

DOCUMENTO  
TECNICO

**Raffaele Guzzon**  
**Giorgio Nicolini**  
**Tiziana Nardin**  
**Roberto Larcher**  
**Mario Malacarne**

*Laboratorio Chimico  
 e Consulenza enologica  
 Centro trasferimento tecnologico  
 Fem-Iasma  
 San Michele all'Adige (TN)*



*Da sinistra:  
 R. Guzzon,  
 R. Larcher,  
 T. Nardin,  
 G. Nicolini,  
 M. Malacarne*

## QUALITÀ MICROBIOLOGICA E PRESTAZIONI ENOLOGICHE DI STARTER PER LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Vengono presentate le caratteristiche microbiologiche e le prestazioni fermentative di 29 ceppi di lieviti secchi attivi presenti sul mercato nazionale nella vendemmia 2009. Tutti hanno prodotto vinilfenoli e in molti casi significative dosi di anidride solforosa. Il carattere Pof(-) si conferma essere piuttosto raro tra i ceppi commercializzati.

### Introduzione

L'uso di lieviti selezionati per la gestione della fermentazione alcolica è una pratica consolidata che - grazie in particolare all'introduzione fin dagli anni '80 dei lieviti secchi attivi (LSA) - ha ormai soppiantato la fermentazione alcolica spontanea, condotta con lieviti indigeni. I motivi del grande successo dei LSA sono facilmente intuibili: i lieviti disidratati non richiedono onerose condizioni di mantenimento e

hanno dimostrato una buona durabilità nel tempo. Dal punto di vista enologico, i LSA - oltre ad essere di semplice utilizzo - riducono i rischi di arresti di fermentazione e più in generale consentono fermentazioni regolari e dai risultati prevedibili.

Oggi assistiamo ad una proliferazione di ceppi di LSA disponibili sul mercato e questa tendenza può disorientare il tecnico, in mancanza di studi mirati alla comparazione delle proprietà e prestazioni enologiche dei

diversi LSA. Inoltre, molte delle colture disponibili sono descritte e commercialmente promosse facendo riferimento alla zona geografica d'isolamento, suggerendo ai tecnici l'idea che sia possibile trasferire ai vini, i cui mosti fossero stati inoculati con tali colture, caratteristiche qualitative riconducibili dell'areale di origine. Questo approccio suscita dubbi perché non sempre le caratteristiche fisiologiche, ed in particolare la produzione di metaboliti secondari, sono facilmente

**Tab. 1 - Ceppi di lieviti secchi attivi utilizzati**

Ceppo	Produttore o distributore	Ceppo dichiarato
Agavin Flower	Garzanti	<i>S. cerevisiae</i> rf. <i>bayanus</i>
Anchor NT 50	Enologica Vason S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
Anchor VIN 13	Enologica Vason S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
Awri Fusion	AB Mauri	<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. cariocanus</i> (hybrid)
Challenge Selection ES 181	Esseco Group S.r.l	<i>S. cerevisiae</i> x <i>bayanus</i>
Elegance	AB Mauri	<i>S. cerevisiae</i>
EZ Ferm	Esseco Group S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
Fermol Arome Plus	AEB Group S.p.A	<i>S. cerevisiae</i>
Flavour 2000	Enologica Vason S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
FRSN6	Ferrari S.r.l	non descritto
FR-WP	Ferrari S.r.l	non descritto
IOC 18-2007	Paolo Araldo - I. O. C.	non descritto
La Claire CGC 62	Pall Filtration & Separations S.p.A	<i>S. cerevisiae</i>
La Claire SP 665	Pall Filtration & Separations S.p.A	<i>S. cerevisiae</i> rf. <i>bayanus</i>
La Claire W15	Pall Filtration & Separations S.p.A	<i>S. cerevisiae</i>
Lalvin R 2	Dal Cin Gildo S.p.A	<i>S. bayanus</i>
Lalvin RC 212	Dal Cin Gildo S.p.A	<i>S. cerevisiae</i>
Lalvin Rhone 2323	Lallemand inc.	<i>S. cerevisiae</i>
Montrachet Red Star	Essedielle	non descritto
Mycoferm Cru 31	EVER S.r.l.	non descritto
Mycoferm Cru 56	EVER S.r.l.	non descritto
Premium Chardonnay	Enologica Vason S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
Red Fruit Enartis	Esseco Group S.r.l	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i> C.K. S 102	Bio Springer	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm 43	Lallemand inc.	<i>S. bayanus</i>
<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm BC	Lallemand inc.	<i>S. cerevisiae</i> (ex. <i>bayanus</i> )
<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm CM	Lallemand inc.	non descritto
Vitilevure DV10	Esseco Group Srl	non descritto
Zymaflore VL3	Laffort	<i>S. cerevisiae</i>

monitorabili e, in ogni caso, il loro grado d'espressione dipende fortemente dal mosto in cui il LSA si trova a fermentare.

Partendo da questi presupposti, il lavoro presentato vuole descrivere in modo scientificamente rigoroso le principali caratteristiche enologiche di un consistente numero di LSA reperiti sul mercato italiano. I lotti di LSA considerati sono stati dapprima analizzati secondo le metodiche OIV per verificarne la carica cellulare e l'eventuale presenza di contaminanti microbici. Per ogni ceppo di LSA sono state valutate le caratteristiche fermentative (fase di latenza, velocità di fermentazione, resa in alcol) grazie a fermentazioni condotte in scala di laboratorio

su tre diversi mosti. Infine, i vini ottenuti sono stati analizzati per ricercare eventuali differenze compositive dovute ai diversi starter, in particolare si è focalizzata l'attenzione su parametri tecnologico-sensoriali significativi quali la produzione di anidride solforosa e di vinilfenoli.

## Il piano sperimentale

In Tab. 1 sono riportati i 29 LSA analizzati. Tutti i preparati sono stati prodotti per la vendemmia 2009 e reperiti nelle cantine sociali e cooperative associate a Cavit s.c. (Trento). Per la riattivazione, i LSA sono stati diluiti 1:10 con acqua peptonata (1 g/L Mycological Peptone,

Oxoid, Cambridge, UK), ed incubati a 37°C per 20 minuti, con ripetute agitazioni.

Le analisi microbiologiche ed i terreni microbiologici utilizzati sono descritti estesamente nel metodo OIV F-COEI-2-CONBAC 09. I lieviti, una volta pronti, sono stati opportunamente diluiti ed analizzati utilizzando 5 terreni microbiologici: YM (conta dei lieviti), MRS (conta dei batteri lattici), CAAR (conta dei batteri acetici), CZAPEK (conta delle muffe) e Agar Lisina (conta dei lieviti non *Saccharomyces*).

Le fermentazioni sono state condotte su tre differenti mosti: Nosiola (20.0 °Brix, pH 3.12, acidità totale 6.2 g/L, acido malico 5.6 g/L, APA 250 mg/L), Pinot grigio (23.1 °Brix, pH 3.30, acidità

**Tab. 2 - Presenza di specie microbiche contaminanti nei LSA testati**

Codifica	Lieviti non <i>Saccharomyces</i> (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Batteri acetici (ufc/g)
LSA1	2000	nr	nr
LSA3	nr	0	200
LSA8	nr	2000	280
LSA9	nr	nr	200
LSA12	nr	3000	nr
LSA13	nr	2000	nr
LSA14	nr	3000	nr
LSA16	nr	230000	nr
LSA17	nr	500000	nr
LSA18	2000	5000	200
LSA19	2000	nr	nr
LSA20	2000	14000	nr
LSA21	nr	nr	nr
LSA22	nr	nr	200
LSA23	nr	nr	250
LSA25	2000	62000	300
LSA26	nr	58000	nr
LSA27	nr	23000	200
LSA28	nr	2000	nr
LSA29	nr	nr	200

totale 4.6 g/L, acido malico 4.5 g/L, APA 366 mg/L) e Manzoni bianco (21.4 °Brix, pH 3.16, acidità totale 3.9 g/L, acido malico 3.6 g/L, APA 276 mg/L). I mosti, dopo pastorizzazione, sono stati integrati con nutrienti azotati e tiamina (200 mg/L, Acti-biol, Pall Filtration & Separations), 10 mg/L di acido p-cumarico e 10 mg/L di acido ferulico (Sigma-Aldrich, USA).

La dose di inoculo per tutti i LSA è stata di 200 mg/L; le fermentazioni, condotte in beuta da 1 L a 22°C, sono state seguite monitorando il calo peso del mosto in fermentazione dovuto alla produzione di anidride carbonica.

Le analisi chimiche dei vini sono state svolte utilizzando Winescan (FOSS A/S Denmark), mentre la quantificazione dei vinilfenoli è avvenuta per HPLC-ECD secondo quanto proposto da Larcher et al. (2007).

## Concentrazione dei preparati di LSA

La concentrazione cellulare dei LSA, espressa come numero di cellule per grammo di preparato secco, è indubbiamente il primo parametro che deve essere monitorato. La tecnologica e i processi di produzione di queste culture sono oggi molto evoluti, pertanto è opportuno attendersi che tutti i preparati di qualità abbiano concentrazioni di cellule vive di lievito elevate. A riguardo, l'OIV prescrive una concentrazione minima non inferiore ai dieci miliardi di cellule per grammo (OIV Codex Œnologique International, ed. 2009).

Tutti i lieviti testati hanno superato questo valore soglia, sebbene vi siano differenze, anche molto significative, tra i diversi campioni (Fig. 1). Se la concentrazione media nei campioni testati si attesta sui 29 miliardi di cellule di lievito per grammo, è interessante osservare come il 50 % dei campioni superi di 3 volte la concentrazione minima prevista dall'OIV, segno che le tecnologie produttive sono ormai in grado di ridurre al minimo il danno dovuto alla disidratazione delle cellule, e quindi la mortalità cellulare.

È comunque opportuno sottolineare come la concentrazione cellulare sia un parametro importante ma non esaustivo. Tale valore può dipendere anche da caratteristiche intrinseche al ceppo di lievito e, in ogni caso, non sempre alte concentrazioni cellulari corrispondono poi ad elevata vigoria fermentativa.

## Purezza dei preparati

L'assenza, o la bassa concentrazione, di microrganismi contaminanti nei preparati di LSA è un indice della qualità del processo produttivo. L'OIV fissa dei valori soglia per i lieviti non *Saccharomyces* (< 0.01 % del totale), per i batteri lattici (10<sup>4</sup> UFC/g), per i batteri acetici (10<sup>3</sup> UFC/g) e per le

muffe (10<sup>3</sup> UFC/g). Tali valori sono stati rispettati nella maggior parte dei campioni presi in esame (Tab. 2). Circa un terzo dei campioni di LSA non presenta addirittura alcun contaminante quantificabile e nessun LSA ha dosi rilevabili di muffe. Le concentrazioni di batteri acetici (isolati nel 31 % dei campioni) e lieviti non *Saccharomyces* (nel 17 %) non destano preoccupazione.

Al contrario, è opportuno segnalare che, relativamente ai batteri lattici, questi erano quantificabili nel 41 % dei campioni ma, in particolare, ben 5 preparati (LSA 16, 17, 25, 26, 27) presentavano una concentrazione almeno 10 volte superiore al limite indicato dall'OIV.

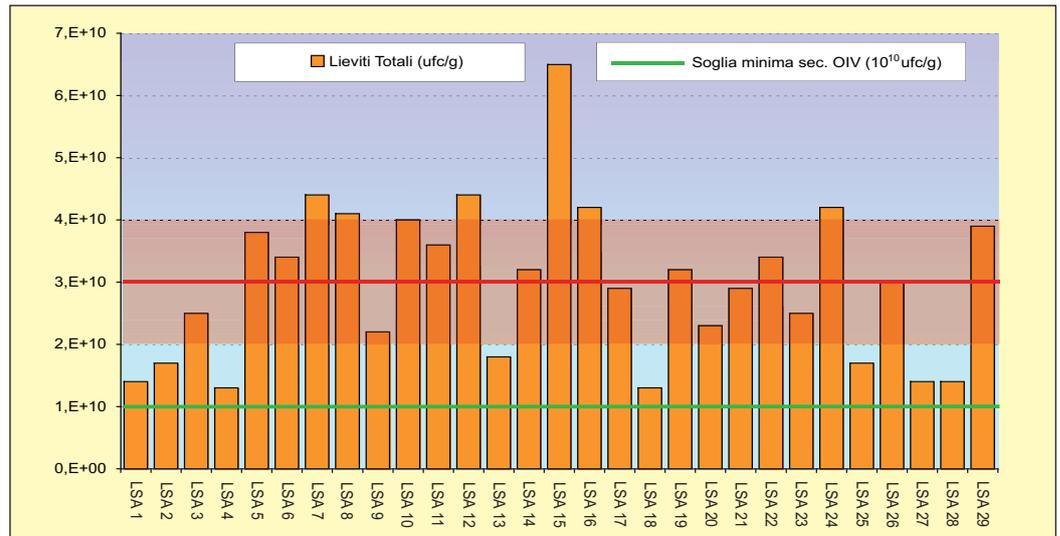
## Comportamento in fermentazione

Mentre la concentrazione cellulare è un parametro relativamente semplice da misurare, più complesso è determinare in modo oggettivo e riproducibile le caratteristiche cinetiche di un microrganismo perché queste sono fortemente influenzate dall'ambiente in cui esso si trova ad agire.

Numerosi tentativi sono stati fatti in passato proponendo vini sintetici o terreni microbiologici che riproducessero le caratteristiche e l'ambiente enologico (Osborne e Edwards, 2006; Manazzu et al., 2008) ma ad oggi nessuna delle soluzioni proposte è stata riconosciuta come metodo ufficiale di prova delle prestazioni enologiche di LSA.

Si è pertanto scelto di utilizzare tre distinti mosti naturali, con composizioni chimiche diverse tra loro, per verificare che i ceppi di LSA mantenessero le loro proprietà in ambienti fermentativi differenti e fossero, in buona sostanza, adattabili a diverse condizioni enologiche.

I dati relativi al consumo zuccherino a 2, a 7 ed a 14 giorni, espresso come % residua degli zuccheri iniziali, nei tre diversi mosti utilizza-

**Fig. 1 - Concentrazione di cellule totali di lieviti, determinate secondo il metodo OIV**

In tutti gli istogrammi è indicata anche la media generale e la relativa deviazione standard

ti, sono riportati in Fig. 2. Com'è noto, negli ultimi anni le concentrazioni zuccherine dei mosti sono andate mediamente incrementando per varie ragioni, sia di ordine climatico generale che di gestione viticolo-agronomica dei vigneti. Questa tendenza può causare qualche problema ai lieviti in termini di cinetiche di fermentazione e di produzione di metaboliti secondari sgraditi come l'acido acetico. I dati confermano in parte queste preoccupazioni. Se nel mosto di Nosiola, che aveva il più basso grado zuccherino, tutte le fermentazioni si sono svolte regolarmente, all'aumentare del grado zuccherino sono emerse differenze notevoli tra i LSA, sia nella prontezza d'avvio (% di zucchero consumata a 2 giorni) che nella conclusione delle fermentazioni. In particolare, sia in Pinot grigio che Manzoni bianco sono stati osservati alcuni arresti, con meno dell'85 % di zucchero consumato dopo 14 giorni. A questo proposito è utile rilevare come le concentrazioni zuccherine iniziali non fossero limitanti, non superando i 220 g/L di zucchero, e tutti i mosti avessero una dotazione azotata ben più che sufficiente. I risultati ottenuti sottolineano pertanto quanto la ricerca nel settore della selezione dei ceppi di lievito per fermentazioni

enologiche sia ancora utile per arrivare a garantire sempre un'elevata efficacia fermentativa.

## Produzione di anidride solforosa

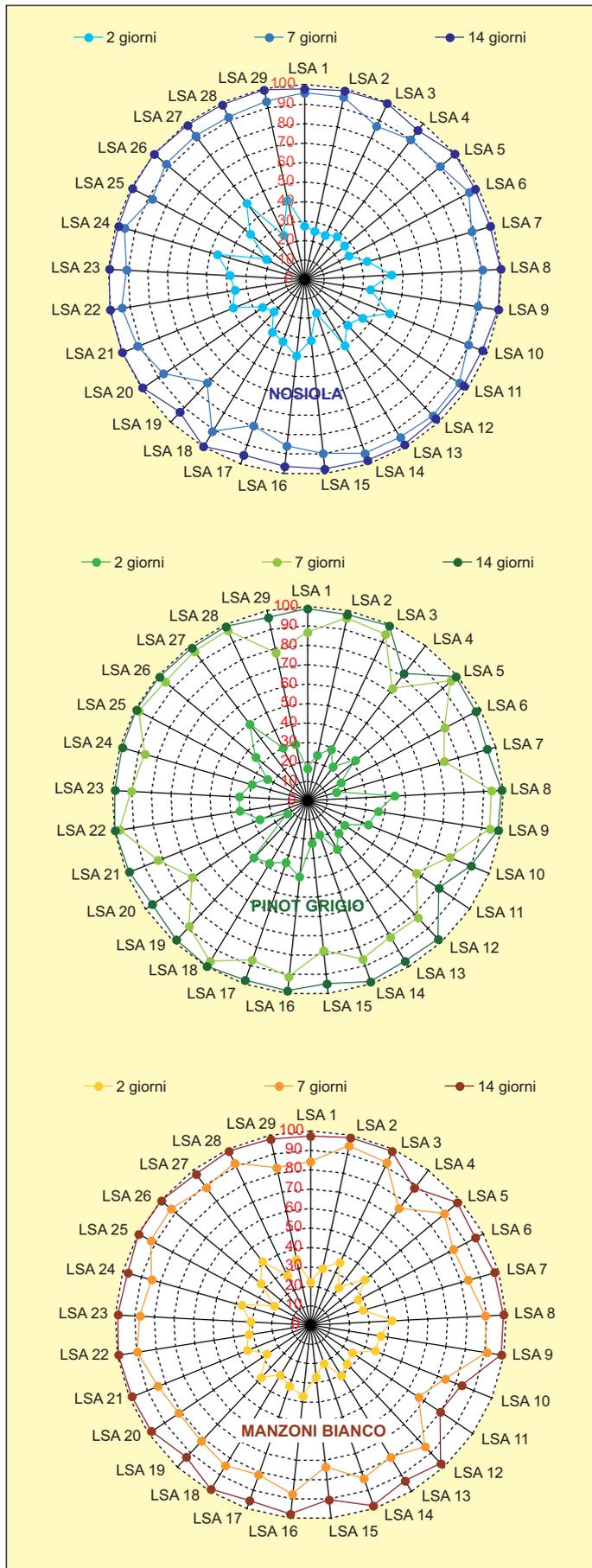
Se si escludono le prove in cui si sono osservati arresti di fermentazione (consumo di zucchero inferiore all'85 % al termine delle prove), non sono state osservate differenze tecnologicamente significative relative ai parametri analitici di base dei vini. L'unica eccezione degna di nota, anche per gli interessanti sviluppi nel prosieguo della vinificazione, riguarda la produzione di anidride solforosa totale. I mosti erano infatti privi di anidride solforosa, pertanto le elevate concentrazioni riscontrate alla fine delle fermentazioni sono da imputarsi totalmente all'attività dei lieviti inoculati. Come evidenziato in Fig. 3, gli accumuli di anidride solforosa variano in modo significativo da lievito a lievito. La produzione media di anidride solforosa si attesta sui 35 mg/L, ma il 24 % dei ceppi testati ha produzioni significativamente superiori alla media con l'accumulo di almeno 50 mg/L di anidride solforosa durante la fermentazione alcolica. Tale valore soglia è

importante perché, se sommato all'anidride solforosa aggiunta nel processo di vinificazione, può rappresentare un ostacolo allo svolgimento della fermentazione malolattica, anche utilizzando ceppi starter di batteri malolattici. Questi risultati trovano conferma in altri lavori scientifici che sottolineano l'importanza di un'accurata scelta della coppia lievito/batteri per garantire pronte ed efficaci fermentazioni enologiche (Arnink e Henick-Kling, 2005).

## L'acido malico e i vinilfenoli

**Acido malico.** Al termine della fermentazione alcolica mediamente il 25 % dell'acido malico inizialmente presente nei mosti è stato consumato, con punte anche del 30 % (Fig. 4). Le differenze tra i diversi ceppi sono molto limitate ed è interessante notare come i vini fermentati con ceppi di LSA che contenevano elevate concentrazioni di batteri lattici non abbiano avuto demalicazioni superiori alla media. Questo indica che i batteri lattici presenti nei LSA difficilmente riescono ad insediarsi efficacemente nei mosti e ad interferire con la fermentazione alcolica e con la qualità del vino, sempre che

**Fig. 2 - Consumo zuccherino espresso in % dello zucchero inizialmente presente nei mosti, valutato dopo 2, 7 e 14 giorni di fermentazione**



nelle fasi successive del processo di vinificazione si attuino tutte le procedure necessarie al loro controllo.

**I vinilfenoli.** I dati analitici relativi alla produzione di fenoli volatili sono riportati in Fig. 5. In queste prove si è voluto “stressare” il metabolismo dei lieviti aggiungendo ai mosti quantità di precursori ben superiori a quelle naturalmente presenti nei mosti. I mosti utilizzati sono stati pastorizzati, ed è pertanto da escludersi la presenza di lieviti contaminanti. Le elevate concentrazioni di vinilfenoli riportate in tabella sono quindi da imputarsi all’elevata presenza dei precursori e alle attività enzimatiche dei LSA testati.

Nelle condizioni sperimentali tutti i ceppi hanno prodotto 4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo. La limitata numerosità di replicazioni e le elevate differenze tra test condotti con lo stesso lievito su diversi mosti rendono difficile mettere in evidenza differenze statisticamente significative tra i ceppi. Tuttavia, sembra apparire una tendenza almeno nel differenziare i “poco produttori” (LSA 5 e 14) dai ceppi che, hanno prodotto fenoli volatili in quantità significativamente superiore alla media (LSA 2, 6, 11, 17, 23). Come peraltro atteso, la caratteristica Pof(+) di decarbossilazione degli acidi cinnamici a vinilfenoli è la più diffusa tra i ceppi commercialmente utilizzati per la produzione di LSA, anche se spesso questa informazione è omessa o non chiaramente ritracciabile sulle schede tecniche. Quella Pof(-) è invece minoritaria e non chiaramente identificabile dal presente piano sperimentale che pur includeva ceppi commercialmente dichiarati come Pof(-). A questo riguardo - anche alla luce di quanto da noi osservato nel corso della vendemmia precedente (Nicolini et al. 2009) - un’indagine sulla reale disponibilità commerciale e sulle prestazioni dei ceppi Pof(-) è forse opportuna.

## Considerazioni conclusive

Il lavoro qui presentato fornisce all’enoologo un utile contributo per una scelta sempre più ragionata e consapevole del formulato commerciale di LSA da utilizzare - in relazione ai vincoli e agli obiettivi prefissati - nel processo di vinificazione. Al fine di facilitare la divulgazione delle informazioni acquisite, i dati riportati - congiuntamente a più dettagliate specifiche sui ceppi - sono comunque disponibili anche sulla pagina web [http://www.ismaa.it/servizi\\_context.jsp?ID\\_LINK=111&area=6](http://www.ismaa.it/servizi_context.jsp?ID_LINK=111&area=6).

**Ringraziamenti.** Gli autori ringraziano Cavit s.c. per il supporto economico e la cortese disponibilità alla divulgazione dei dati, nonché i colleghi Agostino Cavazza, Giovanna Facchinelli e Marina Agostini per la gentile collaborazione.

## Riassunto

Vengono presentate le caratteristiche microbiologiche e le prestazioni fermentative di 29 ceppi di lieviti secchi attivi presenti sul mercato italiano nel 2009. I ceppi sono stati analizzati dal punto di vista microbiologico secondo i metodi OIV. Successivamente la loro attitudine fermentativa è stata testata fermentando in scala di laboratorio 3 diversi mosti precedentemente pastorizzati, privi di SO<sub>2</sub> ed addizionati di acido p-cumarico e di acido ferulico. Tutti i ceppi hanno prodotto 4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo, ed in molti casi anche notevoli dosi di anidride solforosa. Il carattere Pof(-) sembra essere piuttosto raro tra i ceppi di lievito commercializzati.

## Summary

Microbiological quality and fermentative behaviour of alcoholic fermentation starters. The microbiological characteristics and the fer-

mentation performances of 29 strains of dry selected yeasts available on the Italian market in 2009 are shown. The strains were analyzed following the OIV protocols, and then tested fermenting on laboratory scale 3 different musts previously pasteurized, without SO<sub>2</sub> and enriched with p-cumaric and ferulic acids. All strains produced 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol, and many of them produced also high quantities of SO<sub>2</sub>. Pof(-) character seems to be rather rare within the yeast strains available on the market.

## Bibliografia

Arnink K., Henick-Kling T. (2005). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56(3): 228-237.

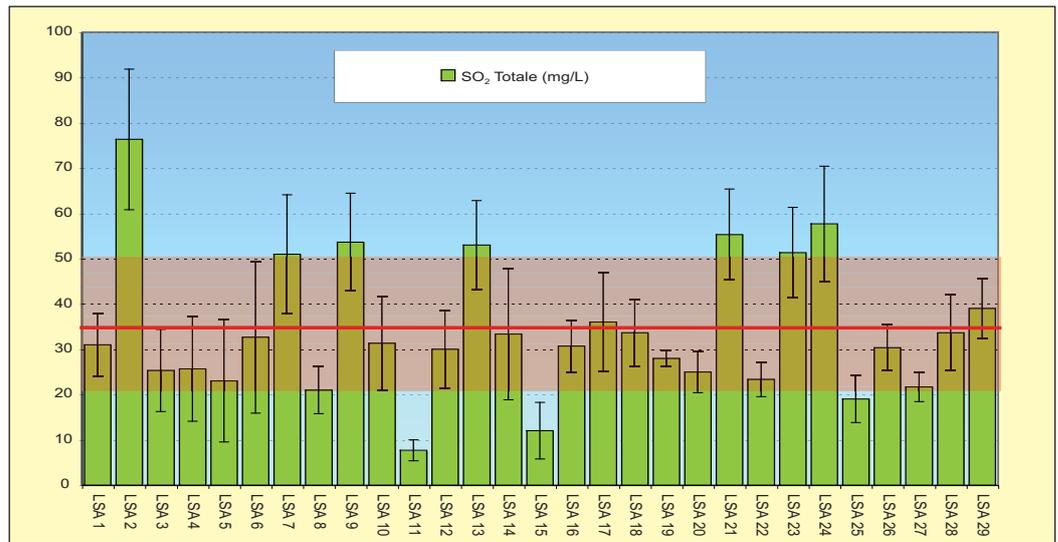
Larcher R., Nicolini G., Puecher Chr., Bertoldi D., Moser S., Favaro G. (2007) Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector. *Anal. Chim. Acta*, 582: 55-60.

Mannazzu I., Angelozzi D., Budroni M. et al. (2008) Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food. Mic.* 121(1): 84-91.

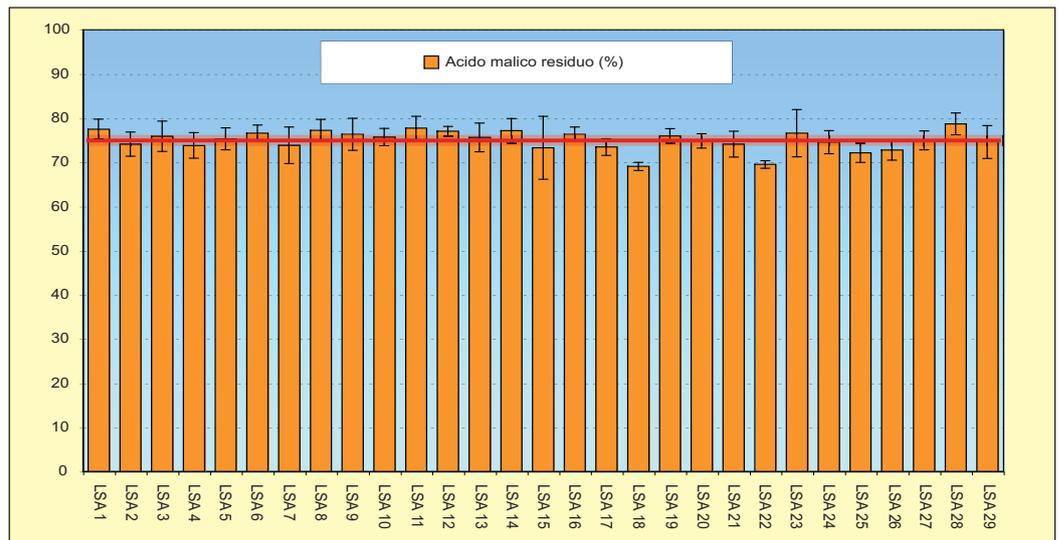
Nicolini G., Moser S., Larcher R., Innocenti M., Zanon N., Barchetti P. (2009). Variabilità indotta da lieviti commerciali nella composizione di vini bianchi sperimentali. *L'Enologo*, 45(9): 89-96.

Osborne JP., Edwards CG. (2006) Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low- and high-nitrogen conditions: a study in synthetic media. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 12(1): 69-78.

**Fig. 3 - Produzione di anidride solforosa totale al termine della fermentazione alcolica (media ± d.s.)**



**Fig. 4 - Percentuale di acido malico residuo nei vini al termine della fermentazione alcolica rispetto al contenuto iniziale nei mosti (media ± d.s.)**



**Fig. 5 - Produzione di vinilfenoli (mg/L; media ± d. s.) nei vini da mosti pastorizzati aggiunti di 10 mg/L di acido p-cumarico e di acido ferulico**

