

ALLA RICERCA DELLA COMPLESSITÀ PERDUTA

PAOLA DOMIZIO*, MAURIZIO CIANI**, ILARIA MANNAZZU***, CRISTINA ROMANI*.****, MIRKO GOBBI**, FRANCESCA COMITINI**, LIVIO LENCIONI*

C'È UN FUTURO PER I LIEVITI NON-*SACCHAROMYCES* NEL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEI VINI?

Studi quantitativi sulla composizione della microflora dei mosti in fermentazione hanno evidenziato che i lieviti non-*Saccharomyces* non solo condizionano l'andamento e l'esito delle fermentazioni spontanee ma intervengono anche nel corso di fermentazioni inoculate con colture selezionate di *Saccharomyces cerevisiae*. Per lungo tempo i lieviti non-*Saccharomyces* sono stati considerati responsabili dell'insorgenza di difetti nei vini. Tuttavia è ormai generalmente accettato che questi lieviti contribuiscano a rendere più complesso l'aroma dei vini e quindi a migliorarne la qualità. Infatti diversi lieviti non-*Saccharomyces* di inte-

resse enologico sono in grado di secernere enzimi quali proteasi, esterasi e beta-glucosidasi il cui impatto sulle proprietà sensoriali dei vini è di grande interesse. Inoltre i lieviti non-*Saccharomyces* spesso producono elevate quantità di metaboliti quali glicerolo e altri polioli, polisaccaridi, composti volatili come acidi, alcoli, esteri etc. che nel complesso influenzano le caratteristiche del prodotto finito.

Oltre a ciò, alcuni Autori hanno più recentemente evidenziato che nel corso di fermentazioni miste si prolunga il tempo di sopravvivenza dei non-*Saccharomyces* e si verificano interazioni metaboliche che hanno effetti valutabili anche sul comportamento dei ceppi di *S. cerevisiae*. Per esempio è noto che *S. cerevisiae* percepisce la presenza di metaboliti prodotti da altri lieviti e può rimodellare il quadro trascrittomico e proteomico in risposta a stimoli ambientali. È stato anche ipotizzato che l'acetaldeide prodotta in fermentazione stimoli la crescita di *S. cerevisiae*. Queste e altre evidenze sperimentali hanno contribuito alla rivalutazione del ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* e suggeriscono che il loro impiego nella formulazione di starter misti di fermentazione potrebbe rappresentare una valida alternativa all'inoculo di colture pure di *S. cerevisiae* per l'ottenimento di vini di qualità. Infatti l'uso controllato di inoculi misti potrebbe da un lato garantire un rapido avvio della fermentazione alcolica e dall'altro esaltare le caratteristiche aromatiche finali del prodotto. D'altra parte è ormai noto che esiste tra i lieviti non-*Saccharomyces* un'ampia variabilità dei principali caratteri legati alla vinificazione sui quali effettuare una selezione. Pertanto, così come negli ultimi anni la selezione di lieviti *Saccharomyces* ha consentito l'ottenimento di ceppi starter con le caratteristiche ricercate, un'analoga operazione di selezione di lieviti *non-Saccharomyces* potrà consentire di individuare ceppi con caratteristiche idonee al processo di vinificazione i quali, in sinergia con *S. cerevisiae*, potrebbero portare alla produzione di vini dalle caratteristiche originali e peculiari. Sulla base di tali premesse, è in corso di realizzazione un progetto di ricerca finanziato dal Consorzio Tuscania (Firenze) che ha lo scopo di selezionare lieviti non-*Saccharomyces* e valutare la loro attività nel corso di fermentazioni multi starter, condotte con ceppi selezionati di non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces*.

LA SELEZIONE DI NON-*SACCHAROMYCES* DI INTERESSE ENOLOGICO

Circa cento lieviti non-*Saccharomyces* provenienti da diversi ambiti vinari e ascritti ai generi *Candida, Hanseniaspora/Kloeckera, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Saccharomycodes, Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* sono stati sottoposti a uno screening su piastra e successivamente utilizzati in microvinificazioni in scala di laboratorio.

Con lo screening su piastra sono state valutate la resistenza alla SO_2, l'attività killer (nei confronti di un ceppo di *S. cerevisiae* sensibile), la

LE ATTITUDINI ENOLOGICHE DEI NON-*SACCHAROMYCES*

Lievito	[1]Resistenza SO_2				[2]Produzione H_2S					[3]Attività esterasica			[4]Attività β-glucosidasica		[5]Attività Proteasica		[6]Fattore Killer	
Scala valori	1	2	3	4	1	2	3	4	5	0	1	2	0	1	0	1	0	1
Candida	-	5	3	4	-	2	9	1	1	2	7	4	13	-	13	-	13	-
Hanseniaspora	1	9	3	-	-	5	3	3	2	2	9	2	4	9	12	1	13	-
Kluyveromyces	3	2	-	-	-	-	3	1	1	3	2	-	2	3	5	-	5	-
Metschnikowia	-	3	4	-	-	3	4	-	-	2	4	1	2	5	-	-	-	7
Pichia	1	8	3	5	-	2	2	7	6	-	8	9	16	1	12	5	16	1
Saccharomycodes	-	1	3	8	-	-	5	1	4	9	3	-	12	-	10	2	12	-
Torulaspora	-	3	1	4	-	-	5	4	-	5	3	1	7	2	9	-	9	-
Zygosaccharomyces	1	11	3	3	-	2	5	10	1	3	10	5	18	-	18	-	18	-

[1] Valutata in base allo sviluppo in presenza di concentrazioni crescenti di SO_2 libera (1=10 mg/l, 2=20 mg/l, 3=40 mg/l, 4=60 mg/l)

[2] Valutata in base all'intensità del colore della patina su terreno Biggy (0=no colore, 5=marrone intenso)

[3] Valutata sull'intensità della colorazione gialla in seguito all'idrolisi del pNPA (0=no colore, 2=giallo intenso)

[4] Valutata in base all'imbrunimento della patina dovuta all'idrolisi dell'arbutina (0=assenza, 1=presenza)

[5] Valutata in base formazione di un alone di chiarificazione dovuto all'idrolisi della caseina (0=assenza, 1=presenza)

[6] Valutata come formazione di un alone di inibizione della crescita di un ceppo sensibile di S. cerevisiae (0=assenza, 1=presenza)

[b] numero di ceppi nelle diverse scale di valori

Tab. 1 - Numero di ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* esaminati per alcuni caratteri enologici mediante screening su piastra.

produzione di idrogeno solforato (H_2S) e di alcuni enzimi di interesse enologico. Le microvinificazioni sono state finalizzate alla valutazione del potere fermentativo, della velocità di fermentazione e della produzione di acido acetico, anidride solforosa e polisaccaridi.

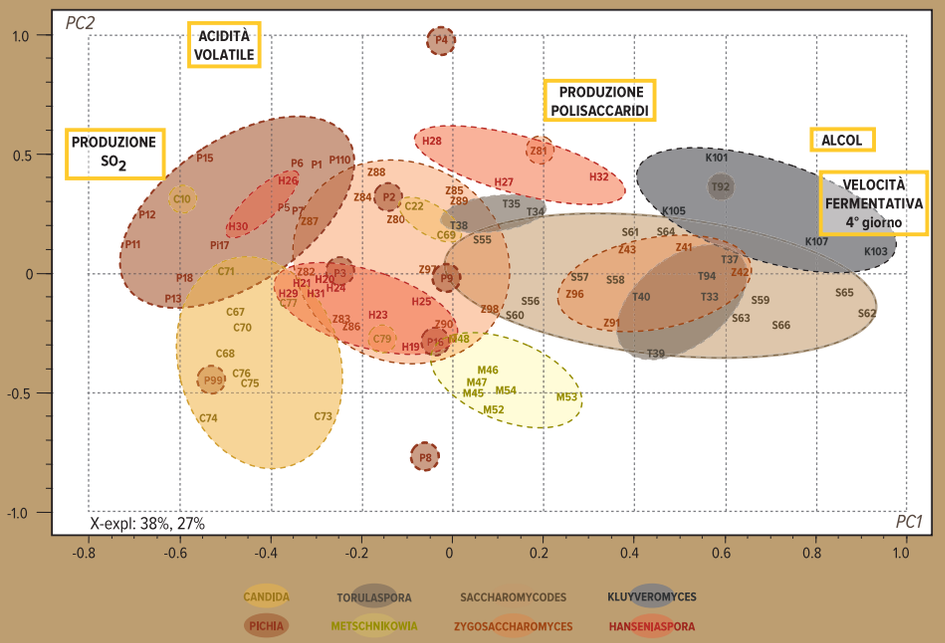
I risultati dello screening su piastra (tabella 1) hanno mostrato differenti livelli di variabilità tra i lieviti in funzione del carattere considerato. Ad esempio, si osserva un'ampia variabilità sia inter sia intra-generica per quanto riguarda la resistenza all'anidride solforosa e le attività enzimatiche, due caratteri di grande interesse enologico. L'elevata resistenza alla solforosa riscontrata in numerosi lieviti non-*Saccharomyces* garantisce la loro persistenza e attività fermentativa in fermentazioni multistarter, pur in presenza delle dosi di anidride solforosa normalmente impiegate in vinificazione per il controllo della microflora indigena indesiderata.

Per quanto riguarda la capacità di produrre enzimi si è osservato che l'attività proteasica è più frequente tra lieviti appartenenti al genere *Pichia* mentre l'attività beta-glucosidasica è più diffusa tra lieviti ascritti ai generi *Hanseniaspora, Kluyveromyces* e *Metschnikowia*. Solo pochi lieviti, principalmente appartenenti alla specie *Metschnikowia pulcherrima*, sono invece dotati del carattere killer.

Anche le microvinificazioni, su mosto contenente il 26% di zuccheri, hanno evidenziato differenze significative tra i lieviti oggetto di questo studio.

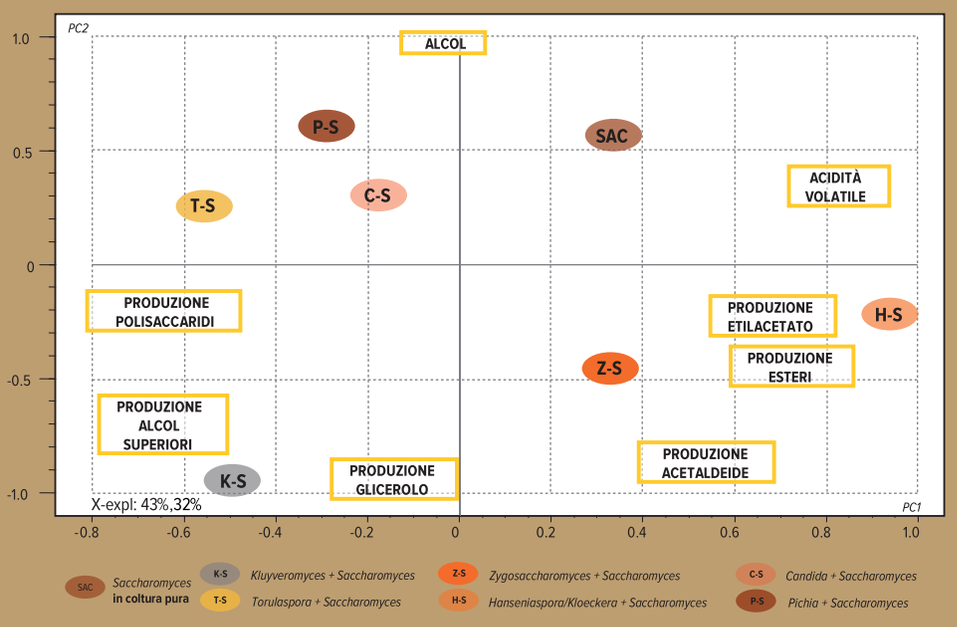
Il grafico 1, che riporta i risultati delle microvinificazioni elaborati mediante analisi delle componenti principali (PCA), evidenzia l'ampia biodiversità esistente all'interno dei generi e delle specie considerate. Il differente posizionamento dei lieviti in funzione dei principali caratteri esaminati (con il 65% della variabilità complessiva spiegata) si ha lungo la prima componente principale, in relazione soprattutto alla velocità fermentativa e alla produzione di alcol e di SO_2. Sulla seconda componente principale i lieviti sono invece differenziati soprattutto sulla base della produzione di acido acetico e di polisaccaridi totali. I lieviti appartenenti ai generi *Pichia, Hanseniaspora* e *Candida* sono quasi completamente raggruppati nei quadranti a

LE PERFORMANCE DEI NON-*SACCHAROMYCES* IN COLTURA PURA



Graf. 1 - Analisi delle Componenti Principali (PCA) dei fermentati ottenuti con inoculi in coltura pura di lieviti non-*Saccharomyces*.

LE PERFORMANCE DEGLI INOCULI MISTI



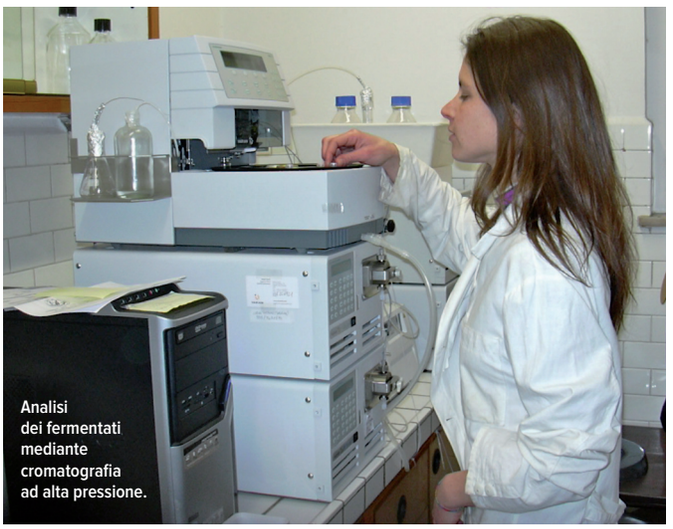
Graf. 2 - Analisi delle Componenti Principali (PCA) dei fermentati ottenuti con inoculi misti non-*Saccharomyces*/Saccharomyces

Dal laboratorio alla cantina

Il Consorzio Tuscania è una struttura di ricerca applicata nata per iniziativa di alcune importanti aziende del settore vitivinicolo. Su istanza delle necessità di innovazione e approfondimento delle aziende socie, il Consorzio ha attivato undici diverse Linee di Ricerca nelle quali coinvolge e finanzia le strutture di ricerca istituzionali (Università e Istituti di ricerca) collaborando attivamente nelle fasi di validazione applicativa (che avvengono nei vigneti e nella Cantina Sperimentale del Consorzio). L'obiettivo è quello di produrre un risultato applicativo utilizzabile nelle aziende che hanno voluto il progetto e contemporaneamente quello di avvicinare il mondo della ricerca alla realtà e alle esigenze del mondo della produzione. Nella linea di ricerca *Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego degli inoculi misti* si sono unite le competenze dei gruppi di ricerca di microbiologia enologica che più in Italia hanno sviluppato le conoscenze sui lieviti indigeni non-*Saccharomyces*. Nella fase finale di convalida applicativa di questo studio i lieviti non-Saccharomyces ritenuti più promettenti sulla base dei risultati sino a oggi ottenuti verranno impiegati in fermentazioni multistarter, ossia in associazione con un ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae*, su scala industriale nella vendemmia 2010 presso la Cantina Sperimentale del Consorzio Tuscania.

sinistra del diagramma, a conferma della bassa produzione di alcol che normalmente li caratterizza. Tuttavia alcuni di essi (C69, P9 e H32) si differenziano da quelli del genere di appartenenza in termini sia di velocità fermentativa sia di potere fermentativo e producono fermentati contenenti fino a 6-7 gradi alcolici.

Un'analoga differenziazione tra i lieviti è stata riscontrata rispetto anche ad altri parametri di valutazione, quali per esempio la produzione di acido acetico. Come prevedibile, la gran parte dei lieviti appartenenti ai generi *Pichia* e *Hanseniaspora*, normalmente produttori di elevate quantità di acido acetico, sono collocati nei quadranti a sinistra specialmente in quello superiore. È possibile tuttavia riscontrare eccezioni anche tra i lieviti ascritti a questi generi. Infatti P9 e H25 si distaccano dai gruppi di appartenenza proprio in virtù della loro minore produzione di acido acetico. Nei quadranti a destra invece è possibile localizzare la maggior parte dei lieviti appartenenti ai generi *Torulaspora* e *Kluyveromyces*, notoriamente caratterizzati da basse produzioni di acido acetico, e ai generi *Metschnikowia* e *Saccharomycodes*. Per quanto riguarda la produzione di polisaccaridi (espressi come mannoproteine) il ceppo P4, appartenente al genere *Pichia*, e il ceppo K101, appartenente al genere *Kluyveromyces*, si caratterizzano per la produzione di quantità di polisaccaridi 2-3 volte superiori rispetto alla media degli altri lieviti.



Analisi dei fermentati mediante cromatografia ad alta pressione.

PROVE DI COINOCULO

I lieviti non-*Saccharomyces* ritenuti più promettenti sulla base delle indagini sopra descritte sono stati valutati in fermentazioni multistarter con un ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae*.

Un esempio dell'influenza dei lieviti non-*Saccharomyces* nelle fermentazioni multistarter, rispetto a quelle condotte in purezza con il solo ceppo di *Saccharomyces*, è riportato nel grafico 2. Anche in questo caso, l'elaborazione mediante PCA dei risultati analitici ottenuti evidenzia la produzione di fermentati con caratteristiche significativamente differenti non solo in base alla presenza ma anche alla tipologia di lievito non-*Saccharomyces* impiegato in coinoculo. A completo esaurimento degli zuccheri, i fermentati derivati dal coinoculo di *S. cerevisiae* con *Pichia, Candida, Torulaspora* e *Kluyveromyces* sono caratterizzati da un maggiore contenuto di polisaccaridi mentre quelli in cui *S. cerevisiae* è in associazione con *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces* presentano una maggiore concentrazione di sostanze volatili, in particolare di esteri.

STARTER MISTI NELL'ENOLOGIA DEL FUTURO?

In accordo con quanto riportato da altri Autori, questo studio preliminare conferma che la variabilità inter e intraspecifica dei lieviti non-*Saccharomyces* è assai ampia e costituisce un serbatoio di biodiversità dal quale attingere per l'individuazione di lieviti non-*Saccharomyces* da impiegare in coinoculo con *S. cerevisiae* per la formulazione di starter misti di fermentazione.

I risultati ottenuti dall'utilizzo di alcuni di questi lieviti non-*Saccharomyces* in coinoculo con ceppi starter di *S. cerevisiae* hanno in parte consentito di definire il contributo dei lieviti non-*Saccharomyces* alla fermentazione vinaria e le interazioni metaboliche che si instaurano tra le diverse colture microbiche in processi multistarter, informazioni importanti per la futura formulazione di starter misti da impiegare in vinificazione. ■

La Bibliografia può essere richiesta a costanza.fregoni@tecnichenuove.com

**Dipartimento di Biotecnologie Agrarie*
Università degli Studi di Firenze
***Dipartimento S.A.I.F.E.T*
Sez. di Microbiologia Alimentare, Industriale e Ambientale,
Università Politecnica delle Marche (Ancona)
****Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie*
e Biotecnologie Agro-Alimentari
Università degli Studi di Sassari
*****Consorzio Tuscania - Firenze*
Si ringrazia il Consorzio Tuscania per il supporto finanziario alla presente ricerca.