



# FERMENTAZIONI SEQUENZIALI MEDIANTE L'IMPIEGÒ DI LIEVITI NON-CONVENZIONALI PER LA RIDUZIONE DEL CONTENUTO DI ETANOLO NEL VINO

Negli ultimi decenni, si è registrato un progressivo incremento del contenuto di etanolo nei vini a causa sia dei cambiamenti climatici, che delle tendenze di mercato orientate verso vini ben strutturati e corposi. Tra i differenti approcci e strategie per la riduzione del contenuto alcolico nel vino, in questo lavoro abbiamo proposto l'utilizzo di fermentazioni miste sequenziali utilizzando lieviti vinari non-convenzionali in forma immobilizzata. I ceppi di lievito non-*Saccharomyces* selezionati quali *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bombicola*, impiegati in fermentazioni sequenziali con il *Saccharomyces cerevisiae*, hanno mostrato una effettiva riduzione del contenuto di etanolo maggiore dell'1.0% v/v se confrontate con fermentazioni pure di *S. cerevisiae*. Inoltre, i vini ottenuti dalle fermentazioni sequenziali hanno mostrato profili analitici paragonabili o migliori di quelli ottenuti delle prove di controllo condotte con il solo *S. cerevisiae*.



Di  
**Maurizio Ciani**  
**Laura Canonico**  
**Francesca Comitini**  
**Lucia Oro**

Dipartimento Scienze della Vita  
 e dell'Ambiente, Università Politecnica  
 delle Marche - Ancona

(Da sinistra nella foto)

## INTRODUZIONE

■ I nuovi stili di vino associati a prodotti ben strutturati e caratterizzati da rilevante complessità aromatica, unitamente all'effetto dei cambiamenti climatici globali hanno determinato un aumento del contenuto medio di

etanolo nel vino (Jones *et al.*, 2005; Alston *et al.*, 2011). A tale proposito vari approcci sono stati proposti per la riduzione del contenuto alcolico nel prodotto finito, quali pratiche viticole, pratiche pre-fermentative, gestio-

ne della fermentazione e pratiche post-fermentative quali la dealcolizzazione del vino.

■ Tra gli approcci microbiologici proposti per la riduzione del contenuto alcolico nel vino possiamo annoverare l'impiego di lieviti ge-



## DOCUMENTO TECNICO

neticamente modificati (GM), la produzione di lieviti ibridi interspecifici generati da incroci tra *Saccharomyces cerevisiae*, o strategie che prevedono l'adattamento evolutivo (Tilloy *et al.*, 2014).

■ Un altro approccio per ridurre il contenuto di etanolo, si basa sull'impiego di lieviti vinari non-convenzionali di tipo non-*Saccharomyces*, isolati e selezionati dalla microflora normalmente presente sulle uve, durante la fermentazione e sulle attrezzature di vinificazione. Questi lieviti usati in combinazione con il *S. cerevisiae*, in fermentazioni multi-starter controllate sono stati proposti anche per migliorare il profilo complessivo del vino. Ad oggi, uno dei più recenti progressi biotecnologici in vinificazione è la pratica del co-inoculo con colture selezionate di lieviti non-*Saccharomyces* accoppiati con un ceppo starter *S. cerevisiae* (Comitini *et al.*, 2011).

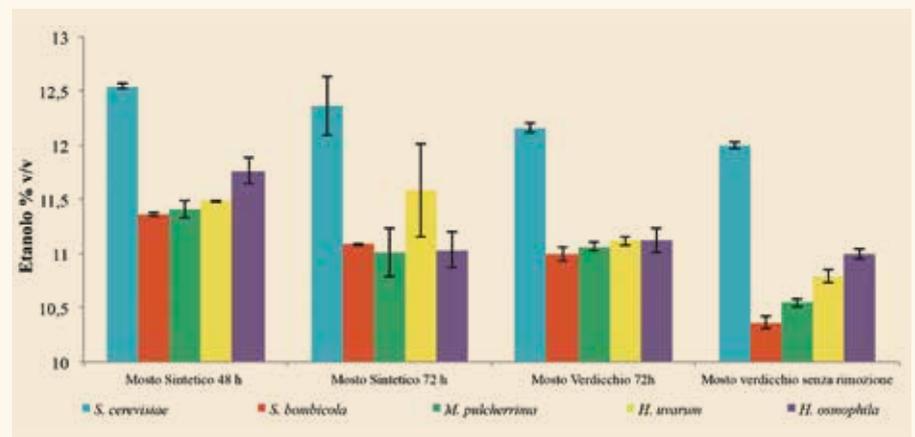
■ D'altra parte, l'uso di questi lieviti non-convenzionali, potrebbe rappresentare anche uno strumento interessante per ridurre il contenuto di etanolo nel vino. Infatti, il metabolismo di questi lieviti può influenzare la resa in etanolo, l'efficienza della fermentazione alcolica, la biomassa ed i sottoprodotti di fermentazioni (Gobbi *et al.*, 2014). Infine, diversi meccanismi di regolazione respiratoria, propri di alcuni lieviti non-convenzionali potrebbero essere una modalità per ridurre la produzione di etanolo attraverso l'impiego di ossigeno in fase fermentativa.

■ Tutti questi approcci hanno indicato l'uso promettente dei lieviti vinari non-convenzionali per limitare la produzione di etanolo (Quiros *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2015; Ciani *et al.*, 2016). In questo studio, abbiamo focalizzato l'attenzione sulle fermentazioni sequenziali utilizzando cellule immobilizzate di lieviti non-*Saccharomyces* in condizioni anaerobiche.

## FERMENTAZIONI SEQUENZIALI

■ L'allestimento di fermentazioni sequenziali con lieviti non-convenzionali rappresenta un approccio interessante per la riduzione del contenuto di etanolo nel vino. Infatti, questa modalità di inoculo permette di sfruttare il metabolismo del primo lievito inoculato, sen-

**Fig. 1** - Etanolo prodotto da lieviti non-convenzionali in fermentazioni sequenziali confrontate con la prova controllo del *S. cerevisiae*.



za l'influenza del secondo lievito inoculato in seguito. In questo modo, la riduzione del contenuto di etanolo è un obiettivo ottenibile sfruttando le caratteristiche metaboliche del ceppo non-convenzionale oltre alla possibilità di mettere in evidenza le sue caratteristiche sensoriali.

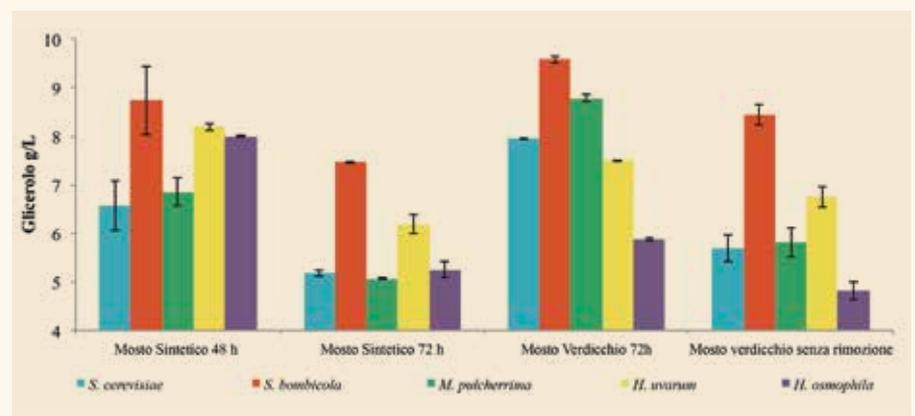
■ Per sfruttare le caratteristiche metaboliche dei lieviti non-convenzionali nelle fermentazioni sequenziali (bassa resa di etanolo, bassa efficienza fermentazione), due principali caratteristiche dovrebbero essere prese in considerazione: i) il livello di inoculo; ii) la durata dell'intervallo tra il primo e il secondo inoculo. Infatti, un alto livello di inoculo del lievito non-convenzionale migliora la competitività con il *S. cerevisiae*, mentre l'intervallo tra il

primo e il secondo inoculo influenza la durata e l'efficienza della sua attività metabolica.

■ Precedenti indagini sulle fermentazioni sequenziali con *Lachancea thermotolerans* e *S. cerevisiae* sono state allestite in condizioni di cantina utilizzando un alto livello di inoculo ( $10^7$  cellule/ml per *L. thermotolerans*) con un ritardo del secondo inoculo (ceppo *S. cerevisiae*  $10^6$ cell/ml) di due giorni per garantire la presa di possesso iniziale della fermentazione da parte del lievito non-*Saccharomyces* determinando una riduzione di etanolo dello 0.7% v/v (Gobbi *et al.*, 2013).

■ Più recentemente, fermentazioni sequenziali in condizioni di laboratorio con *Metschnikowia pulcherrima* hanno permesso di ottenere una effettiva riduzione di etanolo di

**Fig. 2** - Produzione di glicerolo da lieviti non-convenzionali in fermentazioni sequenziali confrontate con la prova controllo del *S. cerevisiae*.





## DOCUMENTO TECNICO

0.9% v/v e 1.6% v/v ritardando l'inoculo del ceppo *S. cerevisiae* di 9 e 17 giorni rispettivamente (Contreras *et al.*, 2014). Tuttavia, un prolungato (superiore a 3 giorni) intervallo di tempo tra il primo ed il secondo inoculo è difficile da realizzare in condizioni reali di cantina a causa della facile contaminazione da parte della microflora selvaggia (lieviti *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyces* selvaggi).

## CELLULE IMMOBILIZZATE E FERMENTAZIONI SEQUENZIALI

■ In un ambiente non sterile, come un processo di vinificazione, il lievito starter per definizione ha un'alta velocità di fermentazione, mentre il lievito vinario non-convenzionale generalmente possiede una velocità di fermentazione più bassa. Questa limitazione può essere superata utilizzando lieviti non-*Saccharomyces* in forma immobilizzata. Infatti, tra i diversi vantaggi nell'uso di lieviti immobilizzati, c'è la possibilità di utilizzare alte concentrazioni cellulari (velocità di reazione elevata), evitando problemi di competizione con la microflora selvaggia.

■ In questo contesto, abbiamo studiato l'effetto di fermentazioni sequenziali utilizzando cellule immobilizzate di quattro ceppi di lievito non-convenzionali: *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bombicola*, *M. pulcherrima* con il ceppo starter

di *S. cerevisiae* (EC 1118). Le fermentazioni sono state condotte in duplicato a 25 °C in mosto sintetico (Ciani e Ferraro 1998) contenente 220 g/L di zucchero e anche in mosto naturale della varietà Verdicchio contenente 202 g/L in condizioni statiche (anaerobiosi). Le prove di controllo sono state effettuate con cellule di *S. cerevisiae* libere. Sono stati valutati diversi parametri: cinetica di fermentazione, popolazione di lieviti, prodotti di fermentazione.

■ Dopo 48h e 72h le cellule immobilizzate sono state rimosse e il substrato è stato inoculato con cellule libere di *S. cerevisiae*. In mosto da uve Verdicchio, oltre alla rimozione delle cellule immobilizzate dopo 72h, sono state effettuate anche prove senza la rimozione dei lieviti immobilizzati.

■ I risultati relativi al contenuto di etanolo ottenuto durante le fermentazioni miste sono mostrati in **Fig. 1**. Tutte le fermentazioni sequenziali effettuate da lieviti non-convenzionali immobilizzati hanno mostrato una significativa riduzione del contenuto di etanolo rispetto alle prove di controllo (cellule libere di *S. cerevisiae*), probabilmente grazie all'elevata concentrazione cellulare dei lieviti non-*Saccharomyces*.

■ In particolare, le fermentazioni sequenziali in mosto sintetico a 48h (sempre con cellule immobilizzate di lieviti non-convenzionali) hanno mostrato un consumo di zuccheri nelle prime 48 h che va dal 11% al 21% determinando una riduzione di etanolo finale da 0.8% v/v al 1.2% v/v. Un aumento del tempo

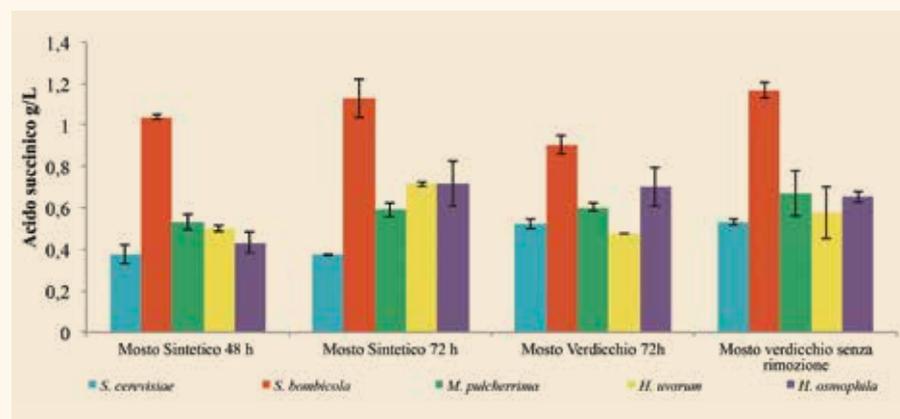
di inoculo da 48 h a 72 h del *S. cerevisiae* ha determinato l'aumento del consumo di zuccheri ed una ulteriore riduzione del contenuto di etanolo con l'eccezione della fermentazione sequenziale con *H. uvarum*.

■ Per quanto riguarda le prove di fermentazione in mosto naturale da uve Verdicchio con rimozione delle cellule immobilizzate, ha confermato sostanzialmente sia il consumo di zucchero esibito nelle prime 72 h, che la riduzione di etanolo mostrato in mosto sintetico. In queste condizioni non sono state mostrate differenze significative tra le varie fermentazioni sequenziali. Inoltre, è interessante notare, che durante la prova in mosto naturale senza rimozione delle cellule immobilizzate, al momento del secondo inoculo di *S. cerevisiae* (72 h) è stata ottenuta una ulteriore riduzione del contenuto di etanolo. Questo andamento è stato più marcato in fermentazioni sequenziali con *M. pulcherrima* e *S. bombicola*. Tutte le prove hanno inoltre completato la fermentazione alcolica con meno di 2 g/l di zuccheri residui.

■ Come atteso, il contenuto di glicerolo (**Fig. 2**) è stato più elevato in mosto naturale rispetto a quello sintetico, con l'eccezione della fermentazione sequenziale di *H. osmophila*. Tutte le fermentazioni sequenziali con le specie di lievito non-convenzionali, nelle diverse condizioni di fermentazione (modalità di inoculo e substrato, sintetico e naturale), evidenziano una maggiore o comparabile produzione di glicerolo rispetto al *S. cerevisiae* di controllo.

■ Tutte le fermentazioni sequenziali condotte con *S. bombicola* hanno mostrato un'alta produzione di glicerolo confermando la tendenza di questa specie a produrre tale composto. La fermentazione sequenziale con *H. uvarum* ha mostrato un comportamento simile, ma con una produzione di glicerolo inferiore. Anche per quanto riguarda la produzione di acido succinico (**Fig. 3**), tutte le fermentazioni sequenziali, in ogni condizione fermentativa, hanno mostrato un contenuto finale di questo metabolita più elevato di quello esibito dal *S. cerevisiae* in coltura pura. Questi risultati confermano la capacità di questi lieviti non convenzionali a produrre una rilevante quantità di prodotti secondari anche in fermentazioni sequenziali.

**Fig. 3** - Produzione di acido succinico da lieviti non-convenzionali in fermentazioni sequenziali confrontate con la prova controllo del *S. cerevisiae*.





## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ Questi risultati indicano che le fermentazioni sequenziali di lieviti non-convenzionali selezionati in forma immobilizzata, potrebbero essere una strategia microbiologica di fermentazione efficace per ridurre il contenuto di etanolo nel vino. Attraverso questo approccio infatti, è possibile evidenziare l'attività metabolica del ceppo non-convenzionale e ridurre il rischio di contaminazione da lieviti indigeni dell'ambiente di cantina attraverso un elevato livello di inoculo che permette di limitare l'intervallo di tempo del secondo inoculo.

■ Da tale studio è emerso che i ceppi più promettenti per ottenere una significativa riduzione di etanolo nel vino, sono risultati quelli appartenenti alle specie *M. pulcherrima* e *S. bombicola*. In vista della sua possibile applicazione, le modalità e la durata per sfruttare le attività metaboliche dei ceppi non-convenzionali in fermentazioni sequenziali dovrebbero essere ulteriormente definite, valutando i tempi e le modalità di inoculo dei ceppi starter. ■

## BIBLIOGRAFIA

- Alston JM, Fuller KB, James T. Lapsley JT, Soleas G- 2011. Too Much of a Good Thing? Causes and Consequences of Increases in Sugar Content of California Wine Grape. *J W E* 6:135-159.
- Ciani M, Ferraro L. 1998 Combined use of immobilised *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J Appl Bacteriol* 85:247-254.
- Ciani M, Morales P, Comitini F, Tronchoni J, Canonico L, Curiel JA, Oro L, Rodrigues AJ, Gonzalez R 2016. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* 7, 642.
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 28:873-888.
- Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, Henschke PA, Curtin C, Varela C. 2014 Evaluation of Non-Saccharomyces yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl Environ Microbiol.* 80:1670-1678.
- Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, Henschke PA, Curtin C, Varela C. 2015. The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int J Food Microbiol* 205:7-15.
- Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol* 33:271-281.
- Gobbi M, De Vero L, Solieri L, Comitini F, Oro L, Giudici P, Ciani M. 2014. Fermentative aptitude of non Saccharomyces wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. *Eur. Food Res. Technol.* 239:41-48.
- Jones GV, White MA, Cooper OR, Storchmann K. 2005. Climate change and global wine- quality. *Clim Change* 73:319-343.
- Morales P, Rojas V, Quirós M, Gonzalez R. 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:3993-4003.
- Quirós M, Rojas V, Gonzalez R, Morales P. 2014. Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *In J Food Microbiol* 181: 85-91. 26.
- Tilloy V, Ortiz-Julien A, Dequin S. 2014. Biotechnology reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl Environ Microbiol* 80: 2623-2632.