

A cura di:



Tomas Roman¹



Nicola Cappello¹



Adelaide Gallo^{1,2}



Silvia Schiavon¹



Andrea Versari³



Roberto Larcher¹

UTILIZZO DEL CEPPO HV-205 DI HANSENIASPORA VINEAE IN CHARDONNAY BASE SPUMANTE

Prima parte: aspetti qualitativi di gestione della fermentazione alcolica

In ambito enologico è sempre più comune l'utilizzo di lieviti *non-Saccharomyces* (*nSc*) sia per produrre vini che soddisfino i requisiti del consumatore che per gestire al meglio alcuni punti critici di processo. Sfruttando alcune peculiarità del loro metabolismo, è infatti possibile enfatizzare specifici caratteri sensoriali nei vini finiti. L'utilizzo dei *nSc* permette, in una logica di taglio, di modulare il risultato finale in funzione degli obiettivi enologici. In tale contesto, un nostro recente lavoro pubblicato in questa stessa rivista (Gallo *et al.*, 2022) ha affrontato l'utilizzo di *Lachancea thermotolerans* nella produzione di Vino Santo, avvalendosi della capacità di questo lievito di bioacidificare il vino. Il lavoro ha evidenziato

peraltro come i protocolli nutrizionali possano influenzare il risultato finale. È proprio la limitata conoscenza delle esigenze fermentative dei lieviti *nSc* ciò che può rendere difficile la loro gestione rispetto al consolidato utilizzo di *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), del quale sono ben note le *performances* fermentative, i requisiti nutrizionali e i risultati organolettici sui vini.

Tra i lieviti *nSc* proposti in enologia, l'utilizzo di alcuni ceppi del genere *Hanseniaspora spp.* hanno suscitato interesse in ambito produttivo in quanto consentono di ottenere vini con buone caratteristiche qualitative. Il genere *Hanseniaspora* può superare il 65% del totale dei lieviti indigeni nell'uva (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004), presentando una grande variabilità di

¹ Centro di Trasferimento Tecnologico, Fondazione Edmund Mach

² C3A - Università degli Studi di Trento

³ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università degli Studi di Bologna

* Autore: tomas.roman@fmach.it

specie. Tra quelli interessanti in ambito enologico, è stato recentemente proposto l'utilizzo di *Hanseniaspora vineae* (Hv). Questo lievito apiculato presenta una minore capacità fermentativa rispetto a *Saccharomyces*, tuttavia, è in grado di raggiungere il 10% v/v di alcol (Martin *et al.*, 2018). Visti i requisiti di cantina sia in termini di qualità del prodotto che di gestione pratica durante la vendemmia, tale apiculato viene solitamente utilizzato in inoculi sequenziali con Sc al raggiungimento di un calo di densità di circa 30 punti. Tra le caratteristiche osservate, una in particolare eccelle in Hv: la sovrapproduzione in acetato di β -feniletile. Questa molecola - assieme all'alcol da cui deriva (β -feniletanolo) - contribuisce alla nota di rosa di origine fermentativa nel vino quando raggiunge concentrazione sopra la sua soglia organolettica (0,25 mg/L). In condizioni enologiche, i vini fermentati con Hv possono superare i 13 mg/L di acetato β -feniletile, corrispondenti a oltre 50 unità di *flavour* (Medina *et al.*, 2016). Le concentrazioni sono risultate sempre superiori rispetto a quelle prodotte da Sc, nei quali peraltro non si raggiungono spesso valori oltre la soglia di percezione.

Una volta validate le peculiarità enologiche dei lieviti nSc, un primo prerequisito per l'industria delle biotecnologie enologiche risiede nell'attitudine alla liofilizzazione, per esigenze produttive e di commercializzazione. Questo primo lavoro illustrerà in chiave tecnologica i risultati di una più ampia sperimentazione condotta con il ceppo liofilizzato Hv-205 di *Hanseniaspora vineae* per la produzione di tre diverse partite di Chardonnay base spumante. Il ceppo è stato selezionato in Uruguay per le sue caratteristiche fermentative e per l'elevata capacità

di produzione di composti aromaticamente attivi nel vino. Queste peculiarità compositive della frazione volatile verranno invece affrontate in un numero successivo di questa rivista.

Materiali e metodi

Per la sperimentazione sono state utilizzate tre partite di uve Chardonnay provenienti da 3 areali del Trentino Alto-Adige (CH-A, CH-B e CH-C), vendemmiate a maturità tecnologica, e vinificate mediante un protocollo paragonabile a quello utilizzato nella produzione di vini base spumante della DOC Trento. Per ciascuna partita, all'uva intera è stato aggiunto ghiaccio secco all'interno di una pressa pneumatica e pressata fino al raggiungimento di una resa del 50% (p/p), applicando una pressione massima di esercizio di 0.6 bar. Il mosto è stato addizionato con metabisolfito di potassio (15 mg/L), acido ascorbico (5 mg/L) ed enzimi pectolitici (1 mL/hL; Rapidase Clear Extreme, Oenobrand, Montpellier, France), mantenendo, per quanto possibile, le condizioni di anossia con la CO₂ sublimata. Dopo 24 ore di decantazione statica a freddo (10°C), il mosto chiarificato (100-150 NTU) è stato diviso in 4 masse omogenee per ogni areale. Il piano sperimentale prevedeva la fermentazione di due tesi in duplicato, una inoculata con il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* LVCB (Sc) in purezza (Oenobrand, Montpellier, France) e una con *Hanseniaspora vineae* Hv-205 (Hv) in inoculo sequenziale con Sc al raggiungimento del 6% v/v. Entrambe le tesi sono state inoculate con una concentrazione cellulare di 5·10⁶ CFU/mL e arricchiti con 300 mg/L di autolisa-

to di lievito in seguito a ogni inoculo (Natuferm Bright, Oenobrand, Montpellier, France). La fermentazione è stata condotta a 18-20 °C, monitorando la cinetica attraverso la misura del grado °Brix. L'analisi delle caratteristiche compositive di base del mosto e del vino sono state effettuate tramite spettroscopia nell'infrarosso con trasformata di Fourier (WineScan™ FT 120 Type 77310, Foss Electric A/S Hillerød, Denmark). L'analisi del triptofolo nel vino e delle vitamine nel mosto sono state realizzate in UHPLC accoppiato ad un spettrometro di massa ibrido quadrupolo (Roman *et al.*, 2020), mentre gli amminoacidi del mosto sono stati quantificati dopo separazione in HPLC con un detector fluorimetrico.

Risultati

Come si può osservare nella figura 1, le cinetiche di fermentazione con *S. cerevisiae* sono risultate sovrapponibili nelle tre partite di Chardonnay. Questo risultato era alquanto atteso data la sostanziale equiparabilità fra i principali parametri di controllo qualitativo dei mosti (Tab. 1), in particolare circa il contenuto di zuccheri riduttori e di azoto prontamente assimilabile (APA).

A confronto con *Saccharomyces*, le fermentazioni gestite tramite inoculi sequenziali con Hv si sono distinte per un veloce insediamento microbico, ma anche per un rallentato completamento della fermentazione alcolica. Tuttavia, le cinetiche fermentative sono risultate diverse in funzione della partita d'uva: in CH-A e CH-B, la velocità nelle prove condotte con Hv è rimasta costante lungo la maggior parte della fermentazione - anche

Partita	Brix (°)	Zuccheri riduttori	pH	Acidità titolabile (g/L)	Acido tartarico (g/L)	Acido malico (g/L)	Potassio (g/L)	APA (mg/L)
CH-A	19.76	194	3,16	9,3	7,41	5,39	1,86	144
CH-B	18.83	187	3,11	8,5	5,41	5,67	1,49	166
CH-C	19.10	193	3,12	7,8	4,66	5,39	1,37	129

Tab. 1 - Composizione dei mosti di partenza



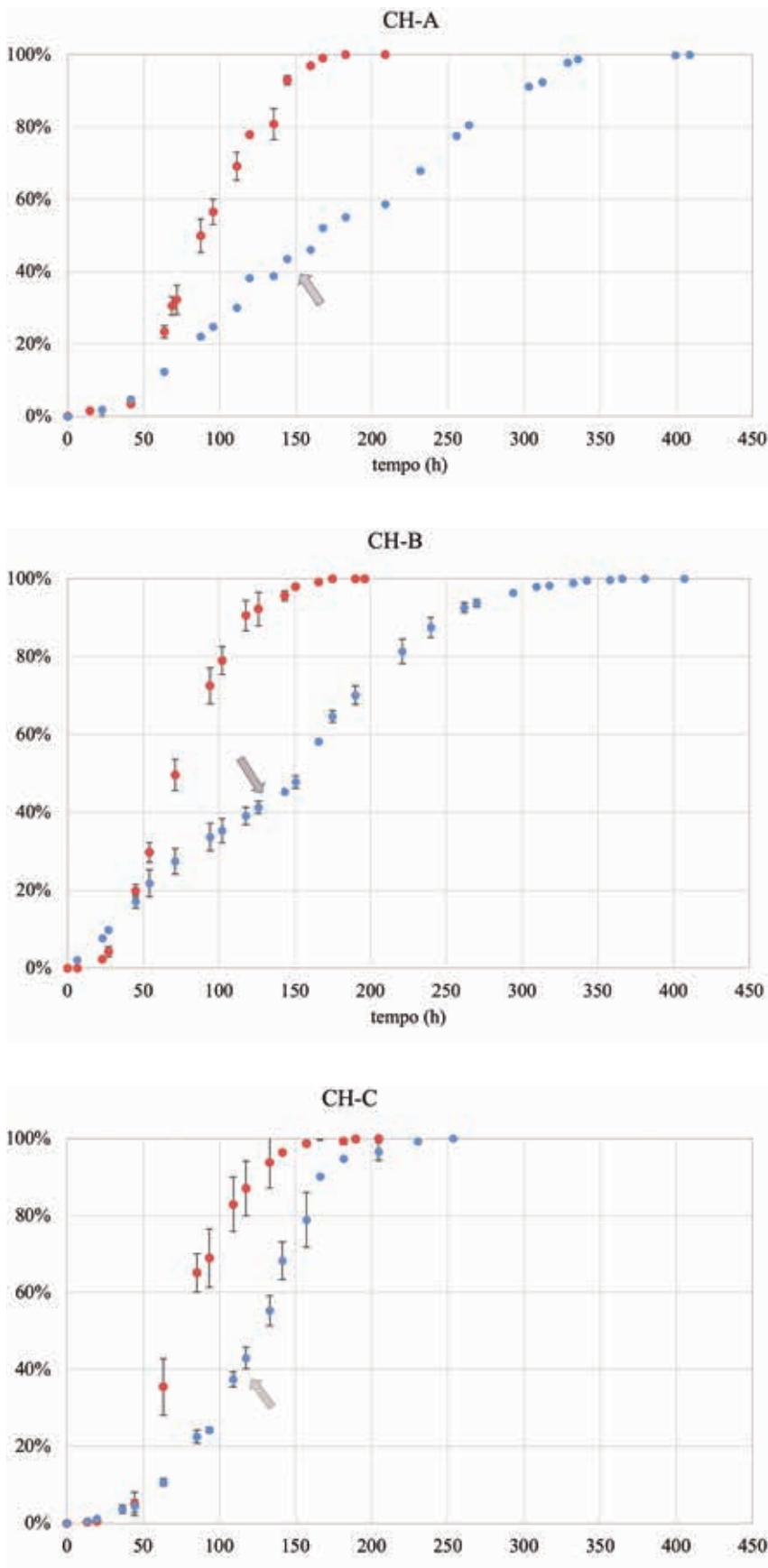


Fig. 1 - Cinetica fermentativa media (n=2) espressa come % del compimento della fermentazione alcolica dei processi gestiti da *Saccharomyces cerevisiae* (●) e *Hanseniaspora vineae* (●). Le frecce indicano il momento dell'inoculo sequenziale nelle tesi Hv con *S. cerevisiae*

in seguito dell'inoculo con *Sc* - con tempi superiori per il compimento del processo. Questo comportamento è tipico della presenza di fattori limitanti della crescita del lievito, spesso associato a carenze nutrizionali. In CH-C, la cinetica del processo gestito con *Hv*, seppur dilazionata rispetto ai corrispondenti *Sc*, non sembra invece presentare un'inibizione di matrice come quella riportata nelle altre due partite. Per giunta, i tempi necessari per completare la fermentazione alcolica sono risultati compatibili con le esigenze industriali.

Pur a fronte di un contenuto di APA paragonabile fra i tre mosti, CH-C presentava concentrazioni significativamente superiori di acido glutammico, glicina, isoleucina e leucina, aminoacidi noti per essere fra quelli preferibilmente assorbiti da *Hv* (Lleixà *et al.*, 2019). Inoltre, il contenuto di acido pantotenico nel mosto CH-C è risultato superiore rispettivamente del ~26% e del ~45% rispetto a CH-A e CH-B. In relazione alla tiamina, la concentrazione in CH-C era altresì superiore, del ~13% e del ~36%, pur non differenziandosi dal punto di vista statistico.

La presenza di queste vitamine nelle fasi iniziali di fermentazione è di particolare importanza poiché *Hv* non è in grado di sintetizzarle autonomamente (Labuschagne & Divol, 2021). Non solo, ma *Hv* presenta un utilizzo limitato dell'azoto ammoniacale e un diverso profilo di assorbimento aminoacidico rispetto a *Sc* (Lleixà *et al.*, 2019). La declinazione tecnologica di questi particolari metabolici consiglia un apporto di nutrienti ricchi in aminoacidi in concomitanza degli inoculi, anche per evitare ulteriori carenze in *Sc*.

L'incapacità di biosintetizzare alcune vitamine rende inoltre necessario l'apporto di tiamina in questa fase, vista anche la difficoltà operativa nel valutare il contenuto di vitamine nei mosti durante la vendemmia, parametro nutrizionale non compreso nell'APA.

Il numero di cellule di *Hv* tre giorni dopo l'inoculo iniziale ($5 \cdot 10^6$ UFC/mL) è risultata paragonabile nelle tre prove, con concentrazioni di circa $1,5 \cdot 10^7$ UFC/mL (Fig. 2). Al quinto giorno, ancor prima dell'inoculo di *Sc*, CH-C presenta una concentrazione

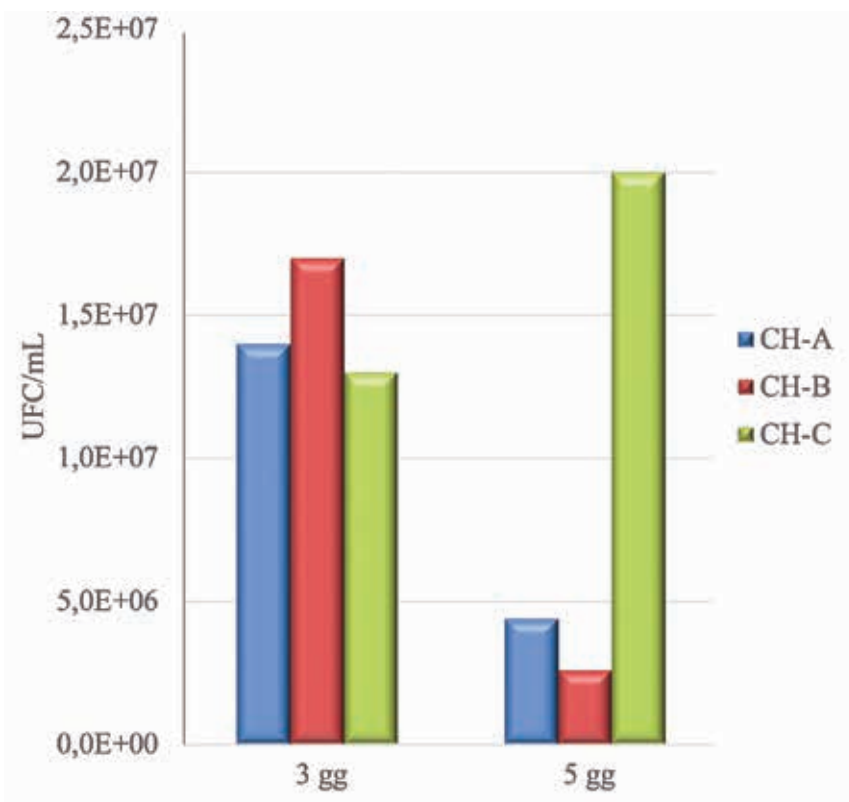


Fig. 2 - Concentrazione di cellule vive di *Hanseniaspora vineae* (UFC/mL) nei mosti in fermentazione 3 gg e 5 gg dopo l'inoculo

cellulare sostenuta mentre negli altri due mosti è diminuita di circa un'unità logaritmica. I decorsi fermentativi prolungati - in particolare per il lievito *non-Saccharomyces* - suscitano però

all'enologo preoccupazione in quanto monito di possibili arresti fermentativi, oltre che causa di potenziali deviazioni sensoriali come l'innalzamento dell'acidità volatile. L'analisi dei vini

a fine fermentazione alcolica (Tab. 2) non evidenzia, tuttavia, valori superiori di acidità volatile nelle vinificazioni condotte con *Hv*, risultando addirittura inferiori in CH-B. Questo aspetto, pur in presenza di evidenti fattori nutrizionali limitanti, conferma l'idoneità di questo ceppo di lievito nella gestione dell'acidità volatile durante la fase fermentativa.

Si ipotizza che questa particolarità di *Hv* possa essere riconducibile alla sua capacità di limitare lo sviluppo di altre specie microbiche durante le prime fasi di fermentazione.

Questo aspetto potrebbe essere la conseguenza di una più efficace assimilazione dei nutrienti - limitandone la disponibilità - o della produzione di talune molecole utilizzate nella comunicazione fra microorganismi in grado di regolare la densità cellulare: le cosiddette *Quorum-sensing molecules*, quali il triptofolo. Nella figura 3 si può osservare come la concentrazione nei vini a fine fermentazione alcolica di questo composto sia sempre superiore nelle vinificazioni *Hv*, indicativamente dalle 1,8 alle 4,7 volte, a prescindere della cinetica di fermentazione. In relazione ai parametri qualitativi del vino, un aspetto riguardante la componente acidica merita di essere messo in

Partita	Processo	Etanolo (% vol)	pH	Acidità titolabile (g/L)	Acidità volatile (g/L)	Zuccheri residui (g/L)	Acido tartarico (g/L)	Acido malico (g/L)	Acido lattico (g/L)	Glicerolo (g/L)	Potassio (g/L)
CH-A	<i>Hv</i>	11,81	3,26	6,8b	0,24	< 1,0	3,44	2,98b	< 0,50	6,50	0,88b
	<i>Sc</i>	11,72	3,25	8,3a	0,22	< 1,0	3,57	3,98a	< 0,50	6,65	1,16a
CH-B	<i>Hv</i>	11,28	3,29	7,2b	0,30b	< 1,0	3,45	3,38b	< 0,50	6,65	1,03
	<i>Sc</i>	11,36	3,40	8,6a	0,62a	< 1,0	3,14	4,48a	< 0,50	6,95	1,21
CH-C	<i>Hv</i>	11,41a	3,16	7,6b	0,17	< 1,0	3,53	3,23b	< 0,50	7,05	0,93
	<i>Sc</i>	11,31b	3,16	8,2a	0,20	< 1,0	3,31	3,91a	< 0,50	6,75	0,88

Tab. 2 - Composizione media dei principali parametri di controllo qualitativo dei vini a fine fermentazione alcolica. Lettere diverse indicano contenuti statisticamente differenziati

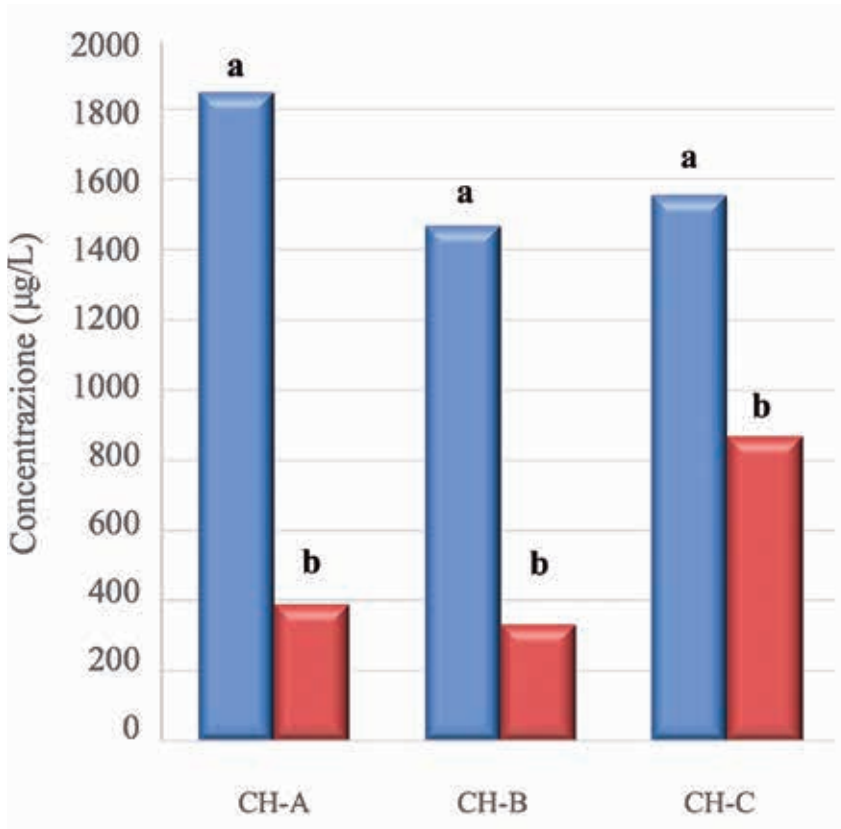


Fig. 3 - Concentrazione media di triptofolo (mg/L) nei vini a fine fermentazione alcolica. *Saccharomyces cerevisiae* (●) e *Hanseniaspora vineae* (●).

evidenza. In tutti i vini, il valore di acidità titolabile è risultato sensibilmente inferiore nei processi gestiti da *Hv*, senza che siano osservabili del pH. Questi valori sembrano essere la conseguenza della minor concentrazione di acido malico, mediamente del ~22% e corrispondenti a -0.9 g/L. L'assenza di acido lattico sopra il limite di quantificazione della metodica fa presupporre la metabolizzazione dell'acido malico da parte di *Hv* come fonte carboniosa, fenomeno già riportato per altri *nSc* (Ferrando *et al.*, 2020).

Questa caratteristica metabolica potrebbe essere sfruttata nella produzione di vini bianchi nel caso di annate fresche o di vendemmie anticipate per motivi sanitari, così come nella produzione di rossi che verranno sottoposti a fermentazione malolattica, per ridurre l'acido malico già durante la fermentazione alcolica.

Conclusioni

Lo studio ha permesso di confrontare le performances fermentative tra

il ceppo *Hv-205* di *Hanseniaspora vineae* e LVCB di *Saccharomyces cerevisiae*.

L'interpretazione dei risultati suggerisce un miglior adattamento di *Hv* nelle prime fasi di fermentazione, sebbene con tempi più lunghi per il completamento della fermentazione alcolica. Oltre alle differenze di natura microbiologica, si è osservato un diverso comportamento di *Hv* in funzione della composizione del mosto, che sembra essere correlato alla dotazione nel mosto di alcuni aminoacidi e vitamine. L'adeguato contenuto di fattori nutrizionali permette tuttavia di svolgere la fermentazione con *Hv* in tempi compatibili con le esigenze industriali. I parametri qualitativi del vino non si sono visti influenzati dal lievito ad eccezione dell'acido malico, ipotizzando la sua metabolizzazione da parte di *Hv*.

I risultati mettono in rilievo l'importanza di una corretta gestione del protocollo nutrizionale per sfruttare al meglio le potenziali prestazioni di questo lievito. In un prossimo

lavoro, che verrà pubblicato sulle pagine di questa rivista, sarà approfondita l'influenza del peculiare metabolismo di *Hanseniaspora vineae* sulla composizione volatile dei vini.

Bibliografia

- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21(2), 149-155.
- Gallo A., Guzzon R., Malacarne M., Ongaro M., Roman T. (2022). Acidificazione biologica del vin santo mediante l'impiego di *Lachancea thermotolerans*. *L'Enologo*, 4: 77-82
- Labuschagne, P., & Divol, B. (2021). Thiamine: a key nutrient for yeasts during wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 953-973.
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M. C., Carrau, F., Beltran, G., & Mas, A. (2019). Analysis of the NCR mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Frontiers in Genetics*, 10(1), 1-9.
- Martin, V., Valera, M. J., Medina, K., Boido, E., & Carrau, F. (2018). Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines—A review. *Fermentation*, 4(3), 76.
- Medina, Karina, Carrau, F., Boido, E., Fariña, L., & Dellacassa, E. (2016). Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* strains cofermentation increases acetaldehyde accumulation: effect on anthocyanin-derived pigments in Tannat red wines. *Yeast*, 5, 191-198.
- Roman, T., Nardin, T., Trenti, G., Barnaba, C., Nicolini, G., & Larcher, R. (2020). Press fractioning of grape juice: A first step to manage potential atypical aging development during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 71(1), 17-25. ■