



UNA NUOVA FRONTIERA PER L'ENOLOGIA: L'UTILIZZO DEI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN FERMENTAZIONE

Considerati dannosi o insignificanti comparse durante la fermentazione, recentemente i lieviti non-*Saccharomyces* sono oggetto di attenti studi per le loro peculiari caratteristiche metaboliche ed enzimatiche. Il loro utilizzo, in co-inoculo con *S. cerevisiae*, potrebbe rivoluzionare la visione classica della vinificazione al fine di risolvere determinati problemi tecnologici o ottenere vini con caratteristiche sensoriali particolari.



E. Garcia-Moruno

E. Vaudano

Di
Enrico Vaudano
Eleonora Bertolone
Maurizio Petrozziello
Emilia Garcia-Moruno

Consiglio per la Ricerca e
 Sperimentazione in Agricoltura (Centro
 di Ricerca per l'Enologia) - Asti

INTRODUZIONE

■ Fin dalla definitiva conferma della natura microbiologica della fermentazione alcolica ad opera di Pasteur nel 1866, è emerso chiaramente il ruolo predominante del genere *Saccharomyces* nella vinificazione. In particolare, alcune specie appartenenti a questo genere, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e poche altre sono le uniche in grado di completare la fermentazione del mosto d'uva,

esaurendo gli zuccheri residui, esibendo cioè un elevato potere fermentativo e producendo in misura accettabili composti secondari considerati dannosi per la qualità dei vini, primo fra tutti l'acido acetico. Fin dagli albori della microbiologia si è teso, di conseguenza, a considerare il mondo dei lieviti vinari come nettamente suddiviso in due parti.

Da una parte i "buoni fermentatori", poche specie appartenenti al genere *Saccharomyces*, di cui promuovere lo sviluppo nel mosto d'u-

va attraverso pratiche selettive quali l'utilizzo della SO_2 .

■ Queste pratiche sono atte ad eliminare o perlomeno controllare lo sviluppo dei lieviti "cattivi fermentatori", non appartenenti al genere *Saccharomyces* (non-*Saccharomyces*), con metabolismo più o meno fermentativo, generalmente incapaci di concludere la fermentazione e produttori di composti secondari a negativo impatto qualitativo.



■ Questo suddivisione ha portato l'industria delle fermentazioni alcoliche, sia essa birraria che enologica, a concentrarsi essenzialmente su *S. cerevisiae*, introducendo il concetto di fermentazione in purezza della birra da parte di C. Hansen, all'inizio del XX secolo, consistente nell'inoculo di un ceppo selezionato in mosto di malto sterilizzato. Successivamente, in ambito enologico, si è diffusa la pratica della fermentazione guidata, attraverso l'uso di ceppi selezionati inoculati in una matrice non sterile quale è il mosto d'uva.

In questo caso, la dose massiccia dell'inoculo garantisce la dominanza del ceppo selezionato sui lieviti selvaggi, *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* assicurando risultati affidabili e riproducibili.

■ L'introduzione negli anni '70 del XX secolo dei lieviti selezionati sotto forma secca attiva ha ulteriormente diffuso questa pratica.

Ad oggi si contano circa 200 ceppi di *S. cerevisiae* commerciali indicati per vari scopi e vinificazioni. Una diffusione a ben vedere giustificata: come ben sanno gli enologi le fermentazioni guidate, rispetto a quelle spontanee, permettono di ottenere una serie di vantaggi quali il rapido inizio del processo fermentativo, il completo esaurimento degli zuccheri residui, un migliore rendimento in etanolo rispetto ai lieviti selvaggi, la riduzione della durata della fermentazione, la riduzione dell'acidità volatile a causa dell'eliminazione dei lieviti apiculati, e l'ottenimento risultati tecnologici peculiari a seconda del ceppo utilizzato, come, ad esempio, l'uso di ceppi di *S. cerevisiae* specifici per la fermentazione di uve Sauvignon Blanc.

■ Ma il microcosmo di una vinificazione è più complesso. Nel mosto-vino sono presenti diverse specie che, trasportate dal vigneto in quantità significative o già presenti in cantina, si alternano o si sovrappongono durante la fermentazione. Le specie più facilmente ritrovabili nell'ambiente vigna-cantina sono circa una ventina, anche se non tutte contribuiscono in modo significativo in una fermentazione. (Tab.1).

■ Dal punto di vista ecologico studi condotti da anni sono in accordo a tracciare il seguente quadro microbiologico: nell'uva sono presenti un certo numero di specie ossidative e fermentative; una serie di studi su vigneti europei e americani hanno rilevato la presenza di poche specie presenti in misura superiore al 5%. ■ Esiste sempre una grande prevalenza di lie-

Tab.1 - Le specie di lievito più frequentemente riscontrabili nell'ambiente vigna-cantina

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida vini</i>
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Candida stellata</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Dekkera anomala</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>

viti apiculati *Hanseniaspora* che rappresentano più della metà della popolazione, seguiti dai generi *Candida*, *Metschnikowia* e *Pichia*. Il genere *Saccharomyces* è di solito raro sulla bacca e si ritrova invece in modo prevalente sulle superfici, vasche e attrezzature di cantina.

Una volta pigiata l'uva i lieviti ossidativi non possono svilupparsi se non in misura minima, mentre i lieviti con attività fermentativa crescono velocemente durante la fermentazione anche se in modo differente a seconda della specie.

Il massimo di crescita viene infatti raggiunto in momenti diversi della fermentazione in funzione di alcuni fattori quali temperatura, concentrazione di SO₂ e soprattutto la resistenza all'etanolo che viene progressivamente accumulato. In queste condizioni, gradualmente *S. cerevisiae* diventa predominante in quanto maggiormente resistente all'etanolo ed alla SO₂, e conclude, di solito, la fermentazione.

■ A titolo esplicativo, la Fig. 1 mostra alcuni isolamenti effettuati in diversi momenti della fermentazione di un vino rosso.

È chiaramente visibile la predominanza delle specie non-*Saccharomyces* nei primi due campionamenti, in particolare dei generi *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* e *Metschnikowia*. In queste prime fasi fermentative *S. cerevisiae* non è riscontrabile.

Da metà fermentazione il quadro cambia radicalmente ed i campionamenti mostrano la totale dominanza di diversi ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae*.

I LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN VINIFICAZIONE

■ Nonostante il loro basso potere alcoligeno, la scarsa resistenza alla solforosa e la produzione in eccesso di composti secondari, negli ultimi anni l'interesse si sta concentrando anche sulle specie non-*Saccharomyces* e sul loro possibile uso durante la fermentazione alcolica.

■ Queste specie, considerate come fonte di problemi microbiologici o al massimo insignificanti comparse durante la fermentazione, sono, attualmente, oggetto di riconsiderazione e di studi approfonditi. La ragioni di questo interesse sono dovute alle critiche che sempre più spesso sono mosse alle fermentazioni guidate attraverso massicci inoculi iniziali di starter di *S. cerevisiae*, riguardanti il rischio di condurre ad un appiattimento delle caratteristiche sensoriali dei prodotti finiti, soprattutto per quanto riguarda l'aspetto sensoriale olfattivo. Una fermentazione spontanea, permettendo lo sviluppo e la successione di diverse specie donerebbe una maggiore complessità e distinzione stilistica al vino che sarebbe l'espressione più completa delle caratteristiche pedo-climatiche di una determinata zona.

■ La base teorica di queste affermazione era già stata intuuta da Pasteur che riportava in *Études Sur Le Vin* (1866) "...esistono un gran numero di fermenti distinti che provocano tra-



sformazioni variabili secondo la loro natura e il loro organismo" affermando cioè che diverse specie di lievito possono determinare variazioni qualitative e quantitative delle componenti sensorialmente influenti nel vino, grazie alla loro biodiversità metabolica.

■ I lieviti sono infatti piccole centrali metaboliche in grado di generare composti primari o secondari ad impatto sensoriale interagendo e trasformando i composti presenti nell'uva. Si possono riassumere le interazioni dei lieviti con il mosto d'uva in due grandi categorie: da una parte i microorganismi sono in grado di trasformare i componenti principali quali zuccheri, acidi, aminoacidi generando tutta una serie di composti quali etanolo, acidi fissi e volatili, aldeidi, chetoni, esteri, alcoli superiori che caratterizzano lo scheletro organolettico del vino; dall'altra essi sono in grado di interagire con componenti presenti nell'uva in misura minoritaria e trasformarli in composti a

forte impatto sensoriale e che determinano il carattere peculiare di determinati vini.

■ È il caso ad esempio della trasformazione dei precursori tiolici delle uve Sauvignon o della liberazione dei composti terpenici dai precursori glicosilati in varietà aromatiche quali moscati o malvasie. E' anche il caso, stavolta in senso negativo, della capacità di alcune specie del genere *Brettanomyces* di formare, da precursori fenolici, composti come gli etilfenoli, molecole ad impatto sensoriale sgradevole.

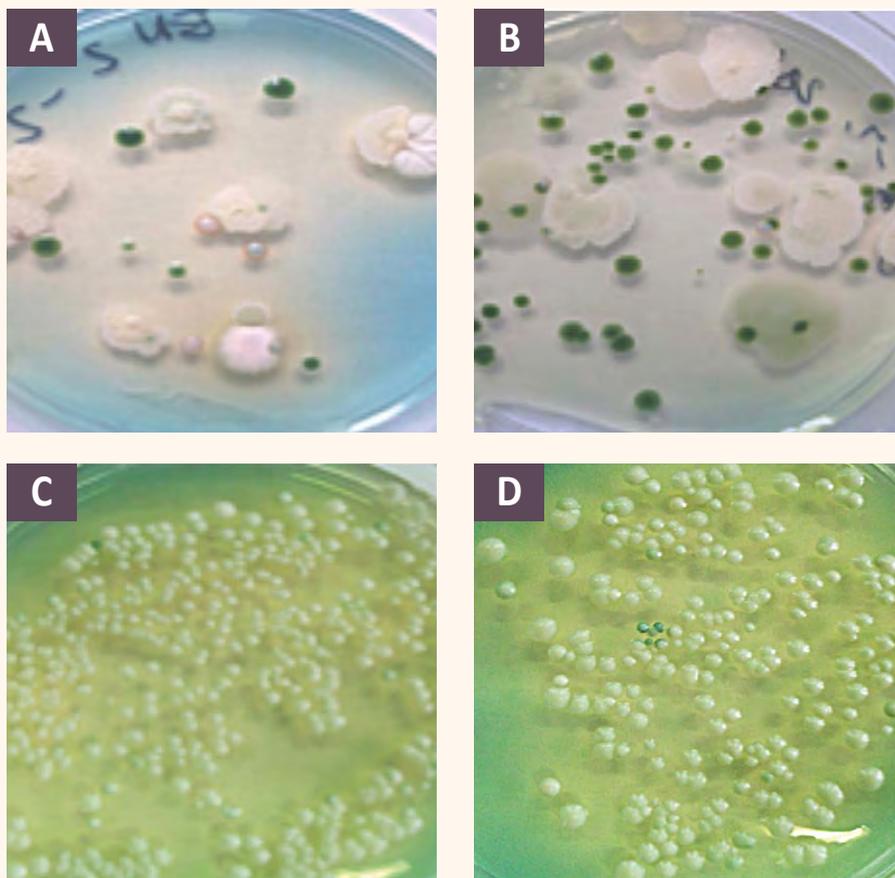
Questa capacità "trasformativa" varia a seconda della specie di lievito e può essere dovuta a diversità metaboliche, derivanti dal metabolismo primario e secondario del microorganismo, oppure alla presenza di "abilità" enzimatiche specifiche.

■ Di solito le diversità metaboliche sono di tipo quantitativo e non qualitativo: il tipo ed il numero di composti prodotti non varia rispetto a quanto prodotto da *S. cerevisiae* mentre la

differenza si riscontra nella quantità dei metaboliti prodotti. Variazioni quantitative possono esserci su composti a grande impatto organolettico quali: glicerolo, acetaldeide, acido acetico, esteri, alcoli superiori ed altri ancora. Le capacità enzimatiche sono rivolte alla trasformazione di determinati composti derivati dall'uva. In questo caso, a volte, i lieviti non-*Saccharomyces* vantano peculiarità nelle attività enzimatiche estremamente interessanti e non possedute o possedute in minima parte da *S. cerevisiae*.

■ Esempi delle attività enzimatiche più studiate e gli effetti dal punto di vista enologico sono: le β -glucosidasi -formazione di aromi terpenici, Pectinasi -aumento dell'estrazione e riduzione dei tempi di chiarifica, β -xilosidasi -rilascio aromi e degradazione xilani, Proteasi - riduzione delle precipitazioni proteiche, C-S liasi - produzione di aromi tiolici o ancora ossigenasi specifiche per la produzione di norisoprenoidi dal β -carotene.

Fig. 1 - Biodiversità dei lieviti vinari in una fermentazione: A: inizio fermentazione; B: 30% di zuccheri fermentati; C: 50% zuccheri fermentati; D: fine fermentazione



LE FERMENTAZIONI MULTISTARTER

■ I timori generati dall'utilizzo degli starter selezionati di *S. cerevisiae* potrebbero essere semplicemente superati attraverso la pratica della fermentazione spontanea.

Questa pratica è, tuttavia, un processo incontrollato, variabile, in cui è impossibile assegnare ad ogni specie la determinazione di certe caratteristiche. Essa inoltre, presenta un alto grado di rischio in vendemmie particolarmente ricche in contenuto zuccherino; i soli ceppi selvaggi *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*, potrebbero non riuscire ad esaurire tutti gli zuccheri portando a fermentazioni stentate o ad arresti fermentativi.

■ D'altra parte in annate sfavorevoli caratterizzate da uve in non perfetto stato sanitario, lasciare fermentare il mosto spontaneamente è altamente sconsigliato, per il rischio di proliferazione dei batteri acetici e di altri microorganismi nefasti.

■ Negli ultimi anni i ricercatori stanno suggerendo una sorta di compromesso, proponendo l'inoculo contemporaneo o sequenziale di starter formati da più specie. In queste fermentazioni una o più specie non-*Saccharomyces*, preventivamente selezionate, permettono di ottenere determinati obiettivi



sensoriali o tecnologici, mentre *S.cerevisiae* assicura un'adeguata conclusione della fermentazione.

■ Per ora solo in pochi casi si è giunti ad applicazioni commerciali di starter multipli e con risultati contraddittori. Tuttavia, in laboratorio, da parecchi anni i ricercatori stanno saggiando diverse specie e diversi tipi di co-inoculi e nella letteratura scientifica sono ormai presenti centinaia di articoli sull'argomento.

Alcuni esempi di associazioni di specie saggiate in fermentazione sono riportati in Tab. 2.

L'ESPERIENZA DEL CRA-CENTRO DI RICERCA PER L'ENOLOGIA (CRA-ENO)

■ Recentemente presso il centro di Asti sono state condotte ricerche riguardanti il possibile uso di una specie non-*Saccharomyces* rison-

trabile raramente nel mosto d'uva e presente, più spesso, nella panificazione, in particolare nella pasta madre acida. Questa, conosciuta come *Saccharomyces exiguus* e recentemente riclassificata come *Kazachstania exigua* (Kurtzman, 2003), è ritrovabile anche in altri ambienti quali le fermentazioni del Mezcal e del Kefir (Sugihara et al., 1970; Pulvirenti et al., 2004; Vardjan et al., 2013; Verdugo et al., 2011). Si tratta di un lavoro preliminare, esplorativo, ancora lontano da applicazioni in cantina, che, tuttavia, può dare alcune indicazioni interessanti.

■ Lo studio è stato articolato in tre fasi:

1) cinque ceppi di *K.exigua* appartenenti alla collezione del CRA-ENO sono stati sottoposti ad una serie di saggi enzimatici e tecnologici e confrontati con due ceppi di *S.cerevisiae*, uno commerciale (Lallemand Vitilevure DV10) e uno di laboratorio. I saggi effettuati hanno riguardato la produzione di tossine killer, l'attività proteolitica, l'attività β-glucosidasi, la

produzione di idrogeno solforato (H₂S), la tolleranza alla SO₂ libera e ad alte concentrazioni di zucchero;

2) I ceppi sono stati saggiati singolarmente in fermentazione per valutare il potere e il vigore fermentativo utilizzando un mosto d'uva bianca pastorizzato avente le seguenti caratteristiche: 240 g/L di zucchero, 235 mg/L di APA (azoto prontamente assimilabile), pH 3.45 a acidità totale pari a 5.1 g/L. Ogni condizione di fermentazione è stata allestita in triplo. La temperatura di fermentazione è stata di 20°C.

3) il ceppo di *K.exigua*, risultato più interessante nei saggi precedenti è stato utilizzato in prove di fermentazione multistarter usando due modalità di inoculo: nella prima il ceppo di *K.exigua* e un ceppo commerciale di *S.cerevisiae* sono stati inoculati simultaneamente all'inizio della fermentazione in concentrazioni uguali pari a 1x10⁶ cell/ml; nella seconda modalità è stato inizialmente inoculato il ceppo di *K.exigua* e successivamente, al raggiungimento di 5% v/v di etanolo, è stato aggiunto il ceppo commerciale di *S.cerevisiae*. Come controllo sono state allestite fermentazioni con *K.exigua* e *S.cerevisiae* inoculati singolarmente. Il mosto d'uva bianca pastorizzato utilizzato aveva le seguenti caratteristiche: 215 g/L di zucchero, 190 mg/L di APA, pH 3.45 e acidità totale pari a 5.1 g/L. Le fermentazioni sono state monitorate attraverso l'emissione di CO₂, da cui è stata calcolata la percentuale di etanolo prodotto v/v. Ogni condizione di fermentazione è stata allestita in triplo. La temperatura di fermentazione è stata mantenuta a 20°C.

■ I vini ottenuti sono stati analizzati nei parametri principali: etanolo, zuccheri residui, acidità volatile e glicerolo utilizzando i metodi ufficiali (EUR-Lex, 1990). Le analisi di gas-cromatografia con spettrometria di massa sono state eseguite secondo il metodo descritto da Ortega et al., (2001).

Tab. 2 - Alcuni esempi di associazioni di specie proposte in fermentazione (da Ciani et al., 2009)

Specie co-inoculate	Obiettivi tecnologici
<i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Diminuzione dell'acidità volatile
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Degradazione dell'acido malico in fermentazione
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Diminuzione dell'acido acetico • Incremento di acido lattico • Incremento di terpenoidi
<i>Kloeckera. apiculata</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Modulazione della componente volatile aromatica • Diminuzione acidità volatile
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Carattere fruttosifilo (Consumo complementare di glucosio fruttosio con <i>S.cerevisiae</i>)
<i>Candida stellata</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Consumo del fruttosio • Incremento del glicerolo • Modulazione della componente aromatica
<i>Debaryomyces vanriji</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Modulazione della componente aromatica (Aumento geraniolo)
<i>Pichia kluyveri</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	• Incremento degli aromi tiolici

RISULTATI

■ I risultati dei test tecnologici ed enzimatici sono riportati in Tab. 3. *K.exigua* mostra interessanti caratteristiche utilizzabili nella fermentazione alcolica: una resistenza alla SO₂ paragonabile a quella di *S.cerevisiae*, una buona tolleranza alla pressione osmotica generata dall'alta concentrazione di zuccheri nel mezzo. La presenza di attività killer è presen-



Tab. 3 - Caratteristiche enzimatiche e tecnologiche dei ceppi studiati

Ceppo	Attività killer	Attività proteolitica	Attività β -glucosidasi	Produzione di H ₂ S	Tolleranza alla SO ₂ (mg/L libera)	Tolleranza osmotica (%w/v saccarosio)
ISE 2 (S.c)*	-	-	+	++	75	50
DV 10 (S.c)	+	-	+	+	75	50
ISE 1451 (K.e)	-	-	-	+++	50	30
ISE 1492 (K.e)	-	++	-	+++	50	30
ISE 1493 (K.e)	-	+	-	+++	50	30
ISE 1494 (K.e)	+	w	-	+++	75	30
ISE 1495 (K.e)	+	+	-	+++	75	30

* S.c: *Saccharomyces cerevisiae*, K.e: *Kazachstania exigua*

te in alcuni ceppi testati così come l'attività proteolitica. Non è stata riscontrata attività β -glucosidasi mentre è presente la produzione di idrogeno solforato.

■ Le fermentazioni con inoculo singolo (Tab. 4) mostrano un potere fermentativo variabile a seconda del ceppo, compreso tra 7.99 e 10.70 % v/v. Molto interessante risulta la produzione di glicerolo che, in alcuni ceppi di *K.exigua*, raggiunge valori superiori di circa il doppio rispetto ai ceppi di *S.cerevisiae* utilizzati come riferimento. Contemporaneamente, tuttavia, a causa della relazione metabolica esistente tra le due molecole, si assiste ad una maggiore produzione di acido acetico rispetto a *S.cerevisiae*. Questa caratteristica, insieme al potere fermentativo inferiore rispetto a

S.cerevisiae, impedisce l'utilizzo di *K.exigua* come inoculo singolo mentre, per assicurare l'esaurimento degli zuccheri e una accettabile produzione di acido acetico, è possibile tentare un approccio multistarter, affiancando al ceppo di *K.exigua*, un ceppo di *S.cerevisiae*.

LA FERMENTAZIONE CON CO-INOCULO

■ Le prove di fermentazione multistarter sono state condotte con coinoculo iniziale (MIX) dei due ceppi *S.cerevisiae* / *K.exigua* o con l'approccio sequenziale (SEQ) come precedentemente descritto. Il ceppo di *K.exigua* utilizzato (ISE 1451) è stato scelto per la supe-

riore produzione di glicerolo. Il ceppo di *S.cerevisiae* commerciale usato è stato il Vitilevure DV10 (Lallemand).

■ Le fermentazioni di controllo, con inoculo singolo, (SC: *S.cerevisiae* KE: *K.exigua*) monitorate attraverso l'emissione di CO₂, confermano i dati ottenuti dalle fermentazioni con inoculo singolo (Fig. 2): *S.cerevisiae* completa velocemente la fermentazione mentre *K.exigua* risulta incapace di fermentare oltre 7.5% v/v di etanolo, producendo un arresto di fermentazione. In questo caso il livello di etanolo raggiunto risulta minore di quello ottenuto dalla fermentazione con inoculo singolo della seconda fase dello studio (Tab. 4), probabilmente a causa del diverso contenuto in APA nei due mosti.

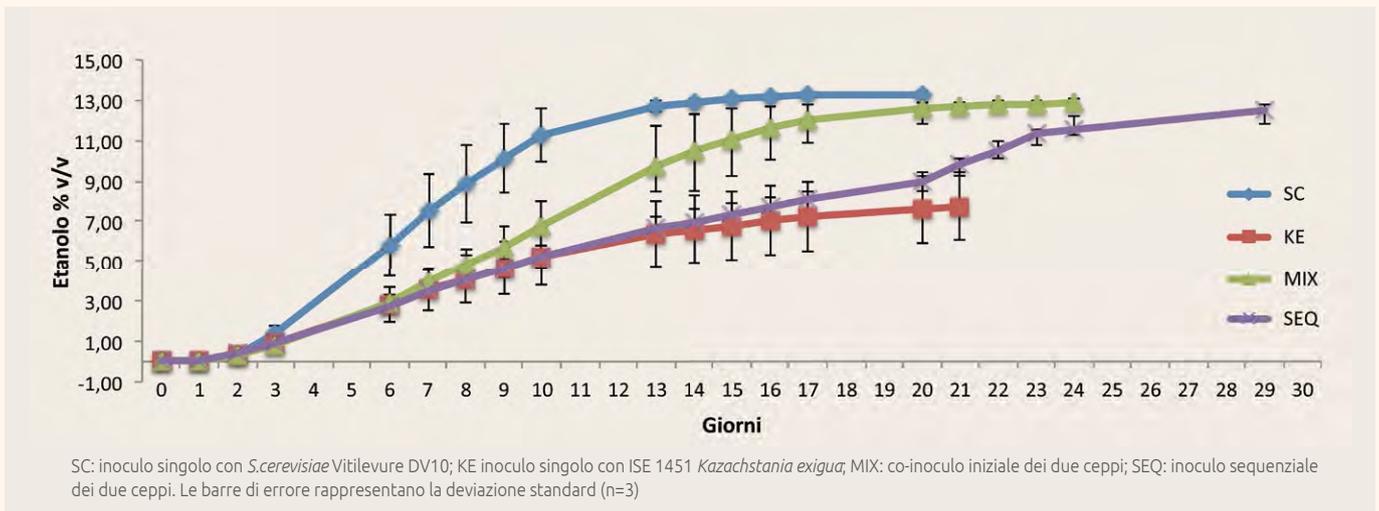
Tab. 4 - Principali parametri fermentative ottenuti dalle fermentazioni dei singoli ceppi con mosto d'uva bianca

Ceppo	Potere fermentativo (% vol.)	Vigore fermentativo (CO ₂ dopo 3 giorni)	Acidità volatile (g/L di acido acetico)	Glicerolo (g/L)	Zucchero residuo (g/L)	Cell/ml max (10 ⁶ cellule)
ISE 2 (S.c)*	14,25 ± 0,13	4,05 ± 0,05	0,40 ± 0,04	6,85 ± 0,39	3,0 ± 0,1	125,5 ± 11,1
DV 10 (S.c)	14,36 ± 0,13	4,42 ± 0,02	0,30 ± 0,04	7,21 ± 0,58	tracce	140,4 ± 11,1
ISE 1451 (K.e)	10,31 ± 0,36	2,41 ± 0,26	1,70 ± 0,05	14,87 ± 0,73	50,3 ± 5,1	90,3 ± 7,4
ISE 1492 (K.e)	7,99 ± 0,4	2,63 ± 0,11	0,53 ± 0,03	7,44 ± 0,55	81,6 ± 3,9	105,1 ± 6,3
ISE 1493 (K.e)	9,12 ± 0,23	2,65 ± 0,24	1,30 ± 0,03	10,9 ± 0,55	62,3 ± 3,5	84,1 ± 5,4
ISE 1494 (K.e)	10,70 ± 0,21	3,64 ± 0,34	1,47 ± 0,06	10,28 ± 0,34	50,5 ± 1,8	104,9 ± 7,1
ISE 1495 (K.e)	10,55 ± 0,42	3,23 ± 0,41	1,08 ± 0,06	12,08 ± 0,33	54,56 ± 2,2	95,1 ± 4,5

* S.c: *Saccharomyces cerevisiae*, K.e: *Kazachstania exigua*



Fig. 2 - Cinetica fermentative nei saggi con differenti modalità di inoculo, monitorata attraverso la formazione di etanolo calcolata per perdita di peso.



■ Nelle fermentazioni multistarter, la cinetica di fermentazione mostra differenze tra i due tipi di inoculo; la fermentazione con coinoculo iniziale risulta più rapida rispetto a quella sequenziale, concludendosi in circa 22 giorni rispetto ai 30 necessari per la fermentazione con inoculo sequenziale (Fig.2).

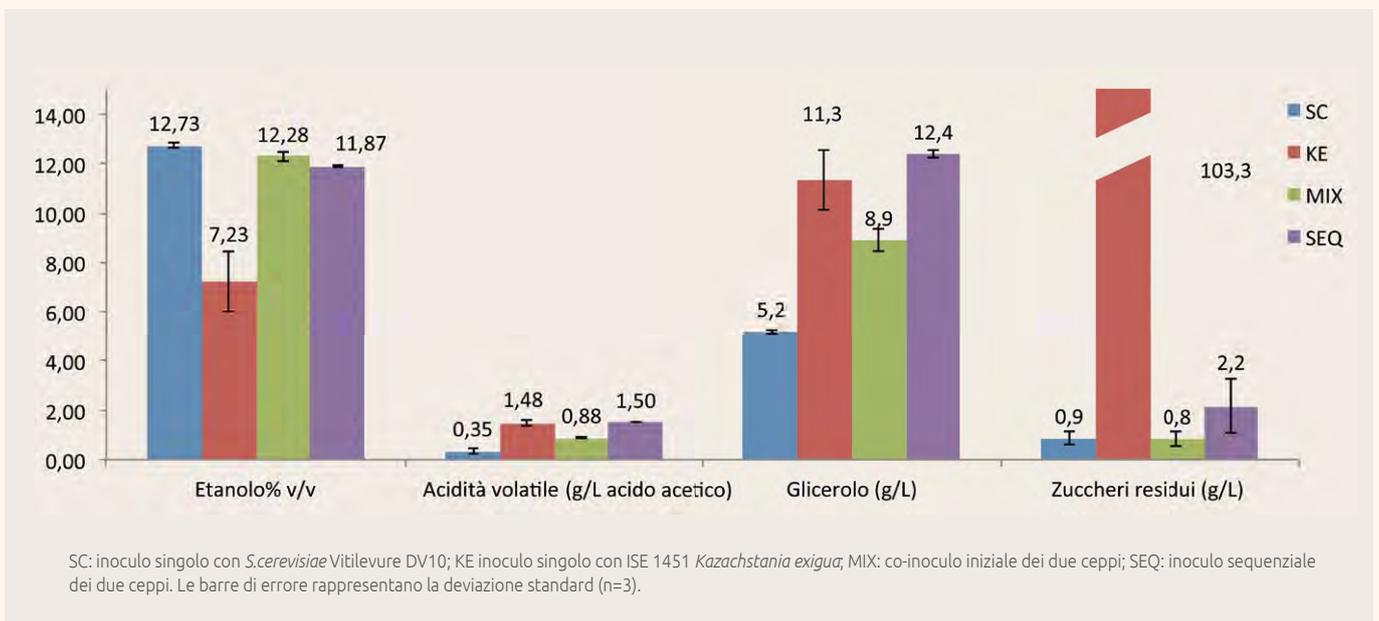
■ L'analisi dei vini ottenuti dalle due fermentazioni multistarter mostrano un buon esaurimento degli zuccheri, quasi completo nella

fermentazione MIX, con un valore simile alla fermentazione di *S.cerevisiae* in inoculo singolo e con un residuo di 2.2 g/L nella fermentazione sequenziale (Fig. 3). In queste due prove risulta molto interessante la produzione di glicerolo. Il peso di *K.exigua* nelle fermentazioni MIX e SEQ si fa sentire con una produzione di glicerolo pari al 70 e al 110% superiore rispetto alla prova con il solo *S.cerevisiae*. Si assiste, tuttavia, ad una maggiore produzione di acido

acetico, che risulta inaccettabile nel caso della prova SEQ.

■ Come conseguenza della maggiore produzione di glicerolo nelle due prove multistarter si osserva, a parità di zuccheri consumati, una interessante diminuzione della concentrazione di etanolo. Infatti, grazie ad una maggiore diversione del flusso glicolitico verso la produzione di glicerolo, i vini fermentati con il contributo di *K.exigua*, MIX e SEQ, presentano

Fig. 3 - Analisi dei vini ottenuti con diverse modalità di inoculo





valori di etanolo inferiori del 3.7% (0.45 gradi di etanolo su un vino di 12.80 circa di etanolo potenziale) e del 7.2% (0.86 gradi) rispetto ai vini ottenuti con il solo *S. cerevisiae*. Questi risultati potrebbero aprire interessanti prospettive microbiologiche per quanto riguarda la riduzione del tenore alcolico dei vini senza ricorrere a pratiche fisiche sottrattive, ma agendo direttamente durante la fermentazione alcolica.

■ L'analisi gas-cromatografica (Fig. 4) rivela profili aromatici differenti delle prove multistarter rispetto a quelli ottenuti con il singolo inoculo di *S. cerevisiae* e *K. exigua*. Le prove multistarter sono state caratterizzate da una più alta concentrazione di acetati (differenze statisticamente significative). In particolare la fermentazione MIX ha mostrato una maggiore quantità di isoamilacetato e 2-fenilettilacetato (dati non riportati), che sono particolarmente importanti dal punto di vista organolettico con note di banana e rosa. La maggiore produzione di acetati nelle prove multistarter, probabilmente riflette un effetto di interazione delle due specie come già rilevato per altre molecole aromatiche (Anfang et al., 2009).

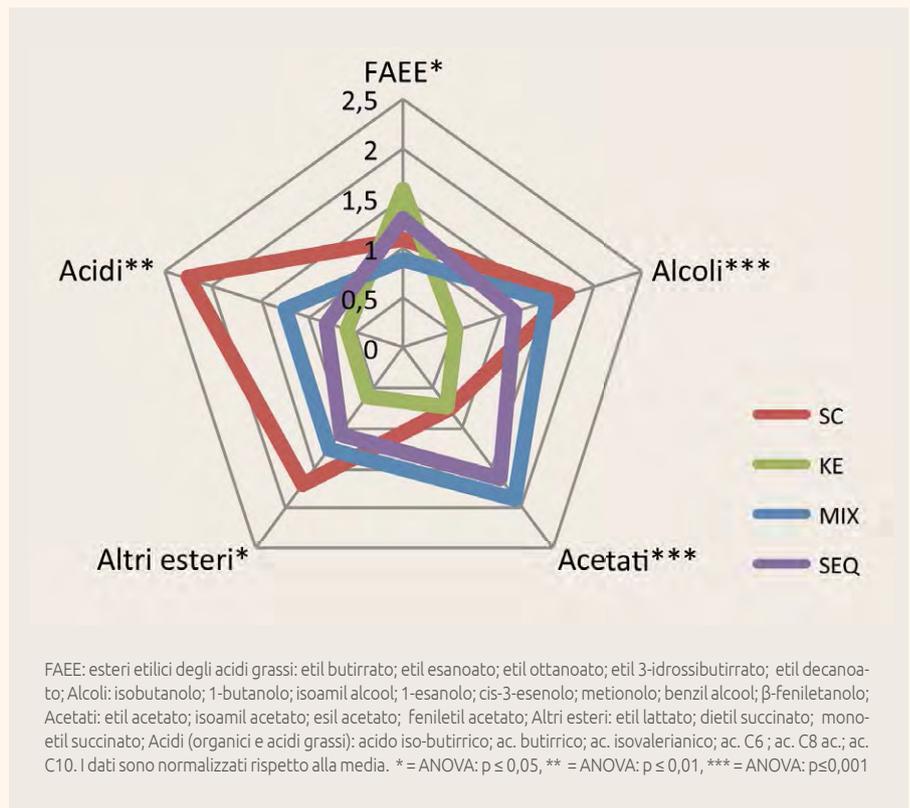
■ Per quanto riguarda gli altri gruppi di aromi, le prove multistarter sono caratterizzate da concentrazioni intermedie tra quelle osservate nelle fermentazioni in monocultura. Infine, è da notare la più alta concentrazione di esteri etilici degli acidi grassi prodotti dalla fermentazione con l'inoculo singolo KE.

CONCLUSIONI

■ Le prove presentate rappresentano una prima indagine sulla possibilità di utilizzo della specie *K. exigua* nella fermentazione alcolica. Anche se, al momento, i dati riportati limitano la possibilità di utilizzo in cantina a causa dell'eccessiva produzione di acido acetico, la specie merita ulteriori studi. Innanzitutto è necessario verificare la variabilità metabolica nell'ambito della specie, selezionando ceppi basso produttori di acido acetico e che mantengano, allo stesso tempo, le caratteristiche positive rilevate. Inoltre occorre saggiare differenti metodologie di inoculo al fine di rendere attuabile l'idea di una fermentazione multistarter con questa specie.

■ In conclusione, i non-*Saccharomyces*, nella loro naturale biodiversità metabolica ed enzimatica, possono contribuire ad aumentare la

Fig. 4 - Profilo aromatico dei principali gruppi di composti volatili nei vini ottenuti nella prova di fermentazione con diversi tipi di inoculo, analizzati con GC-MS



complessità sensoriale o in taluni specifici casi, permettono di raggiungere determinati scopi tecnologici. Il loro utilizzo "inconsapevole", inteso come attuazione di una fermentazione spontanea, è pratica comune in numerose cantine ma deve essere condizionato ad un rigoroso controllo e solo in determinate condizioni di perfetto stato igienico delle uve.

■ I tentativi di riprodurre la complessità generata da una fermentazione spontanea attraverso il co-inoculo di diverse specie sono per ora quasi una semplice curiosità ma potrebbero essere l'inizio di una vera e propria rivoluzione.

BIBLIOGRAFIA

■ 1. Anfang, N, Brajkovich M, Goddard MR. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15:1–8.
■ 2. 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 Research* 10: 123–133.

■ 3. EUR-Lex - 31990R2676 - EN. Official Journal L 272 , 03/10/1990 P.0001 – 0192
4. Kurtzman CP. (2003). Phylogenetic circumscription of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulasporea*. *FEMS Yeast Research* 4: 233-245.
■ 5. Ortega C, López R, Cacho J, Ferreira V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds: Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A* 923: 205–214.
■ 6. Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, Giudici P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology* 38: 113-117.
■ 7. Sugihara TF, Kline L, Miller MW. (1970). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action. *Applied Microbiology* 21: 456-458.
■ 8. Vardjan T, Mohar Lorbeg P, Rogelj I, Čanžek Majhenič A. (2013). Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science* 96: 2729-2736.
■ 9. Verdugo Valdez A, Segura García L, Kirchmayr M, Ramírez Rodríguez P, González Esquinca A, Coria R, Gschaedler Mathis A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcals fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100: 497–506. ■