

FERMENTAZIONE ALCOLICA E RICERCA

Selezione DI LIEVITI AZIENDALI:

il protocollo
per evitare errori

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per i vini prodotti da colture non selezionate di lieviti e batteri, la Fondazione Mach ha stilato un vademecum per evitare arresti fermentativi e possibili difetti organolettici usando lieviti aziendali



>> Raffaele Guzzon

La fermentazione alcolica è il tratto principale e distintivo nella produzione del vino, non solo perché è qui che avviene l'accumulo di alcol, ma perché i lieviti mediano la trasformazione di numerosi componenti dell'uva generando il profilo sensoriale distintivo di ciascuno vino. È dunque ovvia l'attenzione verso questa biotrasformazione fin da quando, a fine '800, ci si è resi conto della presenza e della rilevanza di questi funghi unicellulari nei mosti e nei vini. Tuttavia, il vero spartiacque nell'ambito delle fermentazioni enologiche, e più in generale alimentari, lo segna non tanto la coscienza della presenza dei microrganismi quanto la capacità di

isolarli, selezionarli e moltiplicarli per ottenere colture starter in grado di rendere più performanti e riproducibili le fermentazioni alimentari.

Nell'ambito enologico è dal Secondo dopoguerra che si è tentato di produrre colture di lieviti per enologia, per i batteri occorrerà attendere molto di più. Dopo i primi tentavi con colture fresche, su esempio di quanto già avveniva con maggior successo nella panificazione e nell'industria brassicola, dagli anni 70 del 1900 compaiono sul mercato colture stabili e performanti, i lieviti secchi attivi, che oggi rappresentano uno strumento imprescindibile in molte cantine. Tuttavia, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse

tra produttori e consumatori verso la produzione di vini che facciano a meno di colture selezionate di lieviti e batteri, con l'intento di valorizzare le peculiarità di ogni vigneto e delle sue uve, data la preoccupazione che la presenza di lieviti selezionati possa omologare i vini.

Occorre osservare che la bibliografia scientifica in merito non dimostra come assolutamente fondata questa preoccupazione ma, d'altro canto, evidenzia la notevole biodiversità della flora microbica spontaneamente presente sulle uve e in cantina invitando a valorizzarne appieno il potenziale enologico.

LA FERMENTAZIONE SPONTANEA, VANTAGGI E RISCHI

Le opportunità offerte da una fermentazione alcolica condotta senza l'ausilio di colture selezionate concernono la possibilità di valo-

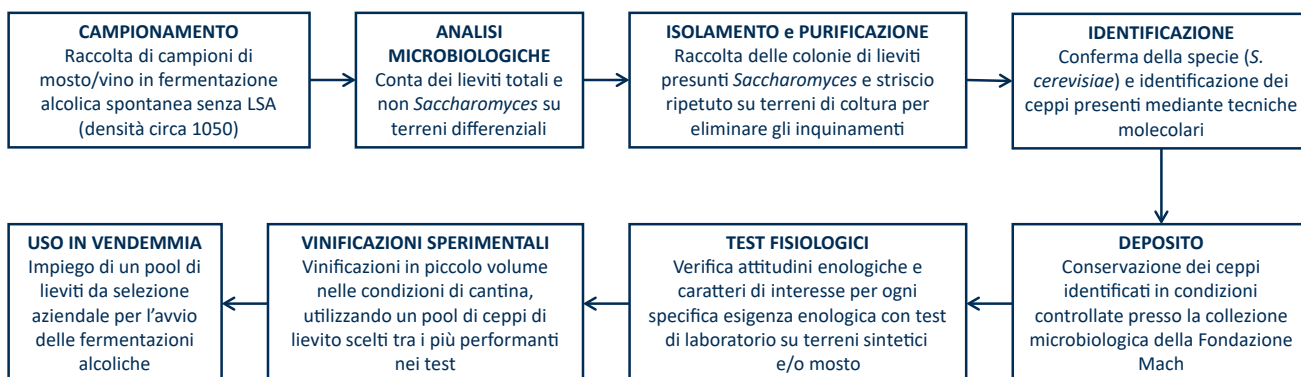
LA POPOLAZIONE DI LIEVITI APICULATI DECADE RAPIDAMENTE, LASCIANDO SPAZIO A QUELLA DI *S. CEREVISIAE*.

T.1 ANDAMENTO DELLA POPOLAZIONE DI LIEVITI TOTALI E APICULATI IN DUE CANTINE DURANTE FERMENTAZIONI SPONTANEE

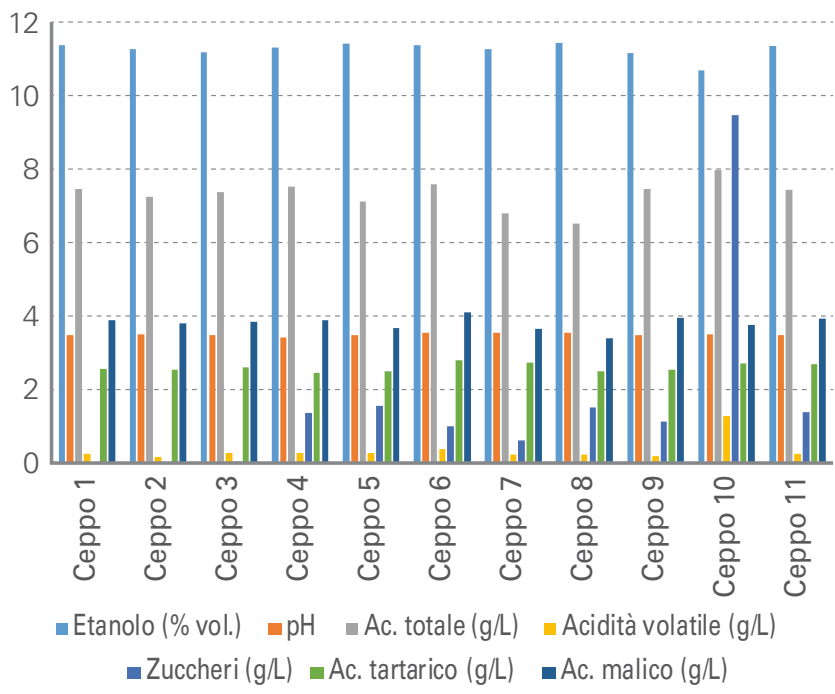
Giorni di fermentazione (n.)	Densità del mosto/vino	Cantina A (UFC/mL)		Cantina B (UFC/mL)	
		lieviti totali	lieviti apiculati	lieviti totali	lieviti apiculati
3	1,100±0,012	2,1±2,8×10 ⁷	3,2±6,4×10 ⁴	4,9±3,2×10 ⁷	5,0±9,6×10 ⁶
10	1,010±0,007	1,9±3,4×10 ⁷	n.d.	8,5±5,1×10 ⁶	n.d.
15	0,995±0,005	6,2±2,5×10 ⁷	n.d.	1,4±0,8×10 ⁷	4,3±3,4×10 ⁵
18	0,980±0,009	4,1±3,2×10 ⁶	n.d.	6,8±3,6×10 ⁶	n.d.
Ceppi di <i>S. cerevisiae</i> isolati		5		6	

n.d. = non determinato. UFC = unità formanti colonia.

F.1 PROTOCOLLO DI SELEZIONE DEI LIEVITI AZIENDALI MESSO A PUNTO DAL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA DELLA FONDAZIONE EDMUND MACH



G.1 CARATTERISTICHE DEI VINI OTTENUTI DA MICROVINIFICAZIONI DI LABORATORIO IMPIEGANDO CEPPI AUTOCTONI DI *S. CEREVISIAE* ISOLATI IN UNA CANTINA TOSCANA



Valori medi di 4 differenti esperimenti su diversi mosti.

Il ceppo 10 rispetto agli altri ha una scarsa attitudine enologica a causa dell'elevato accumulo di acido acetico e di zuccheri non svolti.

rizzare appieno le caratteristiche metaboliche delle classi di microrganismi più sensibili all'accumulo di etanolo e dei numerosi ceppi di *S. cerevisiae* che naturalmente si selezionano durante la fermentazione. Non che questi microrganismi non siano inizialmente presenti anche nelle vinificazioni condotte con lieviti selezionati, ma l'elevata attività fermentativa dei lieviti secchi, dovuta anche all'alta concentrazione cellulare, fa sì che in poche ore vi sia un tale accumulo di etanolo da eliminare rapidamente molte specie microbiche, riducendone lo spazio d'azione. Riguardo ai cosiddetti «lieviti apiculati», ovvero lieviti non appartenenti al genere *Saccharomyces*, un'ampia bibliografia evidenzia come questi micror-

ganismi siano dotati di caratteri metabolici alternativi a quelli di *S. cerevisiae*. In altre parole, ogni specie ha trovato nell'evoluzione la sua strada per meglio so-

pravvivere nel mosto e nel vino. Questa diversità fa sì che molte specie di lieviti abbiano capacità di produrre sostanze aromatiche (acetaldeide, esteri fermentativi, acidi grassi e alcoli superiori) differenti da quelle generate da *S. cerevisiae*, contribuendo ad esempio a liberare aromi primari legati come terpeni o composti tiolici. Anche la resistenza all'ambiente enologico è differente. Vi sono specie più tolleranti agli stress osmotici, è nota e anche sfruttata commercialmente la buona attitudine di *T. delbruekii* a fermentare mosti molto zuccherini, e altre maggiormente adattate al freddo come *Zygosaccharomyces sp.*, e dunque in funzione delle scelte operative potremo stimolare o reprimere lo sviluppo di questi microrganismi ottenendo vini più complessi.

Tuttavia la fermentazione spontanea porta con sé anche una notevole imprevedibilità e non sempre i microrganismi presenti nel mosto sono in grado di soddisfare le attese dell'enologo. Con gli strumenti tecnologici come la temperatura, l'ossigeno, le chiarifiche prefermentative e i rimontaggi e con le opportune aggiunte di nutrienti è possibile ottimizzare il potenziale di queste specie. La loro presenza



e l'attitudine enologica non è in ogni caso prevedibile a priori e soprattutto in vendemmie difficili il rischio di arresti di fermentazione o deviazioni organolettiche non è trascurabile. Da qui l'interesse per una «terza via» ovvero la selezione di lieviti aziendali.

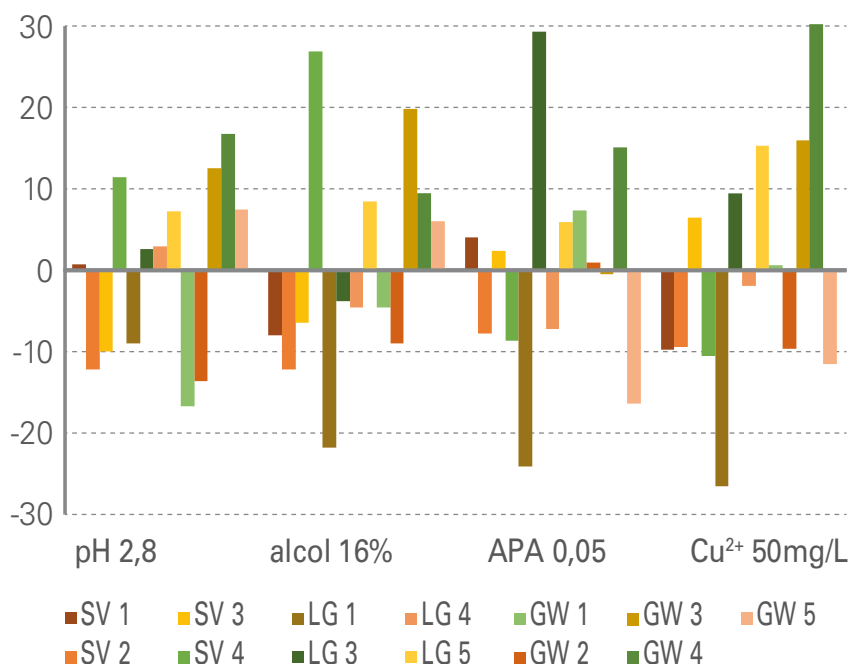
SELEZIONE DI LIEVITI AZIENDALI, IL PROTOCOLLO DELLA FONDAZIONE MACH

La selezione di lieviti aziendali è una pratica oggi piuttosto diffusa e condotta da Università, centri di ricerca, laboratori di consulenza enologica. Non vi è un'unica strada, anzi in bibliografia è possibile rintracciare protocolli molto differenti tra loro. La Fondazione Edmund Mach svolge ormai da diversi anni selezioni aziendali di lieviti per la conduzione delle fermentazioni enologiche.

Il protocollo sviluppato (figura 1) dal laboratorio di microbiologia è stato collaudato in differenti regioni italiane e ha come tratto distintivo l'isolamento dei ceppi di *S. cerevisiae* non da uve ma da mosti in avanzato stato di fermentazione. Questa precisa scelta operativa deriva dall'analisi della bibliografia scientifica sull'evoluzione della flora microbica durante la fermentazione alcolica e da osservazioni svolte presso i laboratori della Fondazione che evidenziano come *S. cerevisiae* sia minoritario sulle uve e che, al contrario, durante la fermentazione alcolica si vadano selezionando i ceppi di lievito con la maggiore attitudine enologica (tabella 1).

Una volta prelevati campioni di mosto/vino i lieviti sono separati dalla matrice e riprodotti su terreni sintetici differenziali che inibendo selettivamente lo sviluppo delle differenti specie di lievito, permettono un primo screening tra lieviti apiculati e *Saccharomyces*. I ceppi

G.2 DIFFERENZE DALLA MEDIA (ESPRESSA IN %) DELLA VELOCITÀ DI SVOLGIMENTO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA DA PARTE DI UN GRUPPO DI CEPPI DI *S. CEREVISIAE* ISOLATI IN UNA CANTINA ALTO ATESINA



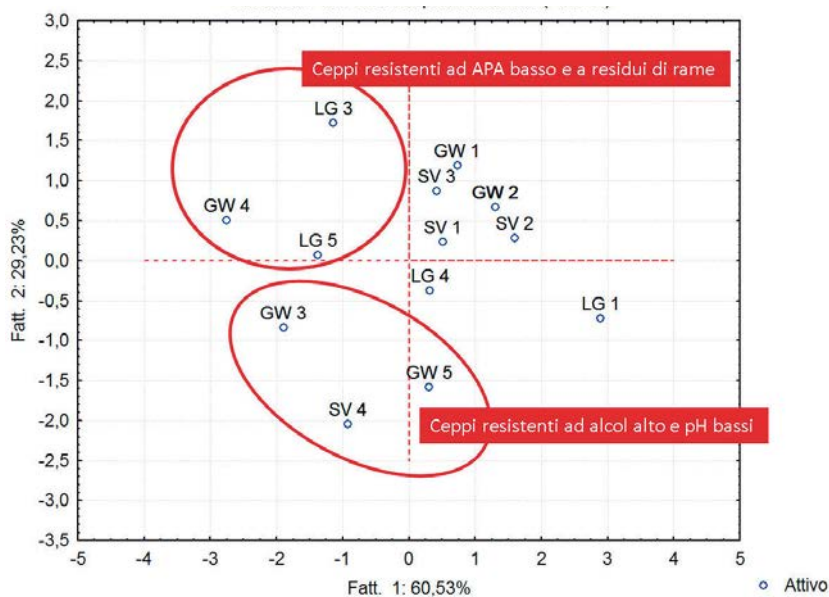
APA = azoto prontamente assimilabile; LG = Lagrein; SV = Sauvignon; GW = Gewürztraminer.

Al variare dei fattori limitanti presenti nel mosto (pH, azoto prontamente assimilabile, alcol e rame) varia la velocità di fermentazione dei ceppi di lievito, segno che ciascun individuo ha caratteristiche di resistenza proprie e differenti dagli altri lieviti, sebbene isolati nella stessa cantina.

ottenuti sono poi identificati per via molecolare sia a livello di specie, mediante sequenziamento di una porzione della sub unità 26S del RNA ribosomiale e successivamente a livello di ceppo, in modo da poter conservare in collezione ceppi puri ed evitare la conservazione di microrganismi omologhi. Prima dell'impiego in cantina i ceppi di *S. cerevisiae* sono testati in laboratorio su terreni sintetici e su mosti, sulla base di un protocollo che accanto ad alcuni test standard prevede prove concordate con ogni singola azienda, in funzione dei caratteri dei vini prodotti e degli obiettivi dell'enologo. I caratteri di base, potere alcoli-

geno, produzione di acido acetico, produzione di anidride solforosa, comportamento a differenti temperature o livelli di acidità, ecc.. sono testati su tutti i ceppi, per evitare di fornire alle cantine lieviti non performanti (grafico 1). Negli anni sono stati sviluppati test per saggiare la resistenza dei ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* contro inquinanti come il rame, ai tannini presenti nei vini rossi da affinamento, la produzione di acido solfidrico, la risposta a differenti protocolli nutrizionali e lo sviluppo aromatico. Una volta identificati i ceppi più promettenti questi sono conservati in condizioni controllate presso

G.3 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) SVOLTA SUI DATI EMERSI DAI TEST DI LABORATORIO SU CEPPI DI *S. CEREVISIAE* ISOLATI IN UNA CANTINA ALTOATESINA



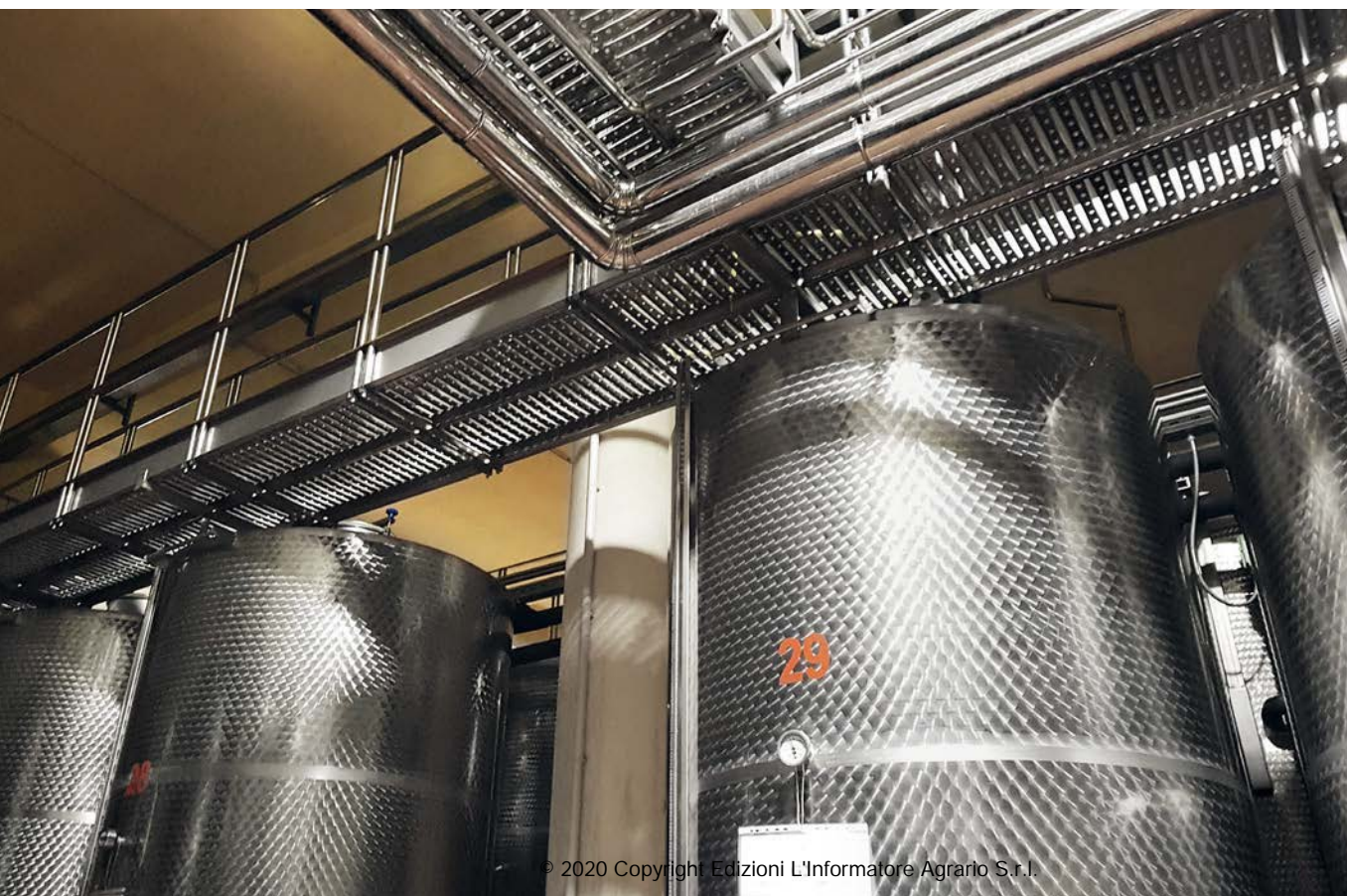
LG = Lagrein; **SV** = Sauvignon; **GW** = Gewürztraminer. **PCA** = test statistico volto a evidenziare caratteri di affinità tra diversi individui appartenenti a una popolazione omogenea (i ceppi di *S. cerevisiae* isolati in una cantina altoatesina). I primi due fattori derivati dall'analisi statistica dei dati delle prove di attitudine enologica svolte in laboratorio spiegano circa l'80% della variabilità complessiva e permettono di aggregare ceppi di lievito con caratteri enologici simili (ad esempio GW4, LG3 e LG5) e di creare colture miste con caratteri prestabili e noti.

I ceppi si raggruppano in funzione delle caratteristiche del mosto e del processo di vinificazione, sulla base della resistenza ai fattori limitanti testati.

il laboratorio di microbiologia per essere poi testati, solitamente nella vendemmia successiva, in condizioni reali di cantina. Anche in questo caso le fermentazioni sono monitorate dal punto di vista chimico e microbiologico, al fine di verificare l'effettiva presenza dei ceppi oggetto di selezione e le loro performance in condizioni di cantina. Infine, i ceppi sono conservati per l'impiego e forniti, solitamente in miscela in modo da aumentare la biodiversità nelle fermentazioni, su richiesta delle cantine o su loro mandato, consegnati a lievifici per la produzione.

SELEZIONE DI LIEVITI AZIENDALI, LA RICERCA E L'USO IN CANTINA

Le selezioni di lieviti aziendali condotte dalla Fondazione Mach in collaborazione con diverse cantine italiane sono state anche l'occasione per studiare accuratamente la biodiversità interna alla specie *S. cerevisiae* in differenti contesti enologici e verificare dunque affinità e dissonanze tra areali



geografici e contesti produttivi.

Un primo risultato che ha trovato conferme in tutte le esperienze di selezione è la notevole biodiversità interna alla specie *S. cerevisiae* riscontrata nelle fermentazioni spontanee. Sia in cantine di piccole dimensioni, con produzioni di alcune decine di migliaia di bottiglie, sia in colossi enologici dove sono stati eseguiti campionamenti su differenti filiere produttive, è sempre stato possibile ritracciare numerosi ceppi di *S. cerevisiae* in ogni fermentazione spontanea. Inoltre, verifiche condotte in annate successive hanno evidenziato come accanto ad alcuni ceppi conservati vi fosse un notevole numero di individui differenti ogni anno. Questo dato è molto interessante in quanto solitamente si considera *S. cerevisiae* come un unico individuo, mentre avere differenti ceppi vuol dire aver anche variabilità nell'attività metabolica e dunque una maggiore adattabilità alle variazioni di ogni vendemmia e una maggiore complessità dei vini ottenuti. Se si considera poi che questo lievito permane per tutta la fermentazione, mentre gli apiculati scompaiono dopo l'accumulo di pochi gradi di alcol, il dato è ancor più rilevante. Un'altra interessante evidenza è che le variabili caratteristiche di ogni vinificazione, ad esempio il volume dei vasi vinari, la temperatura di fermentazione, le caratteristiche dei mosti di differenti varietà, stimolano l'adattamento dei ceppi di *S. cerevisiae* (grafici 2 e 3). Infatti, confrontando i caratteri e i ceppi di lievito, sia dal punto di vista genetico sia dell'attitudine enologica, le analisi statistiche discriminano frequentemente i ceppi i lievito in base alle caratteristiche delle filiere di vinificazione segno che la fermentazione alcolica, pur nella sua breve durata, permette la selezione di ceppi di lievito adattati a ogni specifica realtà enologica in termini di resistenza ai fattori limitanti e adattamento alle variabili produttive. Come impiegare dunque le selezioni di lieviti aziendali? Come già accennato chi scrive ritiene utile non limitarsi mai a un solo ceppo di *S. cerevisiae*, ma utilizzare un pool di lieviti, derivanti da selezione interna all'azienda, magari condotta in differenti annate. In questo modo si andrà a ricreare parte della biodiversità tipica di una fermentazione spontanea senza tuttavia incorrere nei rischi che questa inevitabilmente porta con sé. Altri parametri cruciali per ottimizzare le funzionalità delle colture aziendali di lieviti sono la dose di impiego e la tempistica di aggiunta al mosto. I lieviti aziendali sono solitamente prodotti in forma liquida o in crema e dunque con una concentrazione nominale inferiore a quella dei lieviti secchi attivi. Questo non è un limite, anzi sarebbe opportuno tarare la concentrazione nel mosto in modo da non superare il limite del milione di cellule, meglio mantenendosi intorno a qualche centinaio di migliaia di cellule per millilitro di mosto.



In questo modo si avrà una sufficiente colonizzazione del mosto, è ragionevole che la fermentazione alcolica si avvii in 1-2 giorni, senza deprimere troppo l'attività dei lieviti apiculati e lasciando dunque che questi agiscano, collaborando alla fermentazione alcolica e alla sintesi aromatica, per 5-6 giorni. Anche il momento dell'aggiunta del lievito aziendale è un parametro molto importante. Occorre sia tener conto del rischio che si sviluppino alterazioni microbiologiche in un mosto ove la degradazione degli zuccheri stenta a partire, sia del fatto che è necessario dare un adeguato tempo di attività ai microrganismi naturalmente presenti nel mosto. Dunque in mosti da uve bianche o per la produzione di vini rosati, particolarmente a rischio di alterazioni soprattutto di natura batterica, l'inoculo della coltura di lieviti aziendale dovrà essere tempestivo, appena terminata la chiarifica prefermentativa, regolando la temperatura per garantire un pronto avvio dell'attività dei lieviti. Al contrario, nella vinificazione in rosso se le uve sono sane sarà opportuno limitare l'uso di anidride solforosa e attendere qualche giorno prima dell'aggiunta del lievito aziendale, per stimolare l'attività dei lieviti apiculati.

Raffaele Guzzon

Centro trasferimento tecnologico - Fondazione Edmund Mach
San Michele all'Adige (Trento)

*Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su:
www.informatoreagrario.it/bdo*

Selezione di lieviti aziendali: il protocollo per evitare errori

BIBLIOGRAFIA

Boscaino Floriana, Ionata Elena, La Cara Francesco et al. (2019) - Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous mixed starter on Aglianico wine volatile compounds. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* - Volume: 56 Issue: 11 Pages: 4982-4991.

de Cells M., Ruiz J., Martin-Santamaria M. et al. (2019) - Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Letters in applied microbiology* - Volume: 68 Issue: 6 Pages: 580-588.

Valero Eva, Cambon Brigitte, Schuller Dorit et al. (2007) - Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *Fems Yeast Research* - Volume: 7 Issue: 2 Pages: 317-329.

Perrone Benedetta, Giacosa Simone, Rolle Luca et al. (2013) - Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermenta-

tion. *International Journal of Food Microbiology* - Volume: 165 Issue: 2 Pages: 156-162.

de Ullivarri Miguel Fernandez, Mendoza Lucia M., Raya Raul R. (2014) - Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* - Volume: 106 Issue: 5 Pages: 865-878.

Guzzon Raffaele, Labagnara Tilde, Toffanin Annita et al. (2018) - Oenological characterization of indigenous strains of *S. cerevisiae* isolated in a biodynamic winery in the Cortona DOC area. *Annals of Microbiology* - Volume: 68 Issue: 12 Pages: 963-967.

Guzzon R., Widmann G., Settanni L. et al. (2011) - Evolution of yeast populations during different biodynamic winemaking processes. *South African Journal of Enology and Viticulture* - Volume: 32 Issue: 2 Pages: 242-250.



www.viteevino.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.