

A cura di:



Adelaide Gallo¹



Raffaele Guzzon^{1*}



Mario Malacarne¹



Marco Ongaro²



Tomas Roman¹

ACIDIFICAZIONE BIOLOGICA DEL VIN SANTO MEDIANTE L'IMPIEGO DI *LACHANCEA* *THERMOTOLERANS*

Studio sull'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* per contrastare alcuni effetti negativi derivanti dai cambiamenti climatici

Come difendere i vini tradizionali italiani dai cambiamenti climatici in atto che, modificando la composizione chimica dei mosti possono alterarne caratteri peculiari? Un interessante aiuto può venire dai lieviti non-*Saccharomyces*. Microrganismi enologici con caratteri alternativi al comune *Saccharomyces cerevisiae*, da impiegarsi in inoculi sequenziali per dare ai vini maggiore complessità organolettica o modificare alcuni parametri critici, come l'acidità fissa. In questa nota andiamo a descrivere un'esperienza in tal senso condotta su uve passite atte a produrre *Vino Santo di Gambellara*.

I lieviti non-*Saccharomyces* uno strumento antico, ma di grande attualità

Il settore vitivinicolo sa adattarsi ai mutamenti ambientali, affinando

pratiche agronomiche e tecniche di cantina. Oggi la progressiva meridionalizzazione del clima dovuta al cambiamento climatico è un dato di fatto in molte regioni vitivinicole europee. Le risposte a questi fenomeni sono state diverse: l'evoluzione delle pratiche agronomiche, il ricorso a una differente base ampelografica o strategie di vinificazione volte a minimizzare l'impatto del clima sulla composizione del vino attraverso interventi sottrattivi o additivi.

Tuttavia, alcuni vini sono più sensibili ai repentini mutamenti climatici, come quelli di più antica tradizione, principalmente ottenuti da produzioni artigianali; questi vini sono refrattari ai cambiamenti per vincoli di natura tecnica e perché dotati di un profilo organolettico estremamente caratteristico. La produzione di vini santi, vini dolci da uve appassite in post-raccolta soggetti ad un prolungato affinamento ossidativo, è tradizionale in diverse regioni italiane. Pur con peculiarità le-

¹ Centro di Trasferimento Tecnologico, Fondazione Edmund Mach

² C3A - Università degli Studi di Trento

* Autore: raffaele.guzzon@fmach.it

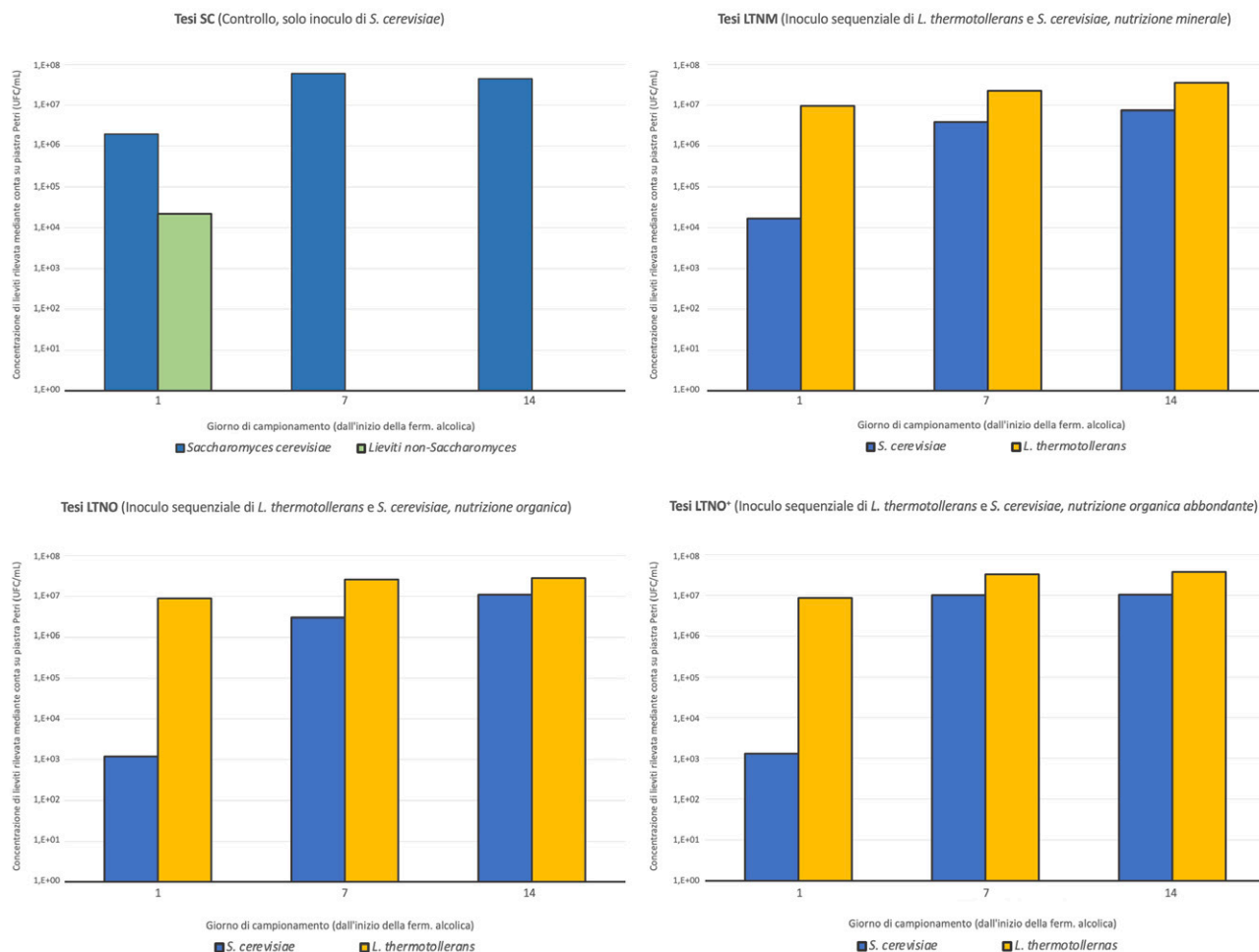


Fig. 1 - Conte microbiche della popolazione di lieviti totali (LT), lieviti non-Saccharomyces (NSC) e *L. thermotolerans*, svolte mediante l'impiego di terreni differenziali e riconoscimento morfologico sulle quattro tesi sperimentali condotte

gate ai vitigni e ai dettagli produttivi, l'equilibrio gustativo e produttivo di questi vini si basa sul mantenimento di un'adeguata acidità che porti a regolare l'evoluzione microbica sia in fruttato, che in vinificazione. Tale acidità non può essere solo rappresentata dall'acido acetico, il vino ne risulterebbe squilibrato occorre si mantenga un profilo acido complesso con acido lattico e, in parte malico. Numerosi sono, infatti, i microrganismi alterativi che possono intervenire lungo il processo di produzione di un vino santo. Muffe già presenti sui grappoli, batteri acetici, lattici e alcuni generi di lieviti non-Saccharomyces possono creare alterazioni organolettiche o, in alcuni casi, composti tossici. La produzione artigianale della maggior parte dei vini santi, caratterizzati da un profilo organolettico ben distinto, sconsiglia o rende impra-

ticabili stravolgimenti del processo produttivo. Occorre dunque risolvere le principali criticità di queste vinificazioni in maniera discreta e sostenibile per le cantine coinvolte. L'uso di lieviti non-Saccharomyces nel processo di vinificazione riscuote oggi un notevole interesse, una tendenza apparentemente in controcorrente alla ricerca portata avanti negli ultimi decenni circa la purezza assoluta delle colture di *S. cerevisiae* impiegate in enologia. Le ragioni di questo "ritorno" alla tradizione, quando le fermentazioni enologiche prive di starter industriali vedevano l'intervento di più generi microbici, è da ricercarsi nei metabolismi alternativi presenti nel fenotipo di alcune specie di lieviti, dei quali *S. cerevisiae* è privo (Mateo e Maicas, 2016). Se infatti il "cerevisiae" rimane il lievito con il miglior vigore fermentativo, studi hanno evidenzia-

to come lieviti appartenenti a generi diversi possano rivelarsi strumenti di biocontrollo, microrganismi capaci di liberare con maggiore efficienza aromi varietali, ridurre il tenore in acidità volatile e/o abbassare la resa in alcol. *Lachancea (kluyveromyces) thermotolerans* è un lievito diffuso in ambito enologico e piuttosto robusto (Morata et al., 2018), essendo in grado di sopravvivere fino al 13 % (v/v) di etanolo. Come per altri lieviti non-Saccharomyces, è prassi abbinare a questo lievito un co-starter, generalmente un ceppo di *S. cerevisiae*. Il momento e la quantità di *S. cerevisiae* aggiunte al mosto regolano l'attività di *L. thermotolerans*, grazie a fenomeni di antagonismo mediati da meccanismi di contatto cellula-cellula e dalla secrezione di peptidi antimicrobici, oltre che dalla mera competizione per le fonti nutrizionali. Nella produzione di vini passiti

sono due i caratteri di *L. thermotolerans* che destano interesse. Il principale è la produzione di acido lattico, già durante la fermentazione alcolica. Le concentrazioni massime riportate in bibliografia superano i 16 g/L, valori unici tra i lieviti non geneticamente modificati. L'acidificazione indotta da *L. thermotolerans* influisce positivamente sulla stabilità microbiologica del vino e sull'equilibrio organolettico, evitando alterazioni o acidificazioni esogene per compensare la carenza di acidità fissa persa durante l'appassimento in fruttaio.

Un'altra caratteristica delle uve sottoposte ad appassimento è l'eccessivo contenuto di zucchero, che porta a concentrazioni di etanolo elevate e alla massiccia produzione di sottoprodotti fermentativi, come l'acido acetico, sintomo di stress osmotico per i comuni lieviti enologici.

Diversi studi hanno riportato contenuti di etanolo significativamente più bassi nelle fermentazioni miste con *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* con riduzioni che variavano tra lo 0,2 % e lo 0,9 % (v/v). Altri aspetti interessanti

sono l'aumento della concentrazione di glicerolo, la diminuzione del contenuto di acido acetico e una peculiare modulazione dei composti volatili del vino.

Il piano sperimentale condotto sul Vin Santo di Gambellara

La sperimentazione ha visto la vinificazione di uve Garganega atte a produrre Vin Santo di Gambellara D.O.C.G. con l'impiego di diversi lieviti e protocolli nutrizionali al fine di incrementare l'acidità fissa dei vini. Grazie alla collaborazione della cantina Tarcisio Maule (Selva di Montebello, VI) sono state rese disponibili uve passite, vinificate presso la cantina sperimentale di microvinificazione della Fondazione Mach. Le uve sono state pressate (150 bar) con un torchio idraulico a pistone verticale. Il mosto è stato decantato con l'aggiunta di enzimi pectolitici (10 mg/L, Rapidase Clear Extreme, Oenobrand) e SO₂ (30 mg/L) per 48 ore, trascorse le quali è stato suddiviso in

12 masse omogenee. Il piano sperimentale ha voluto verificare in triplicato le performances di tre approcci nutrizionali (LTNM, LTNO e LTNO+) in inoculi sequenziali di *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* a confronto con la gestione fermentativa con solo *S. cerevisiae*, secondo lo schema riportato in **Tab. 1**. I lieviti impiegati sono stati *S. cerevisiae* var. *bayanus* (PDM, Oenobrand, Francia) e *L. thermotolerans* (Laktia, Lallemand Inc., Canada).

L'inoculo sequenziale di *S. cerevisiae* è stato realizzato al raggiungimento del 30% della fermentazione alcolica. Il calcolo è stato realizzato su un ipotetico calo peso totale di 100 g per ogni litro, che ha corrisposto indicativamente al 8-10 gg dal inoculo iniziale di *L. thermotolerans*. Le fermentazioni, condotte a 21° C, sono state monitorate mediante misura giornaliera della densità e della temperatura. Alla fine della fermentazione alcolica, il titolo alcolometrico è stato determinato mediante distillazione, mentre per la quantificazione degli acidi organici si è fatto ricorso a kit enzimatici. Le analisi microbiologiche sono state

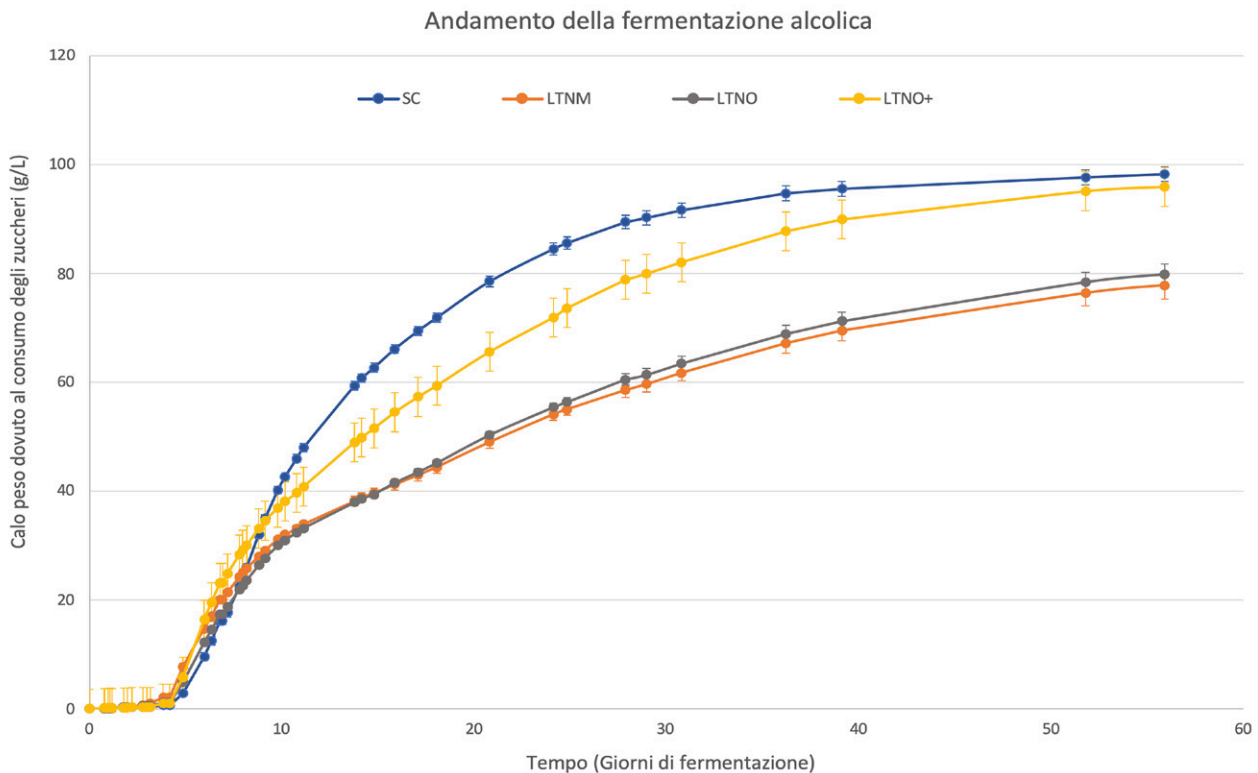


Fig. 2 - Andamento della fermentazione alcolica nelle 4 tesi sperimentali condotte, valori medi ± DS (n=3). SC: tesi condotta con *S. cerevisiae*; LTNM: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione minerale; LTNO: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica; LTNO+: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica abbondante

eseguite secondo i protocolli OIV, con cadenza settimanale, distinguendo la popolazione di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* mediante l'uso di opportuni terreni differenziali. Le colonie di *L. thermotolerans* sono state identificate grazie alla caratteristica colorazione blu-verde su terreno WL Nutrient Agar. I dati analitici dei vini sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguita dal test post-hoc (HSD) di Tukey.

Le evidenze sperimentali e il ruolo di *L. Thermotolerans*

Evoluzione delle popolazioni di lieviti.

Visto che il focus della ricerca è il

lo e, successivamente, a 7 e 14 giorni. Nel controllo, ovvero la tesi inoculata solo con *S. cerevisiae* (SC, **Fig. 1**), osserviamo il classico andamento della popolazione di lieviti dove, dopo un'iniziale coabitazione tra questo lievito e altri lieviti non-*Saccharomyces* (NSC, **Fig. 1**), *S. cerevisiae* prende il sopravvento raggiungendo concentrazioni rilevanti, (6.0×10^7 ufc/mL) se consideriamo che trattasi di mosti da uve passite, notoriamente refrattari allo sviluppo microbico per squilibri nutrizionali.

Certamente il protocollo nutrizionale ha contribuito a minimizzare lo stress dei lieviti, indicando come la nutrizione del mosto sia un fattore cruciale per la produzione di vini dolci. Nelle altre tre tesi sperimentali la "coabitazione" tra *S. cerevisiae* e *L.*

(LT, Figura 1). A tal proposito, è bene sottolineare che il minor sviluppo quantitativo di questo lievito era del tutto atteso, ma la sua presenza fino al termine della fermentazione alcolica, probabilmente favorita dal piano nutrizionale, impone di approfondirne il ruolo enologico, sia nel contributo alla fermentazione alcolica che nella produzione di metaboliti secondari. Quanto all'antagonismo tra le due specie, era altresì aspettato, viste le evidenze sperimentali precedenti al presente lavoro (Kapsopoulou *et al.*, 2007).

Cinetica della fermentazione alcolica e accumulo di acido lattico.

In **Fig. 2** è stato rappresentato l'andamento della fermentazione alcolica nelle 4 tesi sperimentali. L'elevato contenuto iniziale di zuccheri (~400

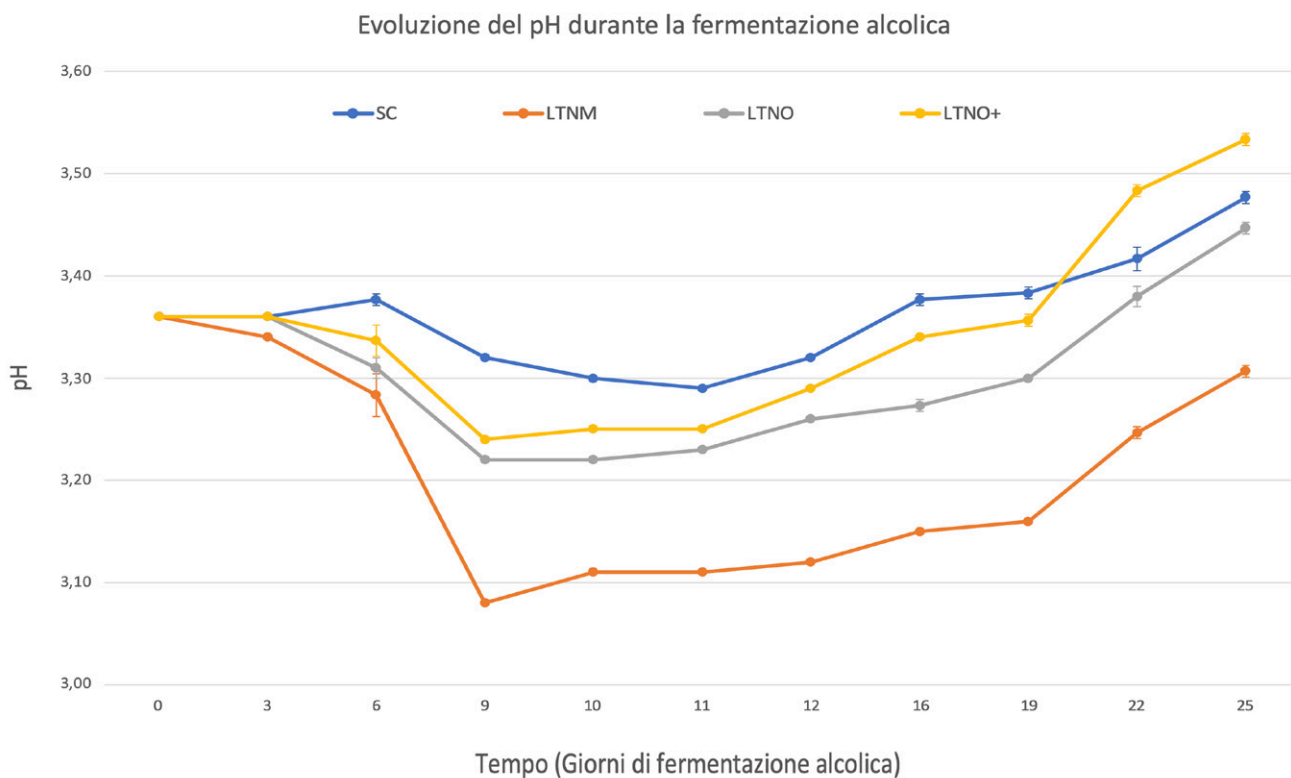


Fig. 3 - Andamento del pH, correlato all'accumulo di acido lattico, durante la fermentazione alcolica nelle 4 tesi sperimentali condotte, valori medi \pm DS (n=3). SC: tesi condotta con *S. cerevisiae*; LTNM: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione minerale; LTNO: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica; LTNO+: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica abbondante

comportamento di *L. thermotolerans* è opportuno iniziare la discussione dei risultati considerando come evolvono le popolazioni di lieviti impiegate nelle differenti tesi. In **Fig. 1** sono riportate le risultanze delle conte svolte sui vini dopo 24 ore dall'inocu-

thermotolerans ha portato ad una competizione per l'occupazione della nicchia ecologica. La concentrazione di *S. cerevisiae* non ha mai superato le 2.5×10^7 ufc/mL (SC, **Fig. 1**), mentre la popolazione di *L. thermotolerans* si è attestata sui 3 milioni di ufc/mL.

g/L) ha rallentato l'avvio di tutte le fermentazioni, con una fase di latenza di 5 giorni. Successivamente si osservava una degradazione regolare degli zuccheri nella tesi inoculata con solo *S. cerevisiae* (SC), mentre nelle tesi inoculate con *L. thermotolerans*, dopo



Codifica tesi sperimentale	<i>S. Cerevisiae</i>	<i>L. thermotolerans</i>	Nutrizione (ogni dose 300 mg/L)				
	Dose inoculo 250 mg/L		Giorno 1	Giorno 5	Giorno 7	Giorno 10	Giorno 14
SC	Inoculo al tempo 0 della FA	NO	Organico	Organico	DAP		
LTNM	Inoculo al 30% FA	Inoculo al tempo 0 della FA	DAP			Organico	DAP
LTNO	Inoculo al 30% FA	Inoculo al tempo 0 della FA	Organico	Organico		Organico	DAP
LTNO+	Inoculo al 30% FA	Inoculo al tempo 0 della FA	Organico x3	Organico x3	Organico	Organico	DAP

Tab. 1 - Piano sperimentale svolto durante la vendemmia 2021 su uve atte alla produzione di Vin Santo di Gambellara presso la cantina sperimentale della Fondazione Mach. SC: tesi condotta con *S. cerevisiae*; LTNM: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione minerale; LTNO: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica; LTNO+: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica abbondante

un'iniziale miglior performance, si osserva un progressivo rallentamento della curva di fermentazione a partire dal decimo giorno. Il rallentamento, coincidente con l'inoculo sequenziale di *S. cerevisiae*, è probabilmente causato dalla già discussa competizione tra specie. Solo nella tesi con più alto

protocollo nutrizionale (LTNO+, **Fig. 2**) la competizione tra le specie non ha presentato evidenti esiti sulla degradazione degli zuccheri e la densità finale è comparabile con quella della tesi controllo. Nelle altre due tesi, svolte con più modesti apporti di azoto e indipendentemente dalla natura

di questo nutriente -organica (LTNO) o minerale (LTNM)- la degradazione degli zuccheri è minore.

Riguardo alla produzione di acido lattico (**Fig. 3**), si può notare come l'aggiunta di *L. thermotolerans* abbia sempre contribuito ad abbassare il pH del mosto in fermentazione, sebbene

Parametri chimici dei vini a fine fermentazione alcolica	SC	LTNM	LTNO	LTNO+
Etanolo (% vol)	15.9 ± 0.2 ^a	12.5 ± 0.4 ^b	13.1 ± 1.1 ^b	14.2 ± 1a ^b
pH	3.50 ± 0.01 ^a	3.35 ± 0.01 ^b	3.46 ± 0.04 ^a	3.49 ± 0.05 ^a
Acidità totale (g/L)	7.00 ± 0.01 ^c	8.90 ± 0.15 ^a	8.07 ± 0.25 ^b	7.83 ± 0.32 ^b
Acidità volatile (g/L)	1.80 ± 0.01 ^a	1.65 ± 0.01 ^b	1.68 ± 0.09a ^b	1.75 ± 0.05 ^{ab}
Glucosio+ Fruttosio (g/L)	150 ± 4 ^b	195 ± 6 ^a	184 ± 21 ^{ab}	166 ± 20 ^{ab}
Acido L Lattico (g/L)	Nr.	2.50 ± 0.24 ^a	1.70 ± 0.20 ^b	1.57 ± 0.15 ^b
Acido L-Malico (g/L)	0.61 ± 0.01 ^a	0.54 ± 0.03 ^b	0.60 ± 0.02 ^{ab}	0.53 ± 0.04 ^b
Nr. Non rilevato (< 0.20 g/L)				

Tab. 2 - Principali parametri compositivi dei vini ottenuti con i diversi protocolli di impiego dei lieviti e della nutrizione. Valori medi ± SD (n = 3). Per il medesimo parametro i valori con lettera in apice diversa sono statisticamente differenti tra loro (Anova a due vie, Tukey HSD test, p < 0.05). SC: tesi condotta con *S. cerevisiae*; LTNM: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione minerale; LTNO: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica; LTNO+: tesi condotta con *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* e nutrizione organica abbondante

con efficacia del tutto differente. Il maggiore effetto bioacidificante si osserva nella prova LTNM, caratterizzata da una nutrizione azotata inorganica. Il massimo abbassamento del pH (0.3 unità) è stato raggiunto al settimo giorno dopo l'inoculo del lievito, pari al 12% della fermentazione alcolica. La nutrizione organica sembra stimolare meno la produzione di acido lattico, indifferentemente da quanto questa sia abbondante probabilmente perché, sebbene la qualità "biologica" dell'azoto organico sia migliore, a parità di dose, l'apporto di azoto ai lieviti dal DAP è superiore rispetto ai formulati organici. La curva di acidificazione da parte di *L. thermotolerans* nelle tesi sperimentali è coerente con quanto riportato dalla letteratura e la riduzione del pH si verifica all'inizio della FA (Hranilovic *et al.* 2021). L'impatto sull'acidità reale nei vini di questo lievito è anche dipendente dalla successione di *S. cerevisiae*. Un inoculo ritardato di *S. cerevisiae* porta ad una maggiore concentrazione di acido lattico, prodotto da *L. thermotolerans*. Comparando le acidità al termine della fermentazione alcolica si osserva comunque una marcata differenza tra le tesi con *L. thermotolerans* e il controllo. Il fatto che l'acidificazione avvenga precocemente è un fatto positivo in quanto potrebbe contribuire a selezionare la microflora presente nei mosti in fermentazione, riducendo il rischio di alterazioni microbiologiche. I protocolli utilizzati hanno inoltre evidenziato la necessaria corretta gestione della nutrizione di entrambi i lieviti in inoculi sequenziali: restrizioni nutrizionali nella fase iniziale della fermentazione potrebbero limitare la capacità acidificante di *L. thermotolerans*; inoltre, eventuali carenze nella seconda fase fermentativa possono inibire lo sviluppo di *S. cerevisiae*, prolungando i tempi di fermentazione, aspetto di grande importanza per questa particolare tecnica enologica.

E i vini? Impatto dei differenti protocolli su parametri chimici.

La composizione dei vini alla fine delle differenti prove di fermentazione

alcolica è riportata nella **Tab. 2**. Balza subito all'occhio la sensibile differenza nell'accumulo di alcol non solo tra la tesi controllo, vinificata con *S. cerevisiae* (SC) e le 3 tesi svolte in presenza di *L. thermotolerans*. Anche tra queste, in funzione del protocollo nutrizionale adottato, vi sono differenze che meritano una disamina. Le due tesi a minor nutrizione (LTNM e LTNO) non superano i 13 gradi alcol, in accordo con la tendenza delle fermentazioni alcoliche di cui alla **Fig. 2**. La tesi LTNO+ presenta un equilibrio del tutto peculiare, un buon tenore in alcol, superiore al 14 % e una discreta produzione di acido lattico che, sebbene non eguagli la tesi a nutrizione minerale, supera gli 1.6 g/L al termine della vinificazione. In accordo con le curve di andamento del pH, è la tesi a nutrizione minerale quella capace di accumulare maggiormente acido lattico, superando i 2.5 g/L, a parità di degradazione dell'acido malico con le altre tesi (in tutti i casi si osserva un residuo attorno agli 0.5 g/L). Il binomio lattico/malico non è tuttavia l'unico parametro da tenere presente per descrivere l'acidità del vino. L'acido acetico gioca certamente un ruolo rilevante, soprattutto nei vini dolci dove l'accumulo, influenzato dallo stress osmotico, è rilevante. In tutte le tesi si superano abbondantemente gli 1.5 g/L di acido acetico al termine della fermentazione alcolica. La nutrizione minerale parrebbe stimolare meno l'accumulo di questo composto, attestandosi su un valore di 1.6 g/L, mentre le altre due tesi co-fermentate non si differenziano dal testimone. In equilibri così complessi non è facile prevedere come il quadro acidico influenzi il pH; nel presente caso è la prova LTMN a mantenere il pH più basso, le altre tre tesi si attestano su valori superiori a 3.40, senza differenze tra i vini ottenuti da inoculo misto e il testimone.

Conclusioni

In conclusione, l'acidificazione biologica dei mosti da uve passite è certamente un brillante approccio enologico che, senza richiedere grosse variazioni nel processo di vinificazione, può contribuire a riequilibrare i *deficit* compositivi dei mosti,

facilitare il controllo delle alterazioni microbiche e donare maggiore complessità al vino. Occorre in ogni caso considerare che la successione di differenti specie di lieviti nel mosto comporta un maggiore consumo di nutrienti ed è pertanto essenziale definire caso per caso un piano nutrizionale, sia per fornire ad ogni specie il fabbisogno nutritivo proprio, sia per minimizzare eventuali fenomeni di competizione che potrebbero creare problemi alla fermentazione alcolica.

Ringraziamenti

Si ringrazia Fabrizio Battista, Paola Vagnoli e lo staff di Lallemand Italia per il supporto nell'esecuzione di queste prove, in particolare per la fornitura del ceppo commerciale di *L. thermotolerans*.

Bibliografia

- Mateo J.J. and Maicas S. 2016. Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation*. 2, 14.
- Morata A., Tesfaye W., Bañuelos M.A., González C., Suárez Lepe J.A. 2018. *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*. 4, 53.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M. & Nerantzis, E. (2007) - Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735-739.
- Hranilovic A., Albertin W., Capone D.L., Gallo A., Grbin P.R., Danner L., Bastian S.E.P., Masneuf-Pomarede I., Coulon J., Bely M., Jiranek V. (2021) - Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines. *Food Chem.* 349, 129015. ■