

Strategie enologiche per l'ottenimento di spumanti di qualità: la scelta dei lieviti

**Enrico Vaudano, Antonella Costantini,
Laura Pulcini, Emilia Garcia-Moruno**

Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (CREA-VE) - Asti

Negli ultimi anni è nato molto interesse nei confronti dei lieviti e della loro naturale variabilità metabolica, con l'obiettivo di puntare su una maggiore distinzione stilistica dei vini. La possibilità di discriminare i ceppi di *S. cerevisiae* è di fondamentale importanza per valutare il processo fermentativo ed individuare le relazioni tra aspetti microbici e qualità del vino ottenuto. Presso il CREA-VE di Asti è stato messo a punto un metodo molto rapido per la selezione dei ceppi ecotipici e l'analisi di dominanza dei ceppi inoculati.

L'importanza dei microrganismi nel settore enologico è ben conosciuta dalla fine del secolo diciannovesimo grazie ai lavori di Luis Pasteur, che per primo dimostra nel 1870 che la fermentazione è opera dei lieviti.

Qualche anno dopo, nel 1884, Christian Hansen introduce la fermentazione in purezza nella birra e, posteriormente, questa pratica viene estesa al vino quando, nel 1890, Hermann Müller-Thurgau propone l'inoculo di lieviti selezionati.

È interessante ricordare che nei primi anni di storia della microbiologia moderna, alla fine del diciannovesimo secolo, i ricercatori della Regia Stazione Sperimentale di Asti conducono diverse ricerche tra cui *"Esperienze di fermentazione con lieviti purificati e selezionati"* pubblicata da Ravizza nel 1892 [1].

Nel 1965 vengono commercializzati i primi due lieviti in forma di LSA (lievito secco attivo) che semplificano notevolmente la conservazione e la distribuzione. Da quel momento l'utilizzo di lieviti selezionati per la fermentazione appartenenti principalmente alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, si diffonde in tutto il mondo, grazie a innegabili vantaggi tra cui i principali sono l'ottenimento di una fermentazione alcolica più sicura, vale a dire con meno rischi di blocchi o rallentamenti, oltre ad una riduzione della variabilità delle caratteristiche qualitative dei vini dipendente dall'annata.

Negli ultimi anni si assiste ad un rinascere dell'interesse nei confronti dei lieviti e alla loro naturale variabilità metabolica con l'obiettivo di puntare sulla diversificazione e una maggiore distinzione stilistica dei vini [2][3][4]. Fondamentale per riuscire ad approfondire questi aspetti è stata l'introduzione delle tecni-

che di biologia molecolare o tecniche di analisi del DNA, che permettono di distinguere il singolo ceppo (singolo "individuo") da altri ceppi della stessa specie.

I presupposti di tale rinnovato interesse sono da ricercarsi nell'evoluzione qualitativa della moderna enologia. Essa, soprattutto se rivolta a prodotti ad alto valore aggiunto, sta diventando, infatti, sempre più indirizzata all'utilizzo di pratiche e prodotti specifici a seconda del tipo di vitigno e vino.

Il dibattito tra due diverse visioni microbiologiche della fermentazione, spontanea e guidata, si inserisce in questa evoluzione enologica, anche grazie a conoscenze recentemente acquisite che hanno rivelato come alcune specie non-*Saccharomyces* presenti nella microflora dell'uva possono influenzare in modo positivo il prodotto finale.

È però vero che, a fronte dei rischi di una certa standardizzazione con ceppi selezionati, non si può contrapporre una pratica di fermentazione totalmente affidata al caso con rischi di arresti fermentativi e deviazioni olfattive. Il compromesso sembra essere rappresentato, almeno per quanto riguarda la specie dominante la fermentazione, *Saccharomyces cerevisiae*, dalla selezione di ceppi ecotipici, presenti cioè in un determinato ambiente viticolo, da utilizzare per la produzione dei vini del territorio.

Risultati sperimentali interessanti per l'industria spumantistica

La possibilità di discriminare i ceppi di *S. cerevisiae* è di fondamentale importanza per valutare il processo

fermentativo ed individuare le relazioni tra aspetti microbici e la qualità del vino ottenuto. Le tecniche di distinzione intraspecifica attualmente più utilizzate sono basate su metodologie molecolari; presso il CREA-VE di Asti è stato messo a punto un metodo molto rapido basato sull'analisi dei polimorfismi della lunghezza di loci microsatellitari [5], sequenze ripetute che contengono un numero variabile di unità ripetitive.

Il metodo consiste nell'estrazione di DNA delle singole colonie e amplificazione di tre loci altamente polimorfici, SC8132X, SCYOR267C e SCPTSY7 situati rispettivamente sui cromosomi XVI, XV, XIII. Gli amplificati vengono poi sottoposti a separazione con elettroforesi su gel di agarosio ottenendo una serie di profili, diversi per ogni ceppo, che rappresentano una sorta di impronta digitale genetica. I profili ottenuti sono processati con il software *Bionumerics*TM, che permette la raccolta dei dati e la comparazione dei risultati ottenuti da ogni lievito e l'analisi della relativa similitudine.

Oltre che nella selezione dei ceppi ecotipici già accennata, il metodo trova numerose altre applicazioni; una di queste è l'analisi di dominanza dei ceppi inoculati.

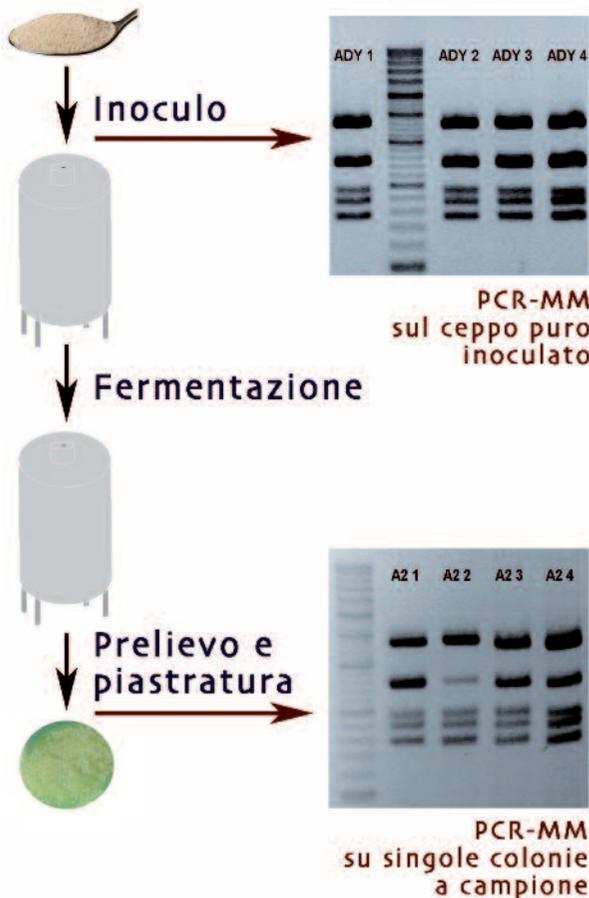


Figura 1 - Schema di lavoro per l'analisi di dominanza.

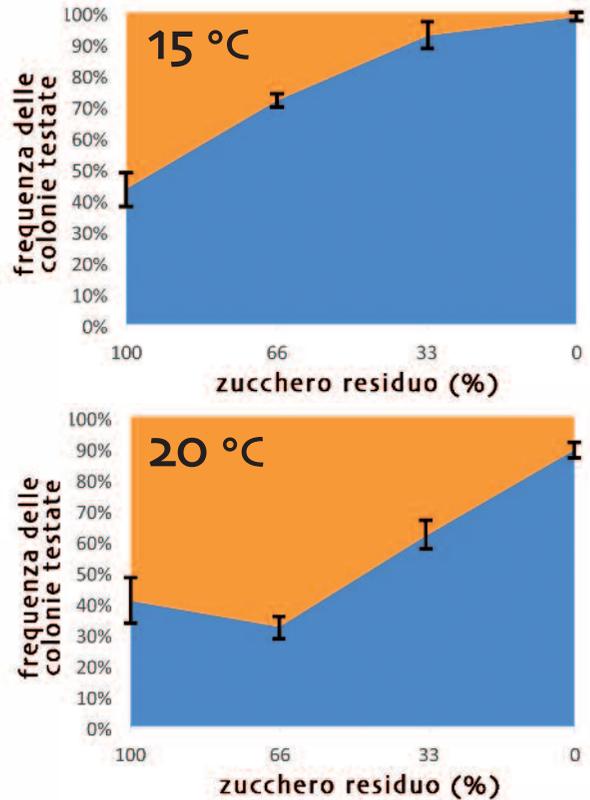


Figura 2 - Prove di competizione con due ceppi di *S. cerevisiae* in fermentazioni a diversa temperatura (15 °C e 20 °C).

Analisi di dominanza dei ceppi inoculati

Lo schema di lavoro è rappresentato in Figura 1; in sintesi, il protocollo si basa sulla diluizione e piastratura su terreno di coltura agarizzato, del vino a fine fermentazione. Le colonie, cresciute su piastra, vengono campionate in numero statisticamente definito e sottoposte all'analisi dei microsatellitari per identificare e separare i ceppi.

La dominanza si valuta confrontando i profili microsatellitari dei ceppi isolati a fine fermentazione con il profilo del ceppo starter.

Utilizzando questo protocollo è possibile esaminare, in laboratorio, il comportamento di diversi ceppi in funzione delle condizioni ambientali, verificando quindi a priori le capacità competitive dei ceppi che saranno utilizzati in cantina.

La Figura 2 mostra i risultati ottenuti nelle prove di competizione tra due ceppi in funzione della temperatura; un test utile, ad esempio, nella scelta di un ceppo per fermentazione in bianco. Come si può vedere nei grafici in figura, il ceppo evidenziato in colore azzurro domina la fermentazione in tutti e due i casi, in particolare alla temperatura di 15 °C.

Prove di questo tipo sono utili per scegliere il ceppo giusto in funzione delle condizioni di fermentazione in cui l'enologo si viene a trovare, verificare la correttezza

delle pratiche di inoculo e ottimizzare l'uso degli starter che, in ultima analisi, rappresentano un investimento cospicuo in cantina.

L'influenza del ceppo di lievito nella trasformazione dei terpeni

Durante la fermentazione alcolica i lieviti possono interagire con alcuni monoterpenoli, responsabili del profumo caratteristico di alcune varietà di uve aromatiche o semi-aromatiche, trasformandoli o metabolizzandoli. Queste reazioni si sommano a quelle chimiche, catalizzate dal mezzo acido, in cui i terpenoli si trovano.

Particolarmente interessanti dal punto di vista applicativo, risultano le trasformazioni biologiche del geraniolo. Il geraniolo (2-trans-3,7-dimetilotta-2,6-dien-1-olo) è il principale alcole monoterpeneo presente in alcune varietà aromatiche a bacca rossa quali Brachetto e Malvasia di Casorzo e nel Traminer aromatico. Durante la fermentazione alcolica la concentrazione del geraniolo diminuisce in modo drastico; una parte viene trasformata in linalolo e α -terpineolo per isomerizzazione e ciclizzazione indotta dall'acidità del mosto, mentre *S. cerevisiae*, attraverso un meccanismo di riduzione stereospecifica, può trasformarlo in citronellolo. Il lievito catalizza anche la formazione dei composti acetilati, geranil acetato e citronellil acetato [6]. Buona parte della qualità aromatica di questi vini cosiddetti "a base geraniolo" è proporzionale alla quantità del geraniolo residuo e del citronellolo neofornato.

Il destino del geraniolo non viene però interamente spiegato dai due meccanismi di trasformazione visti sopra in quanto buona parte viene degradato senza formazioni di quantità corrispondenti di altri terpenoli. Dai nostri risultati sperimentali (Figura 3), alla fine della fermentazione la somma dei monoterpenoli prodotti e del geraniolo residuo arriva, nel migliore dei casi, al 40% della quantità iniziale del geraniolo [7] [8].

La via biosintetica degli steroli può essere responsabile della degradazione del geraniolo: partendo dall'acetil Co-A attraverso il ciclo dell'acido mevalonico, essa porta alla formazione di steroli indispensabili

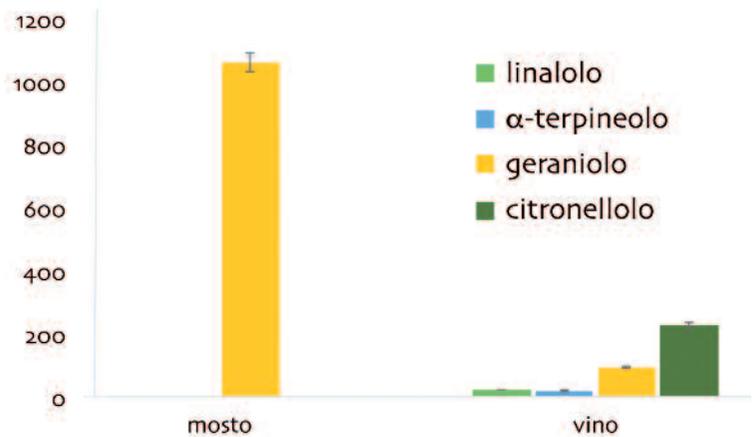


Figura 3 - Produzione di terpenoli ($\mu\text{g/L}$) da parte del lievito *S. cerevisiae* in una fermentazione di mosto sintetico addizionato di geraniolo.

alla crescita cellulare. Tra gli intermedi di questo metabolismo è presente il geraniolo nella forma attiva di geranil-pirofosfato che quindi potrebbe essere metabolizzato in questa via.

In sintesi, l'ipotesi è, quindi, che il geraniolo sia il substrato di due reazioni antagoniste mediate dai lieviti: in una via il geraniolo si trasforma in citronellolo, mentre nella seconda viene incorporato nella biosintesi dei composti steroidi (Figura 4).

L'osservazione sul consumo del geraniolo e sulla produzione di citronellolo in condizioni di ossigenazione del mosto in fermentazione (che induce la formazione di steroli), o di supplementazione di ergosterolo [7] [9], porta a confermare che il destino del geraniolo sia regolato da modificazioni del metabolismo steroideo. Nelle condizioni di alti livelli di ergosterolo o di buona ossigenazione del mosto, secondo l'ipotesi suggerita,

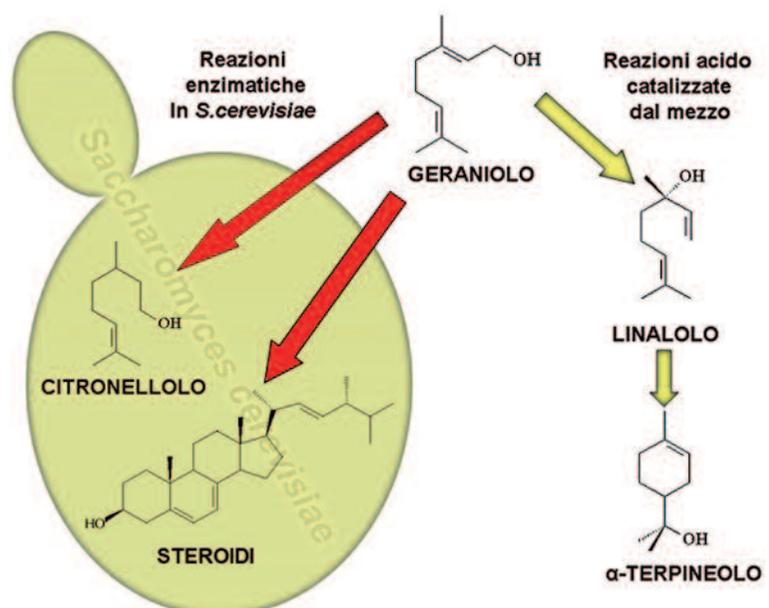


Figura 4 - Destino del geraniolo durante la fermentazione alcolica.

l'incorporamento del geraniolo nella via biosintetica degli steroli è rallentato, a favore della sua trasformazione in citronellolo.

La forte dipendenza del destino del geraniolo dalle condizioni metaboliche del lievito, in particolare dalla composizione del mosto e dalle condizioni di fermentazione, fanno dedurre che esista anche una forte influenza del ceppo di lievito utilizzato. Questa influenza è dipendente dalle differenze genetiche che esistono fra i ceppi e che si riflettono in differenze di metabolismo.

I nostri studi [7] [10] hanno dimostrato, infatti, che diversi ceppi di lievito mostrano differenti comportamenti nei riguardi del consumo di geraniolo e della produzione di citronellolo, probabilmente a causa di differenze metaboliche legate alle vie biosintetiche viste sopra. Durante la fermentazione dei mosti aromatici con componente principale il geraniolo, il ceppo di lievito risulta quindi essere un fattore determinante per la qualità dei vini ottenuti.

Tra i ceppi esaminati, il ceppo ISE99 (ceppo della collezione di microrganismi di ambiente viticolo enologico del CREA-VE di Asti) ha dimostrato ottime caratteristiche in fermentazione nei riguardi del metabolismo del geraniolo: queste capacità sono state rilevate prima in laboratorio e successivamente confermate in fermentazioni in scala pilota e industriale utilizzando mosto di Brachetto.

Il ceppo ISE99 ha dimostrato, nella prova in scala pilota (20 L), migliori caratteristiche rispetto al ceppo commerciale utilizzato normalmente, determinando una concentrazione superiore della somma dei composti geraniolo e citronellolo pari al 6% nella simulazione di una spumantizzazione e del 17% nella produzione di

un vino secco con l'esaurimento totale degli zuccheri. I dati sono stati confermati in un primo test preliminare in scala industriale, la vinificazione di due aliquote di uve Brachetto per la produzione di un mosto parzialmente fermentato (fino a 3,5% alcool) ha visto la tesi fermentata con il ceppo ISE99 conservare maggiormente la componente aromatica, con una concentrazione dei maggiori terpenoli maggiore del 20% circa rispetto al testimone vinificato con il ceppo commerciale (Figura 5).

L'influenza del ceppo di lievito nella formazione degli esteri durante la fermentazione

Gli aromi sono, da un punto di vista chimico e biochimico, tra i composti di maggiore complessità tra quelli presenti nel vino.

Centinaia di molecole diverse contribuiscono al profilo aromatico di un vino a partire da tre diverse origini. Gli aromi primari che derivano dall'uva: varietà, condizioni colturali e maturità; gli aromi secondari, formati durante il processo di vinificazione, principalmente durante la fermentazione, e gli aromi terziari che si formano durante la maturazione e l'invecchiamento del vino.

Il lievito contribuisce maggioritariamente agli aromi secondari del vino, con decine di composti formati a partire da diversi intermediari nella via della degradazione degli zuccheri e anche a partire da altre molecole presenti nel mosto, come gli amminoacidi. Tra questi composti, gli esteri sono quelli che più influiscono sulle caratteristiche aromatiche dei vini.

La loro formazione durante la fermentazione dipende

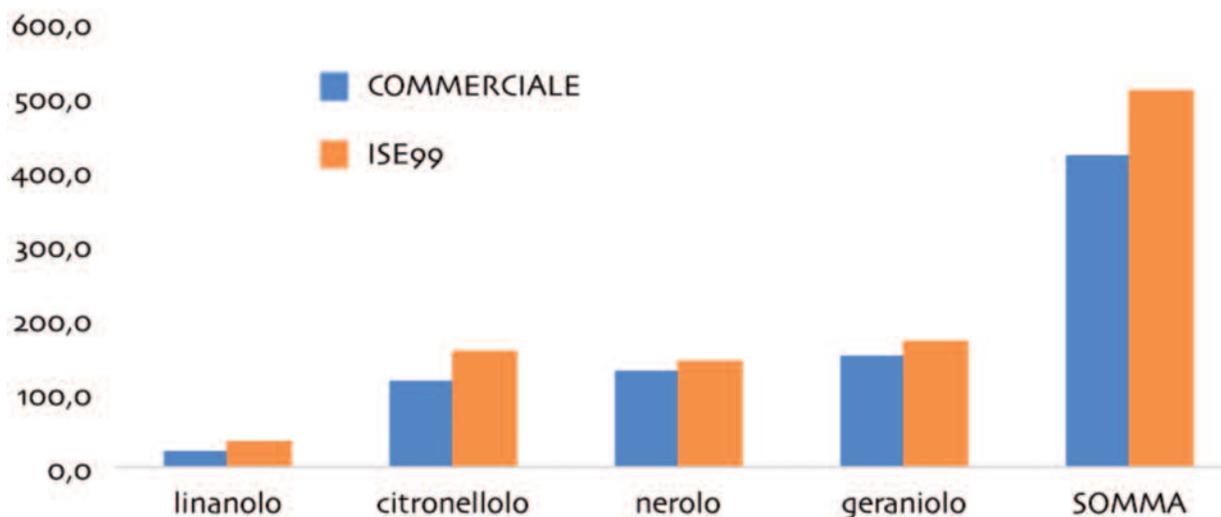


Figura 5 - Concentrazione dei principali composti terpenici (µg/L) nella produzione di un brachetto spumante: confronto tra lievito commerciale e lievito ISE99.

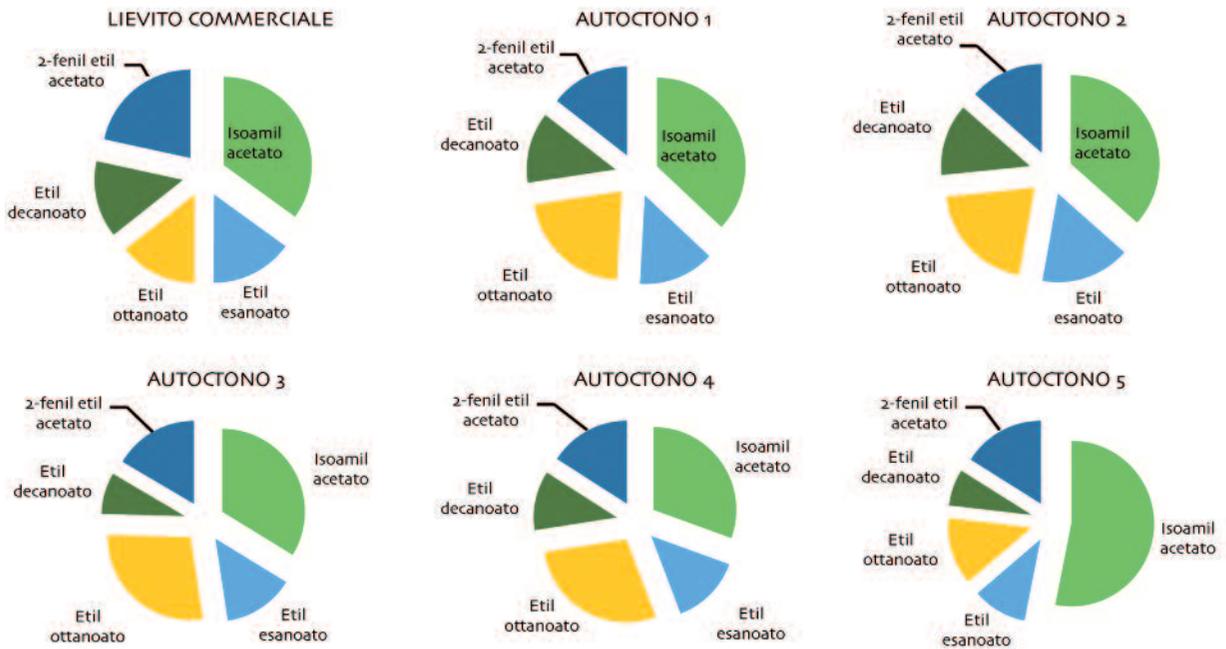


Figura 6 - Ripartizione percentuale dei principali esteri prodotti durante la fermentazione con diversi ceppi di lievito *S. cerevisiae*.

dalla composizione del mosto e dal ceppo di lievito e, pertanto, la produzione degli esteri di fermentazione è un parametro che viene considerato nella selezione di lieviti autoctoni soprattutto per la vinificazione di uve ad aroma neutro.

Nella Figura 6 è presentata la distribuzione percentuale degli esteri più importanti, rilevati dopo la fermentazione di un mosto da uve Chardonnay con 5 lieviti autoctoni ed un lievito commerciale: 2-fenil etil acetato (floreale), isoamil acetato (banana), etil esanoato (banana, ananas), etil ottanoato (cognac, albicocca), etil decanoato (arachide, vinoso, cognac). Dall'osservazione della figura è facile intuire come la composizione dell'aroma in un vino possa essere modulata in funzione del lievito utilizzato nella fermentazione alcolica donando, ad esempio, nel caso del lievito autoctono 5, maggiori note di banana generate da una superiore produzione di isoamil acetato.

Conclusioni

Da questa panoramica emerge che il ceppo di lievito assume un'importanza cruciale, sia per la buona riuscita del processo di fermentazione e sia, grazie alla sua notevole variabilità metabolica, nell'ottenimento di determinati profili organolettici nei vini prodotti.

Le nuove metodiche basate sull'analisi del DNA sono un formidabile supporto per la selezione e l'identificazione microbica e per un maggiore controllo del processo fermentativo.

Bibliografia

- [1] Ravizza F. (1892) "Esperienze di fermentazione con lieviti purificati e selezionati." In "Le Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane" vol. 22, 113-130.
- [2] Capece A., Romaniello R., Siesto G., Pietrafesa R., Massari C., Poeta C., Romano P. (2010) "Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation." International Journal of Food Microbiology 144, 187-92.
- [3] Rodríguez-Palero M. J., Fierro-Risco J., Codón A. C., Benítez T., Valcárcel M. J. (2013) "Selection of an autochthonous *Saccharomyces* strain starter for alcoholic fermentation of Sherry base wines." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 40, 613-623.
- [4] Vaudano E., Quinterno G., Costantini A., Pulcini L., Pessione E., Garcia-Moruno E. (2018) "Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains." International Journal of Food Microbiology 289, 154-161.
- [5] Vaudano E., Garcia-Moruno E. (2008) "Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis." Food Microbiology, 25(1):56-64.
- [6] King A., Dickinson J. R. (2000) "Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*." Yeast 16; 499-506.
- [7] Garcia Moruno E., Ribaldone M., Di Stefano R., Conterno L., Gandini A. (2002) "Étude de cinq souches de *Saccharomyces cerevisiae* par rapport à leur métabolisme du géraniol." Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. 36, 4, 221-225.
- [8] King A., Dickinson J. R. (2003) "Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts." FEMS Yeast Research, 3, 53-62.
- [9] Vaudano E., Garcia Moruno E., Di Stefano R. (2004) "Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation." International Journal of the Institute of Brewing, 110 (3), 213-219.
- [10] Noti O. (2006) Tesi di Laurea di I livello: "Biotrasformazione del geraniolo in citronellolo: selezione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ad alta efficienza". Università degli Studi di Torino, Facoltà MFN.