

NON SOLO SACCHAROMYCES

PHILIPPE RENAULT*.***,
MARYAM EHSANI**,
MARINA BELY***

PROVE DI FERMENTAZIONE CON INOCULO MISTO DI *TORULASPORA* E *SACCHAROMYCES* HANNO FORNITO RISULTATI PROMETTENTI. SOPRATTUTTO IN TERMINI DI ORIGINALITÀ DEL PRODOTTO

La diversità e l'originalità dei vini del mondo è ascrivibile a numerosi fattori. Tra questi i principali sono il terreno, il vitigno, le condizioni climatiche e le pratiche viticole, che devono essere tutti valorizzati nel processo di trasformazione del succo d'uva in vino. In cantina, la qualità del vino è espressione della sommatoria delle azioni dei diversi microrganismi che si sviluppano e si succedono dalla vendemmia fino al momento della messa in bottiglia. In questo processo è dunque fondamentale favorire lo sviluppo dei ceppi buoni ed evitare lo sviluppo delle specie

d'alterazione. *Torulaspora delbrueckii* è un lievito non-*Saccharomyces* naturalmente presente nel mosto e sull'uva, in letteratura già descritto come avente impatto positivo sulla qualità e la complessità dei vini e sulla pulizia della fermentazione, grazie a una produzione esigua di acidità volatile, acetaldeide, diacetile e acetoino. Inoltre questo lievito viene definito criofilo e termotollerante.

TORULASPORA IN FERMENTAZIONE

Al fine di valutare il potenziale enologico della specie *Torulaspora delbrueckii*, abbiamo inizialmente realizzato uno studio di caratterizzazione a partire da una collezione di 30 ceppi, da noi isolati nell'ambito di fermentazioni spontanee, sui quali sono state condotte diverse prove su substrato sintetico simulante la composizione di un mosto bianco. Se è vero che la resa media in etanolo (rapporto zucchero/etanolo) calcolata a fine fermentazione alcolica, a parità di condizioni, è equivalente a quella di *S. cerevisiae,* è altrettanto vero che si è messa in evidenza una grande variabilità fenotipica tra i diversi ceppi di *T. delbrueckii* testati. Le attitudini fermentative valutate, considerando durata della fase di latenza, durata della fermentazione e produzione di alcol, sono molto differenti tra i ceppi.

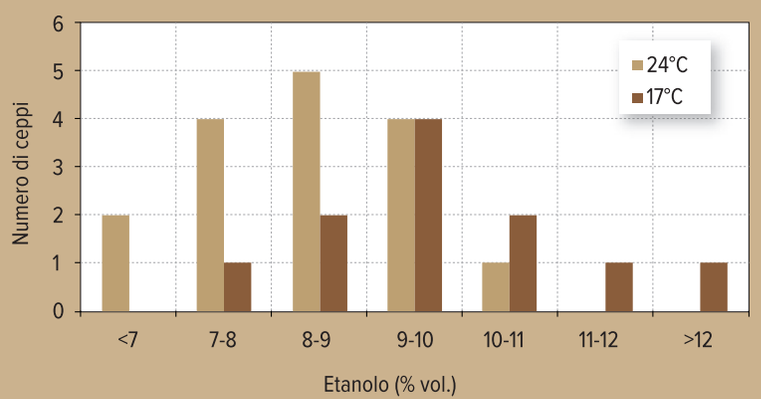
Questi tre parametri sono assai importanti in prospettiva di una selezione industriale.

La **fase di latenza** deve essere la più corta possibile per assicurare una buona partenza in un momento in cui vi è forte competizione da parte dei microrganismi del mosto. Le prime prove di fermentazione sono state condotte substrato sintetico a 240 g/l a 17 e 24°C. In queste condizioni la durata della fase di latenza dei diversi ceppi ha avuto variazioni tra 20 e 150 h a 24°C e tra 50 e 160 h a 17°C. Si è dunque evidenziata una certa variabilità.

La **produzione massima di etanolo** nelle stesse condizioni varia da 8 a 12% vol. a 17°C e tra 7 e 11% vol. a 24°C (grafico 1). Questa produzione di etanolo, oltre la quale il lievito si blocca, anche se inferiore a quella di *S. cerevisiae* è comunque degna di nota per un lievito non-*Saccharomyces*.

La variabilità fenotipica si evidenzia anche dalla **produzione di acidità volatile (AV) e di glicerolo**. La produzione di questi composti è stata valutata su tre substrati sintetici con diversa concentrazione di zuccheri (120, 240 e 350 g/l) e confrontata con quella di due ceppi di *S. cerevisiae*: Zymaflore ST, lievito basso produttore di AV normalmente impiegato nella produzione di vini liquorosi, e SB (ceppo sperimentale Univ. Bordeaux), alto produttore di AV. Qualunque sia il tenore iniziale in zuccheri, si evidenziano dif-

IL POTERE ALCOLIGENO DI *TORULASPORA*



Graf. 1 - Distribuzione dei ceppi di *T. delbrueckii* in classi a seconda della loro capacità di produrre etanolo a 17°C (n=11) e a 24°C (n=16) su substrato sintetico a 240 g/l di zuccheri.

Alcuni buoni, altri meno

La vinificazione è un processo microbiologico assai complesso e la microflora che interviene riveste un ruolo determinante nella qualità e complessità dei vini. Nell'ambito di una fermentazione spontanea, a carico della flora indigena, durante la fase pre-fermentativa e all'inizio della fermentazione alcolica sono i lieviti non-*Saccharomyces* che predominano nel mosto. Successivamente i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* colonizzano completamente l'ambiente e si fanno carico di portare a termine la fermentazione. Lo sviluppo di certi lieviti non-*Saccharomyces* durante le fermentazioni spontanee può pregiudicare la qualità del prodotto finito (*Brettanomyces bruxellensis, Zygosaccharomyces baili*...) mentre altri lieviti non-*Saccharomyces* si dimostrano interessanti per l'intensità e la complessità aromatica che sviluppano, contribuendo favorevolmente all'espressione della tipicità dei vini. Il loro apporto tuttavia varia non solo in funzione del genere e della specie ma anche del ceppo.



Reidratazione di LSA per il successivo inoculo nel mosto.

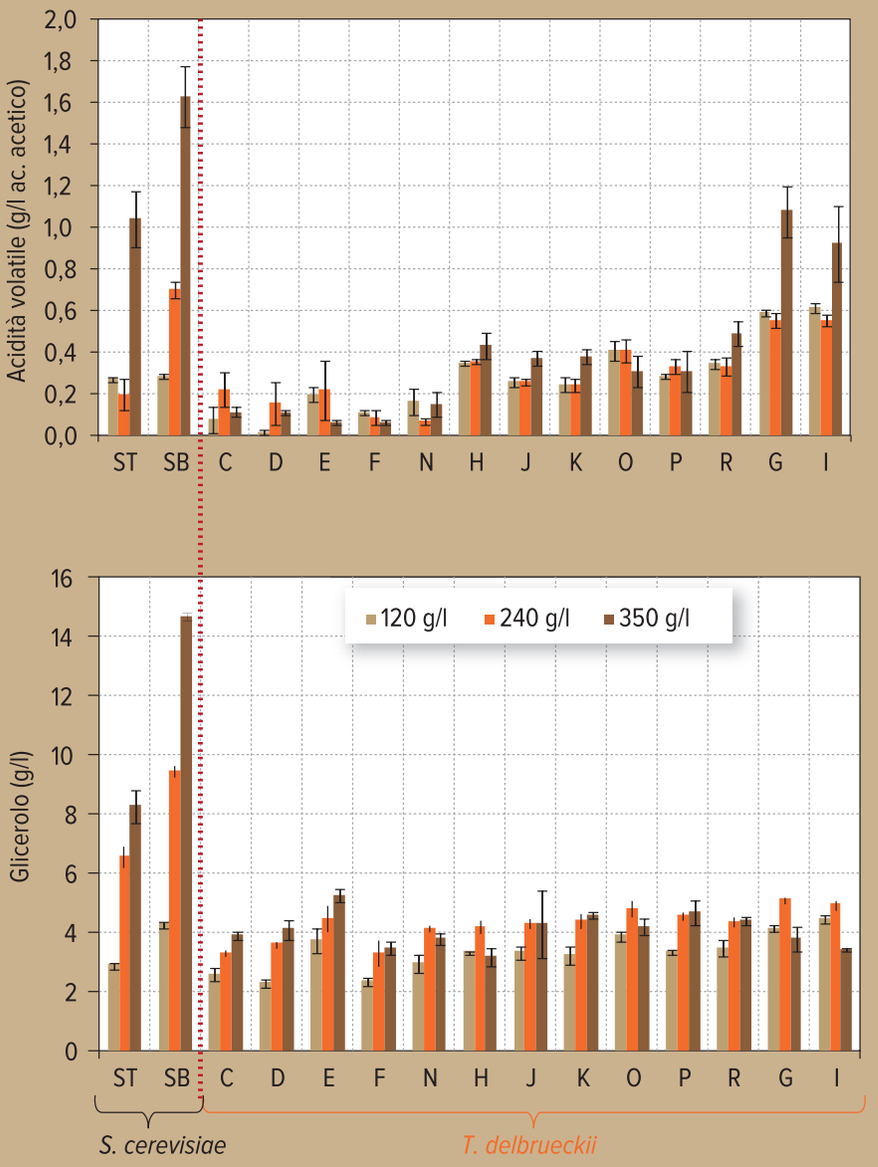
ferenze significative tra i diversi ceppi di *T. delbrueckii* sia nella produzione di AV sia in quella di glicerolo. La produzione media di questi due composti è simile per i due lieviti nel substrato a bassa concentrazione di zuccheri, ma inferiore per *T. delbrueckii* nei substrati a 240 e 350 g/l di zuccheri (grafico 2). Sul substrato a 350 g/l di zuccheri la maggioranza dei ceppi di *T. delbrueckii* testati ha una produzione di AV nettamente inferiore a quelle di *S. cerevisiae* (ceppo ST), nonostante si tratti di un ceppo a bassa produzione. Questi risultati mostrano chiaramente che *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* hanno risposte differenti allo stress osmotico. Per il secondo la risposta si traduce sistematicamente in una maggiore produzione di AV e glicerina, mentre *T. delbrueckii* si comporta diversamente. Questa proprietà tecnologica è molto interessante, soprattutto nella produzione di vini liquorosi ove le pressioni osmotiche sono elevate e il rischio di AV è elevato. In questi lavori si è inoltre visto che *T. delbrueckii* produce basse concentrazioni di alcuni composti olfattivamente negativi come **H_2S e fenoli volatili**. Ciò spiega la maggiore franchezza riscontrata nei vini. La produzione di fenoli volatili da parte dei differenti ceppi è stata misurata (metodo Chatonnet *et al.*, 1993) e confrontata con quella di due ceppi di *S. cerevisiae*, uno POF(+) (rif. positivo) e uno POF(-) (rif. negativo). Nelle condizioni sperimentali il ceppo POF(+) ha prodotto dieci volte in più di fenoli volatili del ceppo POF(-) (Zymaflore VL1), rispettivamente 27 mg/l e 2,6 mg/l. La produzione media di *T. delbrueckii* è stata di 1,9 mg/l, dunque inferiore al riferimento negativo, con ceppi che producono fino a 23 volte in meno di fenoli volatili rispetto al ceppo di *Saccharomyces* POF(-). Inoltre nessun ceppo di *T. delbrueckii* ha prodotto 4-etil-fenolo e 4-etil-guaiacolo.

Un altro punto importante, prevedendo un impiego industriale, è che tutti i ceppi testati sono insensibili al **fattore Killer K2** prodotto da numerosi *S. cerevisiae*, e non sono in grado di produrre questa tossina. Ciò significa che sono compatibili con tutti i *S. cerevisiae*.

L'INOCULO MISTO

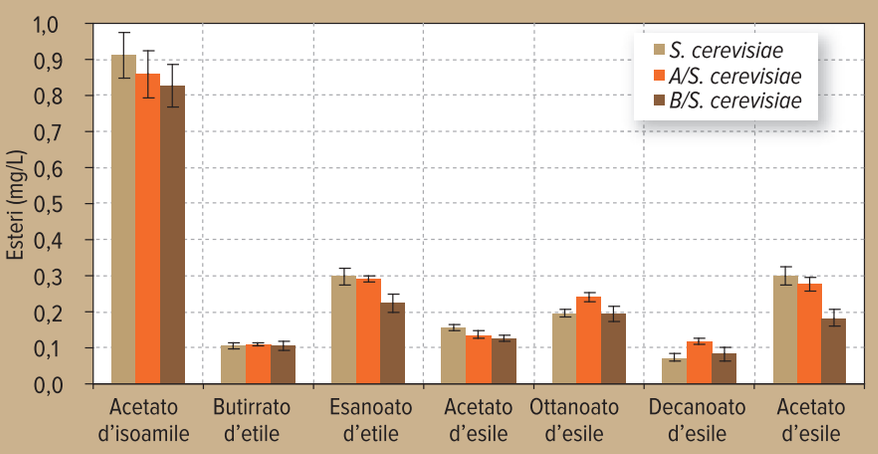
Il potere alcoligeno di *T. delbrueckii* è minore di quello di *S. cerevisiae*, pertanto le fermentazioni

SACCHAROMYCES E *TORULASPORA* A CONFRONTO



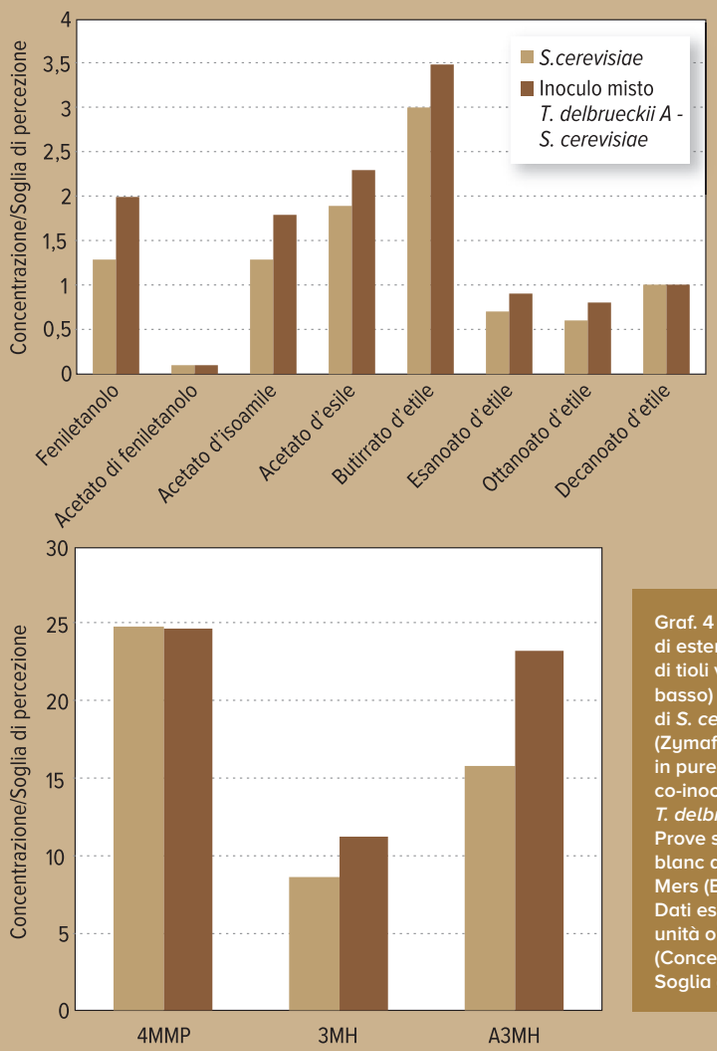
Graf. 2 - Produzione di acidità volatile e di glicerolo a 24°C per 13 ceppi di *T. delbrueckii* e 2 *S. cerevisiae*. Media di 3 ripetizioni.

LE PROVE SU SAUVIGNON DI SANCERRE



Graf. 3 - Produzione dei 7 principali esteri da parte del ceppo di *S. cerevisiae* in purezza e in co-inoculo con i ceppi di *T. delbrueckii* A e B. Fermentazione condotta su mosto Sauvignon di Sancerre a 18°C. Media di 2 ripetizioni.

LE PROVE SU SAUVIGNON DI ENTRE DEUX MERS



Graf. 4 - Produzione di esteri (in alto) e di tioli volatili (in basso) da parte di *S. cerevisiae* (Zymaflore X5) in purezza e in co-inoculo con *T. delbrueckii* A. Prove su Sauvignon blanc di Entre deux Mers (Bordeaux). Dati espressi in unità olfattive (Concentrazione/ Soglia di percezione).

difficilmente arrivano a esaurimento totale degli zuccheri. Per poter sfruttare il metabolismo specifico di *T. delbrueckii* si possono però associare i suoi ceppi migliori con ceppi di *S. cerevisiae*, a garanzia della chiusura della fermentazione.

Il nostro studio sulla caratterizzazione della specie *T. delbrueckii* in condizioni enologiche ha permesso di selezionare ceppi interessanti adatti all'elaborazione di vini in associazione con *S. cerevisiae*. Nell'ambito delle nostre prove abbiamo lavorato con inoculi misti, sia in co-inoculo sia con inoculi sequenziali delle due specie. Il primo approccio consiste nell'introdurre i due tipi di lievito nello stesso momento. In questo caso per favorire l'avvio della fermentazione da parte del non-*Saccharomyces* si inocula quest'ultimo a un tasso molto più elevato del ceppo di *S. cerevisiae*. Il secondo approccio, detto sequenziale, consiste nell'introduzione del *cerevisiae* 24-48 ore dopo l'avvio dell'attività fermentativa da parte della *Torulaspora*. In questo articolo presentiamo i risultati ottenuti da fermentazioni con inoculo misto (co-inoculo), associando un ceppo di *S. cerevisiae* a diversi ceppi di *T. delbrueckii* in condizioni di laboratorio e di cantina, nella produzione di vini bianchi secchi, rosati o liquorosi. Le fermentazioni sono state tutte portate a secco o, sui vini liquorosi, a 14% vol. La presenza di *T. delbrueckii* fino a termine fermentazione è sempre stata verificata per PCR, ciò a conferma della buona impiantazione del ceppo. In confronto a un testimone fermentato solo con *S. cerevisiae,* l'AV nelle diverse prove si è mantenuta più bassa del 15-45% a seconda del mosto e del ceppo utilizzato. Durante le numerose prove realizzate non sono state osservate differenze a livello di durata della fase di latenza tra le modalità con co-inoculo e le modalità di riferimento con solo *S. cerevisiae*. Anche la durata complessiva della fermentazione è confrontabile, fatte salve piccole variazioni legate al tipo di abbinamento.

Per illustrare gli effetti del co-inoculo *T.delbrueckii/ S. cerevisiae,* presentiamo i risultati di 4 prove realizzate nel 2009 in cantina su 2 vini bianchi secchi, 1 rosato e un vino liquoroso.

LE PROVE IN CANTINA

Su Sauvignon blanc di Sancerre

Questa prova è stata realizzata su un mosto di Sauvignon blanc (SB) di Sancerre allo scopo di valutare il potenziale aromatico di due ceppi di *T. delbrueckii* (A e B) in co-inoculo con un ceppo di *S. cerevisiae*. A fine fermentazione si è valutata la produzione di composti aromatici dosando diversi esteri (metodo Antalick *et al*., 2010).

Il grafico 3 riporta le concentrazioni dei 7 principali esteri. Il testimone, *S. cerevisiae* in purezza, è caratterizzato da una produzione importante di acetato di isoamile (banana) e di acetato di fenil-etile (rosa). Il co-inoculo con il ceppo A ha indotto una minore produzione di questi e un aumento della produzione di decanoato e ottanoato di etile (esteri floreali), rispettivamente del 64 e 23%. La produzione di butirrato di etile (ananas) è aumentata del 6%. L'inoculo misto con il ceppo B non ha indotto alcun aumento di produzione di questi 7 composti. Per gli altri 25 esteri analizzati, abbiamo osservato differenze nelle modalità co-inoculate, che per alcuni composti arrivano fino al 30%. L'impiego di ceppi di lievito di *T. delbrueckii* in co-inoculo con *S.cerevisiae* permette dunque di modificare la complessità aromatica dei vini bianchi. In questo caso specifico, la diminuzione di acetato d'isoamile (banana), avente un impatto aromatico netto e un po' banalizzante, e l'aumento di produzione di esteri con caratteri più fini e sfaccettati (floreali), hanno dato un risultato aromatico gradevole. Va tuttavia notato che la variabilità intraspecifica di *T. delbrueckii* si ritrova anche a livello di produzione di aromi fer-



Cantina sperimentale Sarco

mentativi. La composizione aromatica ottenuta con l'inoculo misto A appare più interessante di quella ottenuta con il ceppo B.

Su Sauvignon blanc di Entre deux Mers

Un'altra prova su Sauvignon blanc è stata condotta nella regione Entre deux Mers (Bordeaux) in co-inoculo con un altro *S. cerevisiae* (Zymaflore X5). La cinetica fermentativa del testimone, *S. cerevisiae* in purezza, è molto simile a quella del co-inoculo, anche se quest'ultima modalità impiega 1 giorno in più.

I risultati mostrano un aumento della produzione di 6 esteri sugli 8 analizzati (grafico 4, in alto). Si osserva anche una maggiore produzione di tio-



L'impiego di inoculi misti di *Saccahromyces cerevisiae* e lieviti non-*Saccahromyces* può modificare la complessità aromatica dei vini ottenuti.

li volatili, 3-mercapto esanolo (3MH, pompelmo e frutto della passione), e dell'acetato di 3-mercapto-esanolo (A3MH, gemma di cassis, frutto della passione; grafico 4 in basso). Ciò confermerebbe precedenti studi che mostrano come alcuni ceppi di *T. delbrueckii* abbiano una forte attitudine a liberare 3MH, contrariamente alla loro scarsa capacità di produrre 4-metil-4-mercaptopentan-2-one (4MMP, bosso e ginestra).

Su rosato di Merlot di Entre deux Mers

Queste prove hanno permesso di confrontare tre ceppi di *T. delbrueckii* in co-inoculo con un ceppo di *S. cerevisiae* (Zymaflore X16). Le cinetiche fermentative delle diverse tesi sono vicine, fatta eccezione per il ceppo Q, che presenta una cinetica più rapida, con 2 giorni di anticipo sulle altre. L'analisi dei profili aromatici dei tre diversi co-inoculi in confronto al testimone (*S.cerevisiae* in purezza) mostra differenze interessanti (grafico 5). Nelle condizioni di prova il ceppo A, rispetto al *S. cerevisiae*, ha prodotto più fenil etanolo (rosa, floreale), butirrato di etile (ananas, frutti rossi) e leggermente più di acetato d'isoamile (banana). Anche il ceppo S produce più fenil etanolo, decanoato d'etile (floreale) e leggermente meno d'acetato d'isoamile. Per il resto non si discosta dal *S. cerevisiae*.

Il ceppo Q, quello più rapido, mostra una produzione di esteri inferiore o uguale al *Saccharomyces*, fatta eccezione per il butirrato di etile.

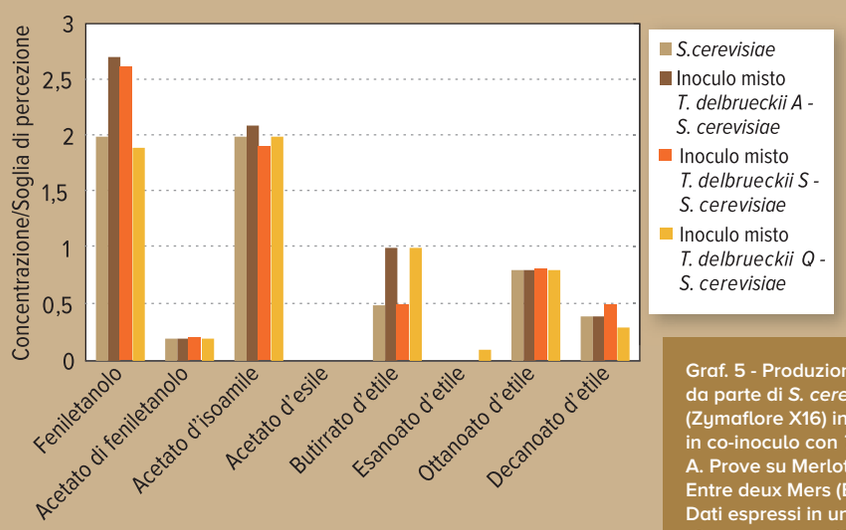
Questi risultati confermano la variabilità intraspecifica di *T. delbrueckii* per la produzione di aromi. Alla degustazione, una caratteristica qualitativa evidenziata sui vini ottenuti con le tesi co-inoculate è stata la maggiore percezione di volume in bocca. La causa di questo effetto non è al momento spiegata.

Su vino liquoroso

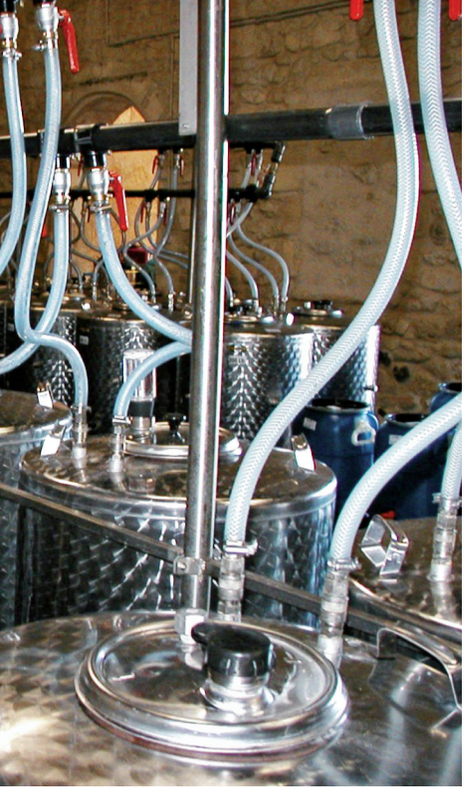
Un primo esperimento è stato realizzato in una cantina della denominazione Sauternes.

L'obiettivo era studiare la produzione di AV in un mosto di Semillon ricco in zuccheri (358 g/l, ossia 22,2% vol. potenziali) in condizioni reali di vinificazione (fermentazione in barrique nuove), partendo con un co-inoculo misto *S.cerevisiae/ T. delbrueckii*, oltre a verificarne l'impatto aromatico all'analisi sensoriale. La temperatura del mosto a inizio fermentazione era di 20°C. Si sono seguiti due diversi protocolli: una tesi di riferimento con fermentazione condotta unicamente da *S. cerevisiae* (ceppo Zymaflore ST) e una tesi con co-inoculo (*T. delbrueckii* ceppo A/*S. cerevisiae* ceppo ST). Come nelle altre prove, la presenza di *T. delbrueckii* è stata confermata con PCR. Le cinetiche di fermentazione delle due tesi sono state simili. Per contro, la produzione di AV nella modalità con co-inoculo è risultata net-

LE PROVE SU MERLOT DI ENTRE DEUX MERS



Graf. 5 - Produzione di esteri da parte di *S. cerevisiae* (Zymaflore X16) in purezza e in co-inoculo con *T. delbrueckii* A. Prove su Merlot rosé di Entre deux Mers (Bordeaux). Dati espressi in unità olfattive (Concentrazione/Soglia di percezione).



tamente inferiore (18% in meno).
In una seconda prova realizzata su un mosto liquoroso con 370 g/l di zuccheri (ossia 23,4% vol. potenziali), nella tesi con co-inoculo è stata osservata una diminuzione di AV del 34% rispetto al testimone. Questo ulteriore abbattimento dell'AV è ascrivibile alla diversa gestione della temperatura. Con un panel di 20 degustatori esperti è stato realizzato, sui prodotti della prima prova, un test triangolare, che ha confermato differenze significative tra il testimone e la modalità con co-inoculo. All'analisi sensoriale descrittiva (panel di 12 degustatori esperti) si sono evidenziati caratteri interessanti.
A livello olfattivo il vino ottenuto dal co-inoculo è risultato più intenso, con note più marcate di frutti freschi e frutti canditi, note agrumate e floreali, ma anche con note boisé più nette. Nel complesso è stato giudicato più complesso rispetto al testimone. A livello gustativo viene percepita una sostanziale differenza di volume in bocca: il campione co-inoculato è ritenuto più grasso. La percezione aromatica in bocca appare superiore, anche se la differenza è meno evidente. Il vino ottenuto dall'inoculo misto è apprezzato per la sua maggiore complessità. Da queste prove si deduce che l'inoculo misto *T. delbrueckii/S. cerevisiae* permette di ottenere vini più complessi, con AV ridotta di almeno 1/3.

PERCHÉ FUNZIONA

Nell'ambito di questi lavori abbiamo voluto valutare l'interesse enologico di un lievito non-*Saccharomyces*, la *Torulaspora delbrueckii*. In un primo momento abbiamo messo in evidenza una grande variabilità fenotipica all'interno di questa specie. Alcuni ceppi di *T. delbrueckii* permettono d'avere, durante la fermentazione, una produzione di acidità volatile (AV) assai contenuta. Inoltre abbiamo dimostrato che *T. delbrueckii* è caratterizzata da una bassa produzione di fenoli volatili, inferiore a quella di ceppi di *S. cerevisiae* POF(-). In un secondo tempo, in seguito alla valutazione di diversi parametri tecnologici – durata della fase di latenza, durata della fermentazione, resistenza all'alcol, resistenza alla SO_2, sensibilità al fattore Killer K2 – abbiamo potuto selezionare ceppi enologicamente interessanti da applicare in associazione con *S. cerevisiae*. È stato quindi dimostrato che l'inoculo misto delle due specie permette di garantire la chiusura delle fermentazioni, di modificare la complessità aromatica dei vini e di apportare maggiore lunghezza in bocca. ■

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

*SARCO, filiale de recherche du groupe LAFFORT– BP 40, 33072 Bordeaux (France)
**LAFFORT - BP 17, 33072 Bordeaux cedex (France)
***Université Bordeaux, UMR 1219, INRA, ISVV Villenave d'Ornon, 33140 (France)
Gli autori ringraziano Chateaux Goudichaud, La Tour Blanche e Cantegril per aver permesso la realizzazione di queste prove.

Tenore zuccherino
Temperatura
pH
Acidità totale
Tenore antociani
Estraibilità antociani

L'acino é nudo

stazioni analisi serie WS
L'eccellenza dei più moderni, completi e affidabili centri di analisi del mosto



sistemi analisi serie WP
Gli esclusivi sistemi di analisi direttamente sul prelevacampioni. Velocità e praticità.



sistemi campionamento serie WT
Una gamma completa e articolata per ogni esigenza di prelievo uva al conferimento



relco instruments
The art of analysing

Via Sabin, 1/A - 43123 Pilastrello - PARMA - ITALY
Tel. +39 0521 641780 - Fax +39 0521 643886
info@relcoinstruments.com - www.relcoinstruments.com