può favorire la crescita dei *Brettanomyces* a causa delle piccole quantità di glucosio liberate durante questo processo (< 150 mg/L). Le contaminazioni con questi lieviti sono frequentemente associate alla produzione di fenoli volatili (4-etil guaiacolo e 4-etil fenolo) (Guilloux-Benatier et al., 2001).

Diversi autori hanno espresso differenti opinioni sull'utilità della conservazione del vino “sur lies”:



- Stuckey et al. (1991) riportano che l'aggiunta di "lies" aggiunge una "nuova dimensione" al vino Chardonnay. Con l'agitazione, inoltre, il vino risulta meglio bilanciato in termini di fruttato di "woody" e di odore di lievito ("yeasty"). Questi autori riportano anche di aver trovato una correlazione fra qualità positive di questi vini e liberazione di amminoacidi nel mezzo, dopo 5 mesi di conservazione. Si sa, infatti, che gli amminoacidi vanno incontro a reazioni chimiche che portano alla formazione di certi composti aromatici (Feuillat e Charpentier, 1982). È il caso: della deamminazione della treonina in acido  $\alpha$ -chetobutirrico che è successivamente trasformato in 3-idrossi-4,5-dimetil-2(5H)-furanone, conosciuto, più comunemente, come sotolone. Questo lattone è percepito come un odore di noce verde;
- Ferrari e Feuillat (1998) mostrarono che i vini di Borgogna chiarificati alla fine della fermentazione alcolica venivano preferiti rispetto a quelli conservati "sur lies" ma anche che questi ultimi erano migliori alla fine del periodo di conservazione. Tuttavia, gli Champagne, ai quali è stata aggiunta la fase liquida che derivata dall'autolisato di lievito, sono stati meglio valutati per l'intensità, per la qualità e per la tipicità dell'aroma. Al contrario, dopo due anni di conservazione, il controllo è stato preferito. Inoltre, l'assenza di autolisato sembra apportare una influenza positiva fino ad un anno di conservazione, negativa successivamente (Chung, 1986);
- il metodo di conservazione dei vini "sur lies" è usato sistematicamente nella vinificazione dell'uva della varietà Koshu in Giappone per correggere la piatezza iniziale di queste uve. L'analisi delle qualità sensoriali dei vini per valutare il periodo ottimale di contatto con le "lies", mostrò che i migliori vini erano quelli rimasti "sur lies" per 4 mesi in botti, e 5 o 6 mesi in bottiglie (Arizumi et al., 1994);
- infine, Llauberes (1987) mostrò che l'agitazione delle "lies" aumenta il contenuto in polisaccaridi liberati nel mezzo, ma che questa differenza può non essere rilevata all'assaggio. Al contrario, i vini conservati "sur lies" sono sistematicamente preferiti ai vini controllo. Tuttavia, l'effetto diretto dei polisaccaridi sulla "rotondità (roundness)", sulla scorrevolezza e sulla dolcezza dei vini conservati "sur lies" non è stata mai dimostrata definitivamente (Ribéreau-Gayon et al., 1998b).