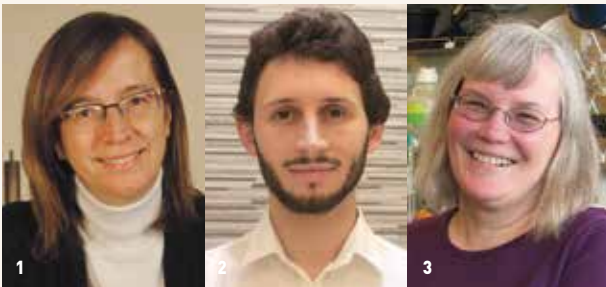


TRA I CINQUE FINALISTI AL PREMIO ASSOENOLOGI-VERSINI 2017

# SCHIZOSACCHAROMYCES JAPONICUS: LIEVITO CON ELEVATA CAPACITÀ DI RILASCIO DI POLISACCARIDI

## VALUTAZIONE DELL'IMPATTO SULLA STABILITÀ PROTEICA DEI VINI

Con il presente studio abbiamo evidenziato interessanti caratteristiche enologiche di un ceppo di *Schizosaccharomyces japonicus*, tra cui l'elevato rilascio di polisaccaridi. Da sottolineare la stabilità proteica raggiunta nei vini ottenuti dalle fermentazioni condotte con *S. japonicus* e correlabile all'elevata concentrazione di polisaccaridi da esso rilasciati.



Di

**Paola Domizio<sup>1</sup>**

Department of Viticulture & Enology, University of California-Davis - Davis (Usa)  
Dipartimento di Gestione Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF), Università degli Studi di Firenze - Firenze

**Livio Lencioni**

**Lorenzo Portaro<sup>2</sup>**

Dipartimento di Gestione Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF), Università degli Studi di Firenze - Firenze

**Linda Bisson<sup>3</sup>**

Department of Viticulture & Enology, University of California-Davis - Davis (Usa)

## INTRODUZIONE

● L'aggiunta al vino di prodotti commerciali contenenti polisaccaridi derivati dalle pareti cellulari dei lieviti, in particolare mannoproteine, sta diventando una pratica sempre più comune tra i produttori (Pozo-Bayon *et al.*, 2009). Diversi lavori scientifici hanno infatti evidenziato i molteplici vantaggi che possono derivare

dall'impiego di tali composti, tra cui: riduzione dell'instabilità proteica e tartarica (Brown *et al.*, 2007; Dupin *et al.*, 2000; Gerbaud *et al.*, 1997; Gonzalez-Ramos *et al.*, 2008; Moine-Ledoux and Dubourdieu, 1999; Lubbers *et al.*, 1994; Waters *et al.*, 1994), prevenzione dell'aggregazione e precipitazione dei tannini (Poncet-Le-grand *et al.*, 2007), incremento del volume in bocca (Vidal *et al.*, 2004; Gawell *et*

*al.*, 2016), aumento della dolcezza (Gualdupe and Aystaran, 2007; Rosi *et al.*, 1998), diminuzione dell'astringenza (Escot *et al.*, 2001; Quijada- Morín *et al.*, 2014), aumento della complessità e persistenza aromatica (Chalier *et al.*, 2007; Lubbers *et al.*, 1994), stabilizzazione del colore dei vini rossi (Fuster and Escot, 2002; Riou *et al.*, 2002) e stabilità della schiuma nei vini spumanti (Vanrell *et al.*, 2007).

● Le mannoproteine sono uno dei principali gruppi di polisaccaridi presenti nei vini e derivano dalla parete cellulare dei lieviti. Le mannoproteine vengono naturalmente rilasciate durante la fermentazione alcolica, in seguito alla moltiplicazione cellulare, e durante l'affinamento dei vini "sur lies", in seguito alla lisi cellulare (Boivin *et al.*, 1998; Charpentier and Feuillat, 1993; Charpentier *et al.*, 2004a; Llaubères *et al.*, 1987). Poiché non tutti i vini vanno incontro ad affinamento su fecce, l'utilizzo di lieviti in grado di rilasciare elevati quantitativi di mannoproteine durante la fermentazione alcolica potrebbe rappresentare un approccio molto interessante.

● *Saccharomyces cerevisiae*, principale attore della fermentazione alcolica, durante la fermentazione rilascia una quantità di mannoproteine normalmente compresa tra i 50 e 150 mg/L (Rosi *et al.*, 2000); tale quantità tuttavia non sembra essere sufficiente per garantire i diversi effetti positivi associati alle mannoproteine.

● Per incrementare la quantità di mannoproteine durante la fermentazione alcolica, alcuni ricercatori hanno sviluppato ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati (Brown *et al.*, 2007; Gonzalez-Ramos and Gonzalez, 2006; Gonzalez-Ramos *et al.*, 2008). Tuttavia l'impiego di tali microrganismi, oltre ad essere vietato in molti paesi non solo dell'Unione Europea, è ancora oggi ben lungi dall'essere accettato dai produttori e ancor meno dalla gran parte dei consumatori.

● A differenza di *S. cerevisiae*, gran parte dei lieviti non-*Saccharomyces*, naturalmente presenti sull'uva e nel corso della vinificazione, sono in grado di rilasciare durante la fermentazione alcolica importanti quantitativi di polisaccaridi. In uno studio condotto su un centinaio di lieviti non-*Saccharomyces*, appartenenti a otto differenti generi, Romani *et al.* (2010) ha evidenziato che la maggior parte di questi lieviti erano in grado di rilasciare un quantitativo di polisaccaridi anche due volte maggiore, rispetto a quello rilasciato in media da tre ceppi di *S. cerevisiae* cresciuti nelle stesse condizioni culturali. In particolare, un ceppo di *Schizosaccharomyces pombe* è risultato in grado di rilasciare una quantità di polisaccaridi ben cinque volte superiore a quella di *S. cerevisiae*. In uno studio più recente, Domizio *et al.* (2017) ha valutato otto ceppi di *Schizosaccharomyces* di origine enologica ed appartenenti alle specie *S. pombe* e *S. ja-*

Tab. 1 - Prove di fermentazione.

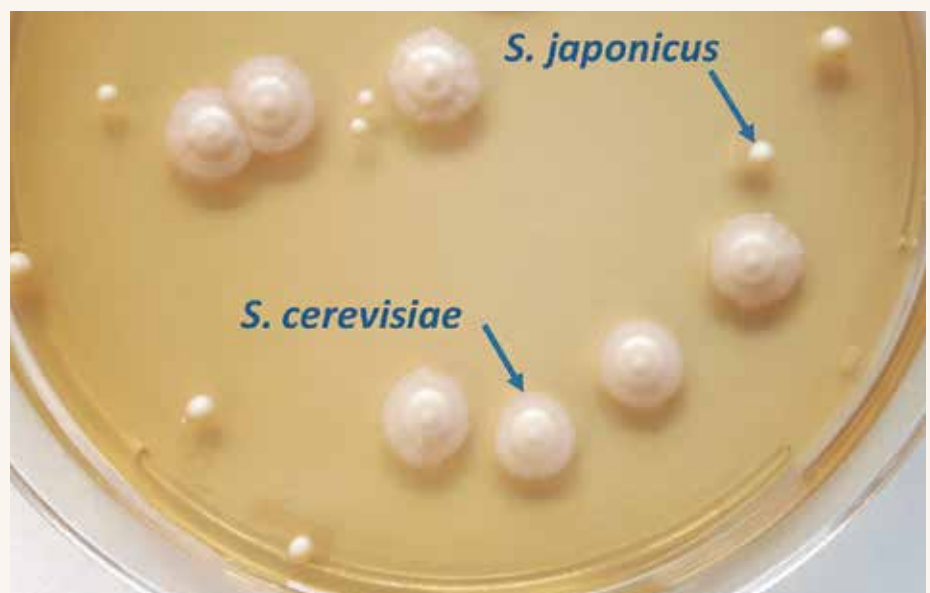
Codice prove	Lieviti	Inoculo
SC	<i>S. cerevisiae</i>	Coltura pura
SJ	<i>S. japonicus</i>	Coltura pura
SJim	<i>S. japonicus</i> (immobilizzato)	Coltura pura
SJ + SC	<i>S. japonicus</i> + <i>S. cerevisiae</i>	Misto-coinoculo
SJim + SC	<i>S. japonicus</i> (immobilizzato) + <i>S. cerevisiae</i>	Misto-coinoculo
SJim + SC 48h	<i>S. japonicus</i> (immobilizzato) + <i>S. cerevisiae</i>	Misto-sequenziale (48 h)

*ponicus* e ha confermato il rilascio di elevate quantità di polisaccaridi già durante i primi giorni della fermentazione alcolica. In particolare, i cinque ceppi di *S. pombe* utilizzati nello studio hanno rilasciato una quantità di polisaccaridi da 2 a 4 volte superiore a quella derivante da un ceppo di controllo di *S. cerevisiae*, mentre i tre ceppi della specie *S. japonicus* ne hanno rilasciato un quantitativo ben 4-7 volte superiore. I polisaccaridi rilasciati sono stati quindi caratterizzati ed è stato confermato che sono composti da galattosio oltre che da mannosio. I lieviti appartenenti al genere *Schizosaccharomyces* sono infatti gli unici lieviti contenenti galattomannoproteine nello strato esterno della parete cellulare. In particolare, la parete cellulare dei lieviti *Schizosaccharomyces* è me-

diamente composta da 9-14% di galattomannani, 18-28% di  $\alpha$ -1,3-glucani solubili in alcali, circa 24% di  $\beta$ -1,3 glucani solubili in alcali, circa 2% di  $\beta$ -1,6-glucani e circa 18%  $\beta$ -1,3-glucani insolubili in alcali (Manners and Meyer, 1977).

● Il maggiore quantitativo di polisaccaridi rilasciati nel mezzo dai lieviti *Schizosaccharomyces* durante la fermentazione alcolica, rispetto a quelli rilasciati dai lieviti *Saccharomyces*, potrebbe essere collegabile al loro carattere osmofilo. Tali lieviti infatti presentano una parete cellulare ricca in elementi di resistenza utili per sopportare elevate pressioni osmotiche, come appunto i polisaccaridi. Inoltre, in seguito alla moltiplicazione cellulare per scissione, tipica dei lieviti *Schizosaccharomyces*, è verosimilmente coinvolta una

Fig. 1 - Colonie di *S. cerevisiae* e *S. japonicus* su terreno nutritivo agarizzato (YPD).



maggior porzione di superficie della parete cellulare, rispetto a quella coinvolta nella moltiplicazione per gemmazione tipica dei lieviti *Saccharomyces*, con conseguente maggiore rilascio di polisaccaridi durante la crescita.

- I lieviti appartenenti alla specie *S. pombe* ormai da diversi anni sono proposti in vinificazione in quanto capaci di metabolizzare l'acido malico, consentendo così una disacidificazione biologica dei vini senza necessità di ricorrere all'intervento di batteri lattici (Ciani, 1995; Benito *et al.* 2012; Rankine, 1966; Silva *et al.*, 2003). A tal proposito, Benito *et al.* (2015), sfruttando la capacità dei lieviti appartenenti al genere *Lachancea thermotolerans* di produrre acido lattico, ha proposto l'impiego di inoculi misti *S. pombe*/*L. thermotolerans* con lo scopo di metabolizzare completamente l'acido malico e contemporaneamente bilanciare l'acidità di vini prodotti a partire da mosti con bassi livelli di acidità.

- Oltre alla capacità demalicante, i lieviti del genere *Schizosaccharomyces* presentano anche altre interessanti caratteristiche enologiche, come l'elevata produzione di glicerolo, la degradazione dell'urea (precursore dell'etilcarbammato) e la produzione di elevate quantità di acido piruvico durante i primi giorni della fermentazione alcolica (Benito *et al.*, 2012, 2014).

- Quest'ultimo acido, in particolare, sembra essere importante per la stabilità del colore del vino in quanto partecipa alla formazione di piranoantociani (Vitisina A),

che rimangono più stabili durante l'invecchiamento del vino rispetto alle antocianine dell'uva (Morata *et al.*, 2003).

- Ad oggi, è presente nel mercato un solo ceppo di *S. pombe*. Tale ceppo viene commercializzato in forma immobilizzata in calcio alginato (Promalic®). L'immobilizzazione delle cellule di *S. pombe* risulta necessaria in quanto è stato osservato che la permanenza di tale lievito nel vino per lunghi periodi dopo la fermentazione malo-alcolica potrebbe portare all'insorgenza di off-flavour (Ciani *et al.*, 2010). La forma immobilizzata invece può essere facilmente rimossa dal substrato in fermentazione dopo il raggiungimento del livello desiderato di degradazione dell'acido malico e prima della eventuale produzione di off-flavour (Magyar & Panyik, 1989; Portugal *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2003).

- Fino ad oggi i lieviti appartenenti alla specie *S. japonicus* non sono mai stati utilizzati in vinificazione. Pertanto, anche in considerazione della loro capacità di rilascio di un elevato quantitativo di polisaccaridi durante la fermentazione alcolica, con il presente lavoro abbiamo voluto studiare il comportamento fermentativo di un ceppo di *S. japonicus*, in forma libera ed in forma immobilizzata in calcio alginato.

- Le prove sono state condotte in coltura pura e in coltura mista con un ceppo commerciale di *S. cerevisiae*, sia in coinoculo sia con inoculo sequenziale dopo 48 ore dall'inoculo di *S. japonicus*, al fine di valutarne i principali effetti sulle caratteristiche dei vini.

## MATERIALI E METODI

### Disegno sperimentale

- Le fermentazioni sono state allestite in triplo (Tab. 1) utilizzando beute da 500 mL contenenti 350 mL di mosto, chiuse con valvole di Muller contenenti acido solforico. Le fermentazioni sono state condotte a 22°C, in agitazione a 150 rpm.

- Come substrato fermentativo è stato utilizzato mosto di uve Trebbiano (zuccheri 236,7 g/L; acido L-malico 2,8 g/L; acidità totale, espressa in acido tartarico, 8,9 g/L), pastorizzato a 80°C per 20 minuti. La pastorizzazione si è resa necessaria al fine di escludere le interferenze derivanti dall'attività metabolica degli altri lieviti naturalmente presenti nei mosti e poter così valutare l'impatto del lievito *S. japonicus*, inoculato singolarmente o con un ceppo di *S. cerevisiae*, sulle caratteristiche dei fermentati.

- I lieviti utilizzati sono stati: *Schizosaccharomyces japonicus* UCD2489 (Dipartimento di Viticoltura ed Enologia dell'Università di Davis, California), e *Saccharomyces cerevisiae*, EC1118 (Lallemand Inc., Montreal, Canada).

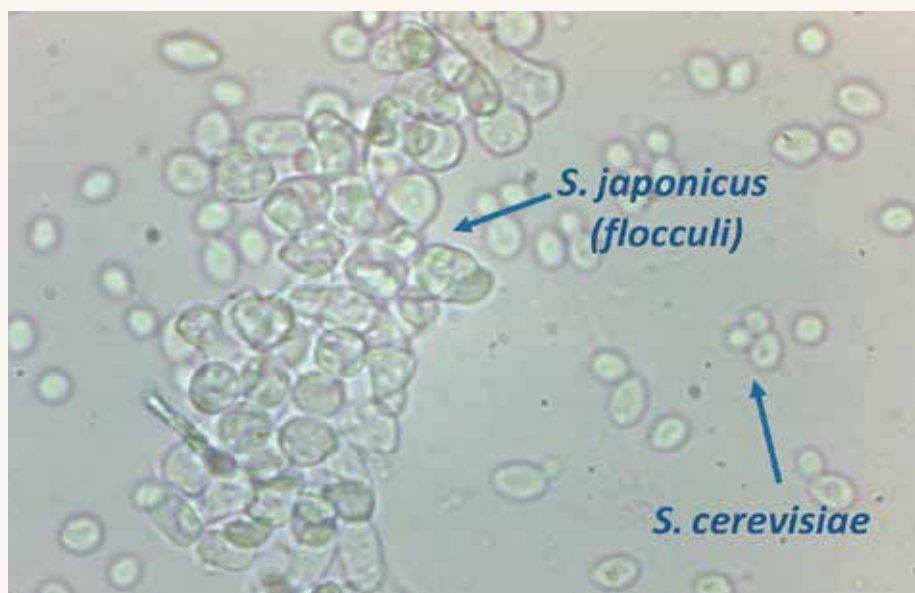
### Preparazione degli inoculi

- La precoltura, per ciascuno dei due lieviti oggetto di studio, è stata allestita utilizzando lo stesso mosto impiegato per la fermentazione. Le beute, contenenti la precoltura, sono state poste in agitatore orbitale a 150 rpm, per 48h a 25°C. Le cellule di lievito sono state successivamente raccolte per centrifugazione (8.000 rpm, a 4°C, per 10') e lavate con soluzione fisiologica sterile (NaCl 0,85%, p/v). La conta cellulare della sospensione cellulare, effettuata al microscopio ottico utilizzando una camera contacellule Thoma, ha consentito di calcolare il volume necessario da utilizzare per l'inoculo del mosto e per la percentuale di precoltura da utilizzare durante l'immobilizzazione delle cellule di *S. japonicus* nell'alginato di calcio.

### Immobilizzazione delle cellule di *S. japonicus*.

- Per l'immobilizzazione delle cellule di *S. japonicus*, il 5% della sospensione cel-

Fig. 2 - Flocculi di *S. japonicus* dopo 3 giorni di fermentazione, in coltura mista con *S. cerevisiae*.

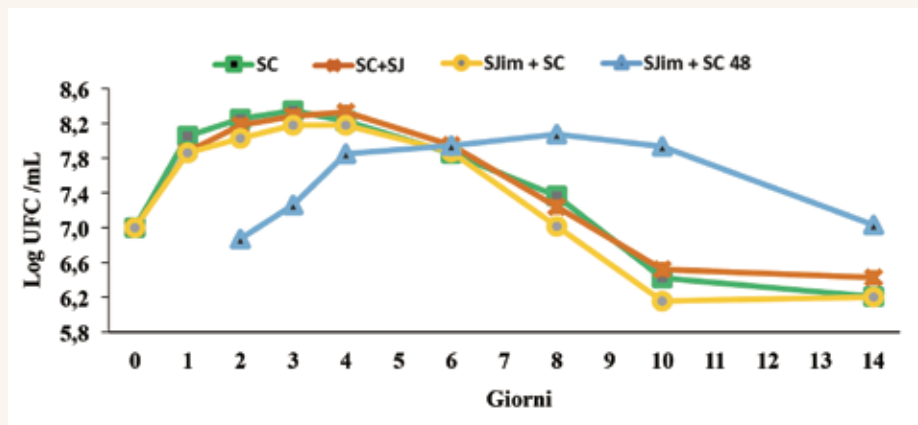


lulare, ottenuta a partire dalla precoltura di *S. japonicus*, è stata miscelata con una soluzione al 2,5% di alginato di sodio. La miscela così ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia tramite una pompa peristaltica ad una soluzione di cloruro di calcio (0,5% p/v), per indurre la gelificazione dell'alginato. Le sferette di alginato così ottenute sono state lasciate ad indurire per ulteriori 12 ore in agitazione nella stessa soluzione di cloruro. Successivamente, le sferette sono state risciacquate con acqua deionizzata sterile. I pori del gel così formato hanno dimensioni tali da permettere il passaggio del substrato fermentativo e dei prodotti metabolici, ma non la fuoriuscita delle cellule.

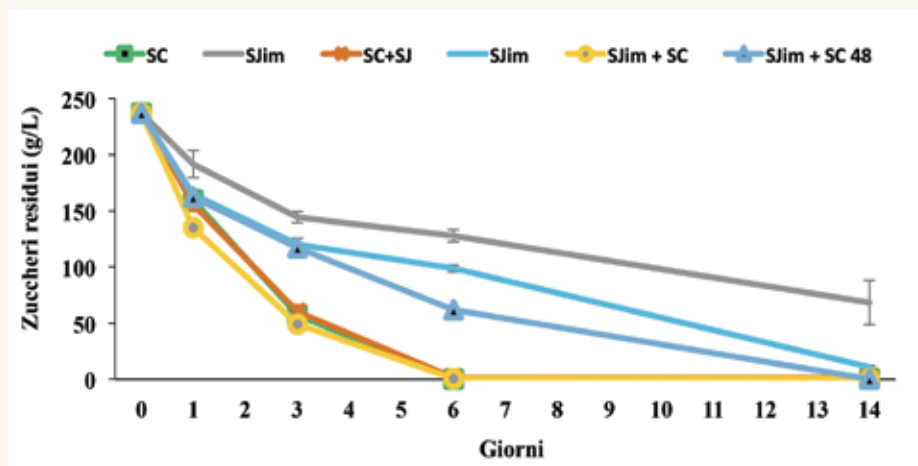
**Controlli microbiologici e determinazioni analitiche**

- Durante la fermentazione alcolica e a fine fermentazione, da ciascuna beuta sono state giornalmente prelevate aliquote di campione per la conta vitale su piastra di *S.cerevisiae* e per le determinazioni analitiche di vari parametri chimici.
- Per la conta vitale dei lieviti, i campioni prelevati dalle beute di ciascuna prova, dopo opportuna diluizione seriale in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%, p/v), sono stati seminati su piastre contenente terreno nutritivo agarizzato YPD (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Glucosio 2%, Agar 1.5%). I due lieviti hanno mostrato distinte caratteristiche morfologiche su questo terreno (**Fig. 1**) rendendo possibile la conta differenziale di *S. cerevisiae*. Purtroppo la conta vitale di *S.japonicus* è stata possibile solo fino al secondo giorno, in quanto a partire dal terzo giorno di fermentazione questo lievito flocculava (**Fig. 2**), rendendo pertanto difficile una sua accurata conta su piastra.
- L'evoluzione della fermentazione alcolica e' stata monitorata valutando il consumo degli zuccheri (glucosio e fruttosio) mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rilevazione rifrattometrica, e con la stessa tecnica cromatografica è stata seguita l'evoluzione del contenuto di polisaccaridi (Domizio *et al.*, 2014). La concentrazione dell'acido malico e del glicerolo e' stata invece determinata mediante kit enzimatici.
- La concentrazione dell'etanolo e l'acidità volatile a fine fermentazione sono stati determinati secondo i Metodi Ufficiali, rispettivamente per via densitometrica sui

**Fig. 3** - Curve di crescita di *S. cerevisiae* in coltura pura e in coltura mista con *S. japonicus*. Le curve rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.



**Fig. 4** - Cinetiche di fermentazione di *S. cerevisiae* e *S. japonicus*, in coltura pura e in coltura mista. Le curve rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.



distillati dei campioni e per titolazione dei distillati in corrente di vapore.

- A fine fermentazione è stata anche valutata la stabilità proteica dei vini ottenuti da ciascuna prova utilizzando il Bentotest (Richard Wagner, Alzey, Germany). La torbidità dei vini è stata misurata mediante nefelometro (HI88703 turbidimeter, Hanna Instrument Inc.).

**RISULTATI E DISCUSSIONE**

**Cinetica di fermentazione e crescita cellulare di *S. cerevisiae***

- La conta vitale di *S. cerevisiae* in coltura pura e in coltura mista (**Fig. 3**) è stata effettuata al fine di determinare l'impatto derivante dall'inoculo di cellule libere ed immobilizzate del lievito *S.japonicus*

UCD2489 sulla cinetica di crescita di *S. cerevisiae* durante la fermentazione alcolica. Nelle fermentazioni coinoculate (SJ + SC; SJim + SC) si può notare che la presenza di *S.japonicus* non ha influenzato la crescita di *S.cerevisiae*, che ha mostrato una cinetica di crescita simile a quella avuta in coltura pura (SC). In accordo a questo, anche la cinetica di fermentazione della coltura pura di *S.cerevisiae* (**Fig. 4**) era simile a quella delle fermentazioni coinoculate (SJ + SC; SJim + SC). Una minore velocità di fermentazione è stata invece osservata nella fermentazione con inoculo sequenziale di *S.cerevisiae* (SJim + SC48h). Questo rallentamento potrebbe essere dovuto alla più bassa attività fermentativa di *S.japonicus* ma anche alla più lenta crescita di *S. cerevisiae* verificatasi in questa prova durante i primi quattro giorni della fermentazione. La crescita più lenta di *S. cerevisiae* potrebbe

be a sua volta essere conseguenza di una competizione nutrizionale tra i due lieviti. *S. japonicus* potrebbe quindi aver impoverito il substrato di crescita di particolari elementi nutritivi, oppure aver rilasciato fattori inibenti lo sviluppo di *S. cerevisiae*.

- A questo riguardo, anche Taillander *et al.* (1995) aveva osservato che la crescita di *Saccharomyces* era in qualche modo inibita da *S. pombe* e che tale inibizione era proporzionale alla concentrazione del lievito *Schizosaccharomyces*. Tuttavia, nonostante la più lenta iniziale cinetica di fermentazione, anche nella prova con inoculo sequenziale (SJim + SC48h) gli zuccheri sono stati completamente metabolizzati dopo 14 giorni di fermentazione alcolica, così come nelle prove condotte con *S. cerevisiae* in purezza.

### Profilo metabolico delle fermentazioni

- Nelle fermentazioni miste con *S. japonicus* immobilizzato (SJim + SC e SJim + SC48h) si è osservata una sostanziale riduzione della concentrazione di etanolo rispetto alle prove condotte con inoculo di solo *S. cerevisiae* (SC) (Fig. 5). Tenori di etanolo simili a quelli nella prova con *Saccharomyces* in purezza sono stati invece ottenuti nelle fermentazioni coincolate ma con *S. japonicus* in forma non immobilizzata (SJ + SC). In queste ultime prove, il più basso rapporto di inoculo *S. japonicus*/*S. cerevisiae* (ratio 1:10) rispetto a quello utilizzato nelle prove SJim + SC con cellule immobilizzate di *S. japonicus* (ratio 1:1), probabilmente ha deter-

minato la dominanza di *S. cerevisiae* sin dall'inizio della fermentazione alcolica e quindi, a sua volta, una maggiore produzione di alcool.

- Va comunque evidenziato che la più bassa resa alcolica osservata nella fermentazione mista con *S. japonicus* immobilizzato e *S. cerevisiae*, potrebbe rappresentare un vantaggio per la fermentazione di mosti con una elevata concentrazione zuccherina, permettendo di ottenere in modo naturale vini con un più basso contenuto di alcool. Infatti, la possibilità di ridurre il contenuto alcolico dei vini va incontro alla crescente domanda dei consumatori di vini con un più basso contenuto alcolico (Ciani *et al.* 2016).

- *S. japonicus* in coltura pura nella forma non immobilizzata (SJ), nonostante la bassa quantità di zuccheri fermentati, ha prodotto vini con elevati valori di acidità volatile. Al contrario, quando inoculato nella forma immobilizzata (SJim), *S. japonicus* ha portato a vini con valori di acidità volatile più bassi e simili a quelli delle prove di controllo con *Saccharomyces* (SC) (Fig. 5). D'altra parte è noto che l'immobilizzazione del lievito in alginato di calcio crea uno strato protettivo intorno alle cellule, rendendole così più resistenti all'etanolo (Norton *et al.* 1995), di conseguenza, migliorando le performance fermentative del lievito immobilizzato rispetto a quello libero. Valori di acidità volatile simili a quelli con la coltura di *S. cerevisiae* (SC) sono stati osservati nelle fermentazioni miste delle prove coincolate con *S. japonicus*, sia nella forma libera (SJ + SC) sia nella forma immobilizzata (SJim + SC). Un sostanziale aumento di acidità volatile è stato invece osservato durante la fermentazione con inoculo sequenziale (SJim + SC48h).

- Il lievito *S. japonicus* in coltura pura (SJ e SJim) è inoltre risultato in grado di produrre livelli di glicerolo due volte maggiori di quelli prodotti da *S. cerevisiae* (SC) cresciuto nelle stesse condizioni (Fig. 5). Negli svinati delle fermentazioni miste in coincolo (SJ + SC e SJim + SC) le concentrazioni di glicerolo erano simili a quelli del controllo con *S. cerevisiae* in coltura pura. Invece, negli svinati delle fermentazioni sequenziali (SJim + SC48h) si sono riscontrati tenori di glicerolo simili a quelli prodotti in coltura pura da *S. japonicus*, sia in forma libera sia immobilizzata (SJ e SJim).

- La capacità di metabolizzare l'acido

Fig. 5 - Concentrazione dell'etanolo, glicerolo e acido acetico nelle diverse prove alla svinatura. I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

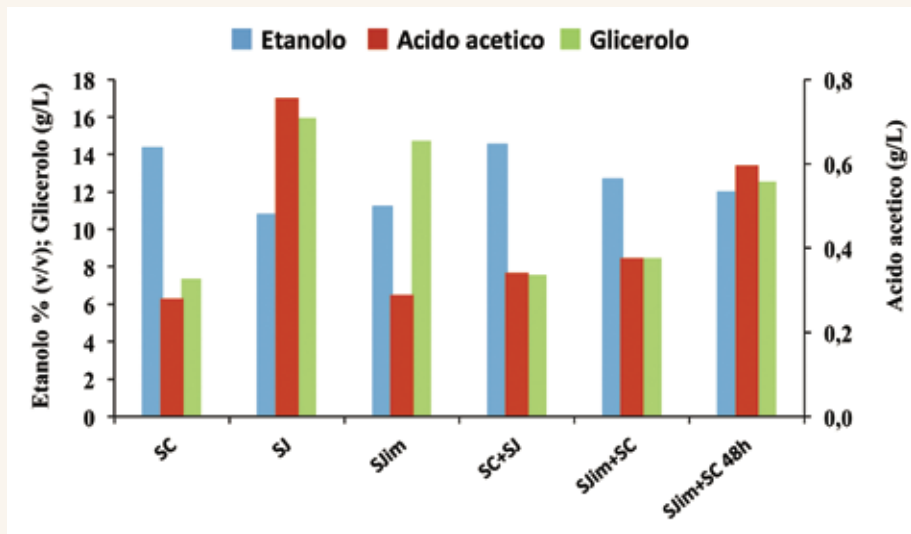
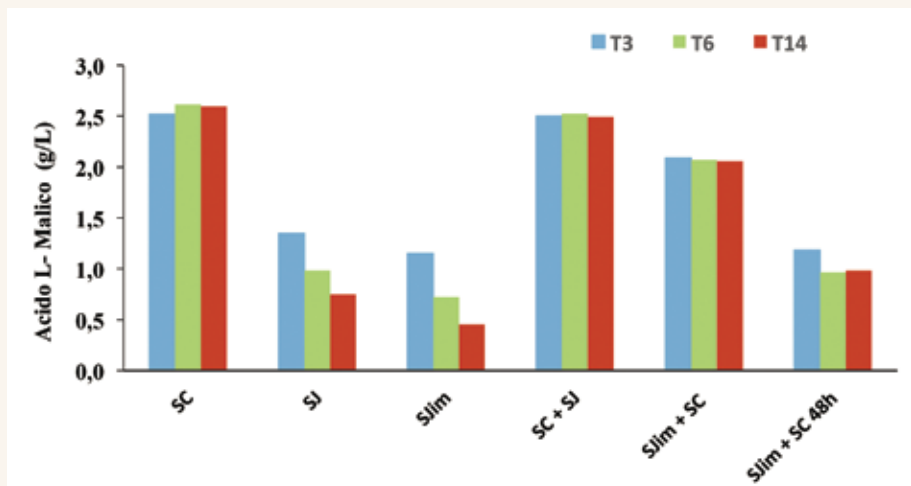


Fig. 6 - Concentrazione dell'acido malico nelle diverse prove dopo 3 giorni (T3), 6 giorni (T6) e 14 giorni (T14) di fermentazione. I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.



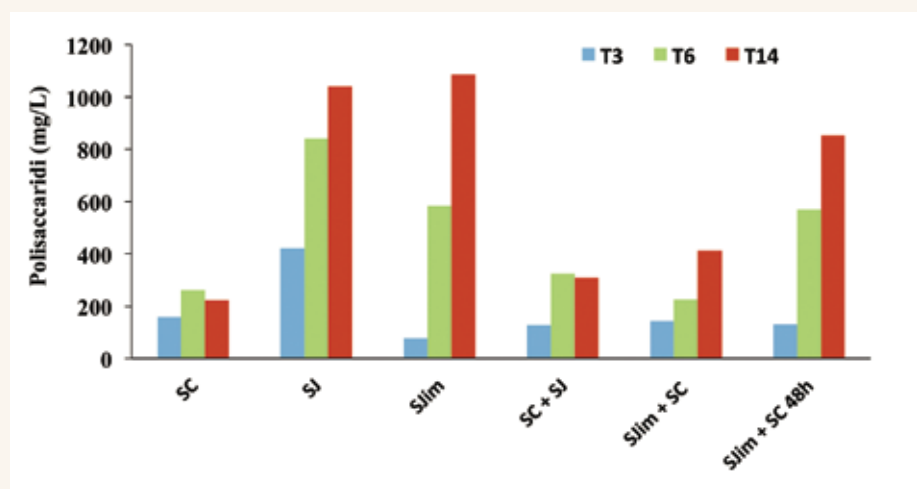
malico, tipica dei lieviti appartenenti alla specie *S.pombe*, è stata confermata anche per il ceppo UCD2489 appartenente alla specie *S. japonicus*. In particolare, il ceppo *S. japonicus* in coltura pura, sia nella forma libera sia in quella immobilizzata (SJ e SJim), già al terzo giorno di fermentazione è riuscito a metabolizzare rispettivamente il 52% e il 59% dell'acido malico iniziale (2,85 g/L) (Fig. 6). Un'ulteriore degradazione del malico è stata osservata nei giorni successivi, raggiungendo il 73% e 78% alla fine della fermentazione alcolica. La degradazione di questo acido è risultata influenzata negativamente da *S.cerevisiae*, quando presente sin dall'inizio della fermentazione alcolica. Infatti, nella fermentazione sequenziale (SJim + SC 48h) il 58% dell'acido malico è stato fermentato entro i primi tre giorni, rispetto all'11% e 26% metabolizzato nelle fermentazioni coinoculate SJ

+ SC e SJim + SC, rispettivamente. Nelle fermentazioni miste la degradazione dell'acido malico è stata quindi verosimilmente influenzata dal rapporto *S. japonicus* / *S. cerevisiae*. Questi risultati sono molto interessanti in quanto evidenziano come la gestione del rapporto di inoculo *S. japonicus* / *S. cerevisiae* potrebbe in qualche misura consentire di controllare il grado di disacidificazione dei vini.

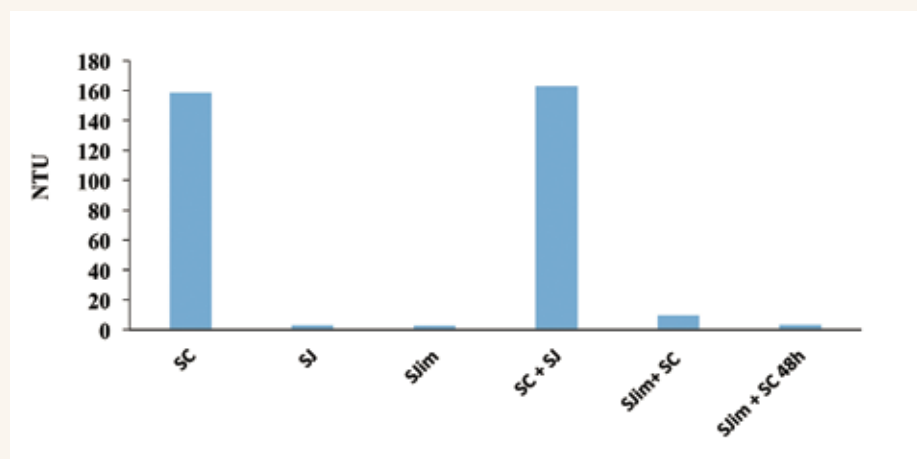
● Particolarmente interessante è stato l'elevato rilascio di polisaccaridi nel mezzo di fermentazione da parte del lievito *S. japonicus* (Fig. 7), confermando anche su mosto reale quanto precedentemente osservato durante fermentazioni su mosto sintetico (Domizio *et al.* 2017). Infatti, nelle fermentazioni condotte con *S. japonicus*, sia in forma libera sia in forma immobilizzata, sono stati riscontrati livelli di polisaccaridi circa 5 volte superiori a quelli presenti nelle fermentazioni

condotte con *S. cerevisiae* in purezza. Il rilascio dei polisaccaridi è risultato solo leggermente rallentato nelle prove con le cellule di *S. japonicus* immobilizzate in alginato (SJim), che tuttavia hanno rilasciato alla fine della fermentazione la stessa quantità di polisaccaridi rilasciata dalle cellule di *S. japonicus* nella forma non immobilizzata. Elevate concentrazioni di polisaccaridi sono state riscontrate anche nelle prove con inoculo sequenziale di *S. cerevisiae* (SJim + SC48h), presentando livelli circa 4 volte superiori a quelli ottenuti nelle fermentazioni inoculate solo con *S. cerevisiae*. Nelle fermentazioni miste con coinoculo *S. japonicus* / *S. cerevisiae* (SJ + SC e SJim + SC), la concentrazione di polisaccaridi era invece circa il 65-70% più bassa di quella presente nei fermentati ottenuti con la coltura pura di *S. japonicus*.

**Fig. 7** - Concentrazione dei polisaccaridi nelle diverse prove dopo 3 giorni (T3), 6 giorni (T6) e 14 giorni (T14) di fermentazione. I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.



**Fig. 8** - Test stabilità proteica (Bentotest). Misurazione nefelometrica (NTU: Nephelometric Turbidity Units). I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.



### Test di stabilità proteica

● La stabilità proteica dei vini è stata valutata tramite Bentotest e lettura nefelometrica. La differenza dei valori di torbidità ( $\Delta$ NTU) registrati prima e dopo il trattamento con Bentotest, sono riportati in Fig. 8.

● I vini ottenuti dalle fermentazioni condotte sia con *S. cerevisiae* in purezza (SC) sia con inoculo misto con *S. japonicus* in forma libera (SC + SJ), hanno mostrato valori di torbidità significativamente più elevati rispetto a quelli ottenuti in tutte le altre prove e sono verosimilmente da attribuire al loro minore contenuto di polisaccaridi.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

● Con il presente studio sono state evidenziate le performance fermentative del lievito *S. japonicus* che, a nostra conoscenza, fino ad oggi non risulta essere mai stato impiegato in prove di vinificazione.

● Una delle caratteristiche più interessanti del lievito UCD2489 *S. japonicus* è stata sicuramente la capacità di rilasciare sin dai primi giorni della fermentazione un'elevata quantità di polisaccaridi, confermando così in mosto naturale quanto già osservato in precedenti studi nei quali era stato utilizzato un substrato sintetico di fermentazione.

● Interessanti sono stati anche i risultati sulla stabilità proteica dei vini ottenuti con inoculo di *S. japonicus*. In questi vini, i valori di torbidità, dopo il test di stabilità, sono risultati inversamente correlati alla concentrazione di polisaccaridi.

● È inoltre da sottolineare che la valutazione informale dei vari vini ottenuti in questo studio non ha evidenziato particolari off-flavours.

Ulteriori studi sono comunque necessari per individuare il rapporto ottimale di inoculo *S. japonicus* / *S. cerevisiae* e il momento migliore per l'inoculo. I risultati ottenuti in questo studio hanno infatti evidenziato come questi ultimi aspetti possono influenzare notevolmente la composizione del vino in termini di polisaccaridi, acido acetico, metabolizzazione dell'acido malico e produzione di glicerolo.

## BIBLIOGRAFIA

- Benito S., Palomero F., Morata A., Calderón F., Suárez-Lepe J. A. (2012). New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 2101-2108.
- Benito S., Palomero F., Calderón F., Palmero D., Suárez-Lepe J. A. (2014). Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiol.*, 42, 218-24.
- Benito Á., Calderón F., Palomero F., Benito S., (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachanea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*, 20, 9510-9523.
- Boivin S., Feuillat M., Alexandre H., Charpentier C. (1998). Effect of must turbidity on cell wall porosity and macromolecule excretion of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49 (3), 325-332.
- Brown S. L., Stockdale V. J., Pettolino F., Pocock K. F., De Barros Lopes M., Williams P. J., Bacic A., Fincher G. B., Høj P. B., Waters E. J. (2007). Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1363-1376.
- Chaliel P., Angot B., Delteil D., Doco T., Gunata Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.*, 100, 22-30.
- Ciani M. (1995). Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *Journal App. Microb.*, 79, 631-634.
- Ciani M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.*, 10, 123-133.
- Ciani M., Morales P., Comitini F., Tronchini J., Canonico L., Curiel J.A., Oro L., Rodrigues A.J., Gonzalez R. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology*, 7, 642.
- Charpentier C., Feuillat M. (1993). Yeast autolysis. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (pp. 225-242). Chur, Switzerland; Harwood Academic Publishers.
- Charpentier C., Dos Santos A.M., Feuillat M. (2004). Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune". *Food Microb.*, 96 (3), 253-262.
- Domizio P., Liu Y., Bisson L.F., Barile D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microb.*, 43, 5-15.
- Domizio P., Liu Y., Bisson L.F., Barile D. (2017). Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: quantification and characterization. *Food Microb.*, 61, 136-149.
- Dupin I.V., McKinnon B.M., Ryan C., Boulay M., Markides A. J., Jones G.P., Williams P.J., Waters E.J. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J Agric Food Chem.*, 48, 3098-3105.
- Escot S., Feuillat M., Dulau L., Charpentier C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 7, 153-159.
- Fuster A., Escot S. (2002). Elevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysaccharides parietaux/polyphenols. *Rev. Des Oenol.*, 104, 20-22.
- Gawel R., Smith P., Waters E. (2016). Influence of polysaccharides on the taste and mouthfeel of white wine: Effect of polysaccharides on white wine mouthfeel. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 22, 350-357.
- Gerbaud V., Gabas N., Bloiun J., Pellerin P., Moutounet M. (1997). Influence of wine polysaccharides and polyphenols on the crystallisation of potassium hydrogen tartrate. *J. Inter. Sci. Vigne Vin* 31, 65-83.
- Gonzalez-Ramos D., Cebollero E., Gonzalez, R. (2008). A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 5533-5540.
- Gonzalez-Ramos D., Gonzalez R. (2006). Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (25), 9411-9416.
- Guadalupe Z., Ayestaran B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10720 e 10728.
- Llauberes R.M., Dubourdieu D., Villetaz J.C. (1987). Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 41, 277-280.
- Lubbers S., Charpentier C., Feuillat M., Voilley A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 13-22.
- Magyar I., Panyik I. (1989). Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 233-240.
- Manners D.J., Meyer M.T. (1977). The molecular structure of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr. Res.*, 57, 189-203.
- Moine-Ledoux V., Dubourdieu D. (1999). An inverse fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 537-543.
- Morata A., Gomez-Cordoves M.C., Colomo B., Suarez J.A. (2003). Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7402-7409.
- Norton S.K., Watson K., D'Amore T. (1995). Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 18-24.
- Poncet-Legrand C., Doco T., Williams P., Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58, 87-91.
- Portugal I., Ribeiro S.C., Xavier A.M., Centeno F., Strehaiano P. (2011). Immobilised yeast grape must deacidification in a recycle fixed bed reactor. *IJFST*, 46:284-289.
- Pozo-Bayon M.A., Andújar-Ortiz I., Moreno-Arribas M.V. (2009). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Res. Int.* 42, 754 e 761.
- Quijada-Morín N., Williams P., Rivas-Gonzalo J.C., Doco T., Escribano-Bailón M.T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem.*, 154, 44-51.
- Rankine, B.C. (1966). Decomposition of L-malic acid by wine yeasts. *J. Sci. Food Agric.*, 17, 312-316.
- Romani, C., Domizio, P., Lencioni, L., Gobbi, M., Comitini, F., Ciani, M., Mannazzu, I. (2010). Polysaccharides and glycerol production by non-*Saccharomyces* wine yeasts in mixed fermentation. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino* 31, 185-189.
- Rosi I., Gheri A., Ferrari S. (1998). Effets des levures produisant des polysaccharides parietaux sur certain caracteristiques des vins rouges pendant la fermentation. *Rev. Des Oenol.* 172, 24e26.
- Rosi I., Gheri A., Domizio P., Fia G. (2000). Production de macromolecules parietales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Rev. des Oenol.*, 94, 18-20.
- Riou V., Vernhet A., Doco T., Moutounet M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 16 (1), 17e23.
- Silva S., Ramón-Portugal F., Andrade P., Texera M., Strehaino P. (2003). Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 50-55.
- Taillandier P., Gilis M., Strehaiano, P. (1995). Deacidification by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*. *J Biotechnol.*, 40, 199.
- Vanrell G., Canals R., Esteruelas M., Fort F., Canals J.M., Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chem.* 104, 148e155.
- Vidal S., Francis L., Williams P., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E. J., (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.*, 85(4), 519-525.
- Waters E. J., Pellerin P., Brillouet J.-M. (1994). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23, 185-191.