



LAFFORT

l'œnologie par nature



INFO

NUMERO 71 - Marzo - Aprile 2010

I lieviti non-*Saccharomyces*: il caso della *Torulaspora delbrueckii*

La diversità e l'originalità dei vini del mondo è ascrivibile a numerosi fattori.

Tra questi i principali sono il terreno, il vitigno, le condizioni climatiche, le pratiche viticole, che devono essere valorizzati nel processo di trasformazione del succo d'uva in vino.

La vinificazione è un processo microbiologico assai complesso e la microflora che interviene contribuisce alla complessità dei vini.

Introduzione.

Nell'ambito di una fermentazione spontanea, a carico della flora indigena, durante la fase pre-fermentativa e all'inizio della fermentazione alcolica sono i lieviti non-*Saccharomyces* che predominano nel mosto, successivamente i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* colonizzano completamente l'ambiente per portare a termine la fermentazione.

Lo sviluppo di alcuni lieviti non-*Saccharomyces* durante le fermentazioni spontanee può pregiudicare la qualità del prodotto finito (*Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, ...), mentre altri lieviti non-*Saccharomyces* si dimostrano interessanti per l'intensità e la complessità aromatica dei vini. Il loro apporto varia non solo in funzione del genere e della specie ma anche del ceppo.

Possiamo affermare che la qualità del vino è espressione della sommatoria delle azioni dei diversi microrganismi che vi si sviluppano e si succedono dalla vendemmia fino alla degustazione. In questo processo è fondamentale favorire lo sviluppo delle specie favorevoli ed evitare lo sviluppo di quelle di alterazione.

Torulaspora delbrueckii è un lievito non-*Saccharomyces* naturalmente presente nel mosto e sull'uva che è stato descritto in letteratura come avente impatto positivo sulla qualità e la complessità dei vini, sulla pulizia della fermentazione con una produzione esigua di acidità volatile, acetaldeide, diacetile ed acetoino. Inoltre

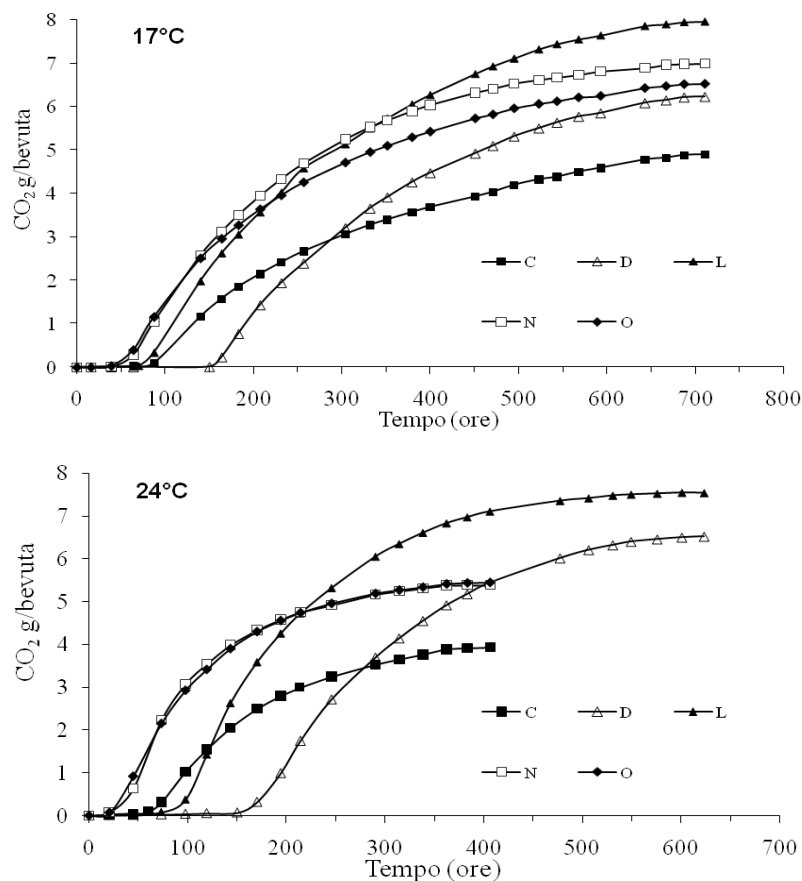
questo lievito viene anche descritto come criofilo e termotollerante.

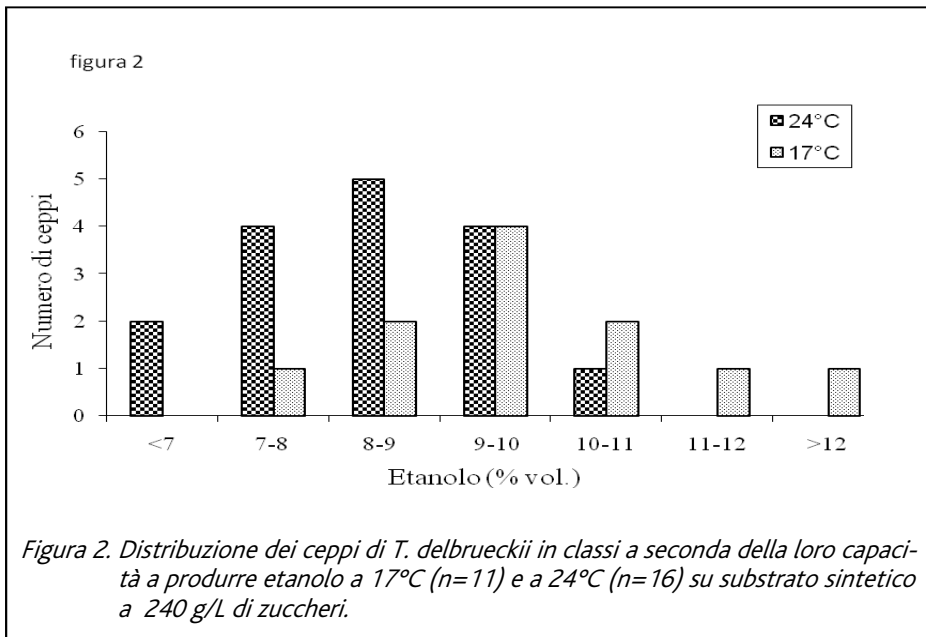
Approfondimento delle conoscenze generali sulla specie *T. delbrueckii*: variabilità intraspecifica.

Al fine di valutare il potenziale enologico della specie *Torulaspora delbrueckii*, è stato realizzato uno studio di caratterizzazione su una collezione di 30 ceppi, isolati nell'ambito di fermentazioni spontanee. Diverse prove sono state condotte su substrato sintetico simulante la composizione di un mosto bianco.

Se è vero che il rendimento medio in etanolo (rapporto zucchero/etanolo) calcolato a fine fermentazione alcolica, a parità di condizioni, è equivalente a quello di

Figura 1. Cinetiche di fermentazione di 5 ceppi di *T. delbrueckii* a 17 e 24°C su substrato sintetico a 240 g/L di zuccheri. Media di 3 ripetizioni.





Qualunque sia il tenore in zuccheri, si evidenziano differenze significative tra i diversi ceppi di *T. delbrueckii* sia nella produzione di AV che di glicerolo; ciò testimonia una grande variabilità intraspecifica per questi parametri. La produzione media di questi due composti è simile tra *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* nel substrato a bassa concentrazione di zuccheri, ma inferiore per *T. delbrueckii* nei substrati a 240 e 350 g/L di zuccheri (fig. 3). Inoltre sul substrato a 350 g/l di zuccheri la maggioranza dei ceppi di *T. delbrueckii* testati hanno una produzione di AV nettamente inferiore a quelle di *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae, è altrettanto vero che esiste una grande variabilità fenotipica tra i diversi ceppi di *T. delbrueckii* testati.

Anche le attitudini fermentative, valutate considerando durata della fase di latenza, durata della fermentazione e produzione di alcool, sono molto differenti tra i ceppi. Questi tre parametri sono molto importanti in prospettiva di una selezione industriale. La fase di latenza deve essere la più corta possibile per assicurare una buona partenza in un momento in cui vi è forte competizione da parte dei microrganismi del mosto.

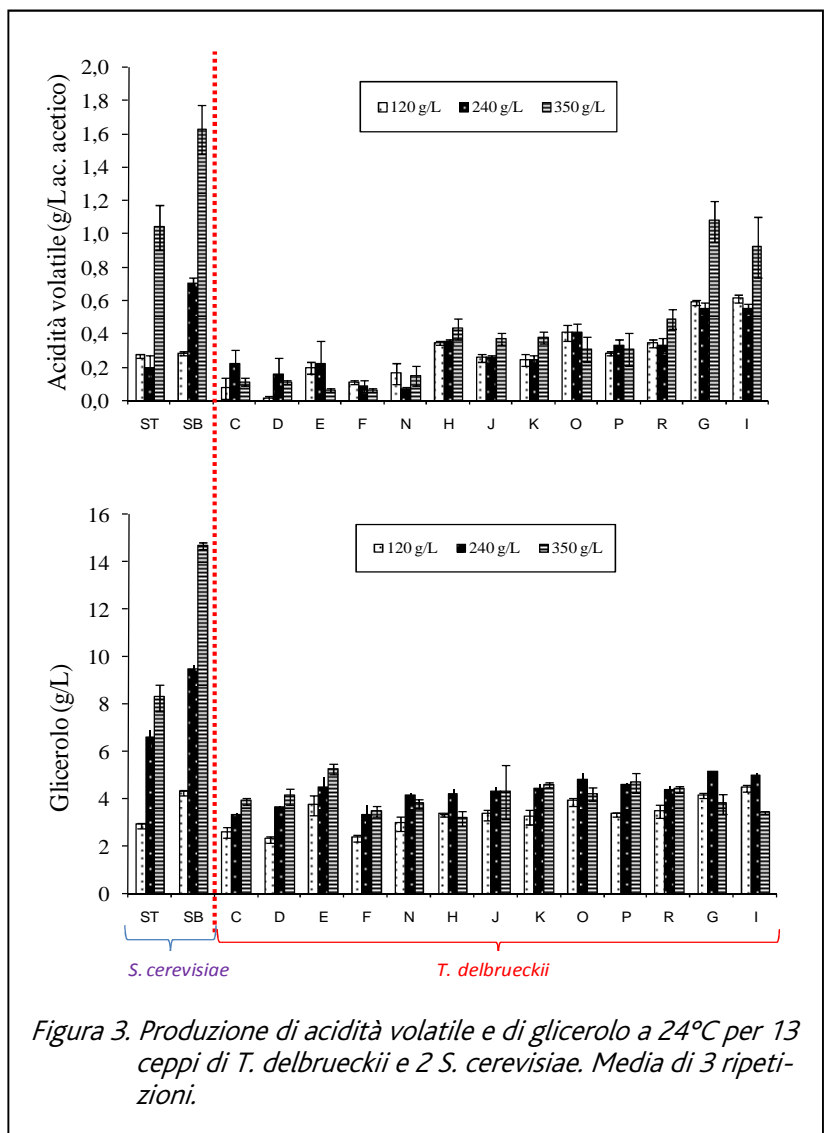
La figura 1 presenta le cinetiche di fermentazione di 5 ceppi su substrato sintetico a 240 g/L a 17 e 24 °C.

Nelle condizioni di laboratorio la durata della fase di latenza dei diversi ceppi ha avuto ampie variazioni, tra 20 e 150 h a 24°C e tra 50 e 160 h a 17°C.

La produzione di etanolo nelle stesse condizioni varia da 8 a 12 %vol. a 17°C e tra 7 e 11 % vol. a 24°C (fig. 2). Questa produzione di etanolo, anche se inferiore a quella di *S. cerevisiae* è comunque degna di nota per un lievito non-*Saccharomyces*.

La variabilità fenotipica si evidenzia anche come produzione di acidità volatile (AV) e di glicerolo. La produzione di questi composti è stata valutata su tre substrati sintetici con diversa concentrazione di zuccheri (120, 240 e 350 g/L) e confrontata con quella di due ceppi di *S. cerevisiae*: Zymaflore ST, lievito basso produttore di AV normalmente impiegato nella produzione di vini liquorosi, e SB (ceppo sperimentale Università di Bordeaux) alto produttore di AV.

Questi risultati mostrano chiaramente che *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* hanno risposte differenti allo stress osmotico. Per il secondo la risposta si traduce sistematicamente in una maggiore



produzione di AV e glicerina, cosa che non accade con *T. delbrueckii*. Questa proprietà tecnologica è molto interessante, soprattutto nell'ottica di impiegarlo nella produzione di vini liquorosi ove lo stress osmotico ed il conseguente rischio di produzione, da parte dei lieviti, di eccessive quantità di AV sono elevati.

E' stato dimostrato inoltre che *T. delbrueckii* produce basse concentrazioni di al-

cuni composti olfattivamente negativi come H₂S e fenoli volatili: ciò spiegherebbe la franchezza riscontrata nei prodotti fermentati con *Torulaspora*. La produzione di fenoli volatili da parte dei differenti ceppi è stata misurata e confrontata con quella di due ceppi di *S. cerevisiae*, uno POF(+) (rif. positivo) ed uno POF(-) (rif. negativo). Nelle nostre condizioni il ceppo POF(+) ha prodotto dieci volte più di fenoli volatili del ceppo POF(-) (Zymaflore VL1), rispettivamente 27 mg/L e 2,6 mg/L. La produzione media di *T. delbrueckii* è stata di 1,9 mg/L, dunque inferiore al riferimento negativo. *T. delbrueckii* presenta anche su questo parametro una certa variabilità fenotipica con ceppi che producono fino a 23 volte in meno di fenoli volatili rispetto al ceppo di *Saccharomyces* POF(-). Solo 5 ceppi hanno una produzione leggermente superiore al riferimento negativo, nell'ordine del 10 % in più, ma sempre molto inferiore al riferimento positivo. E' importante precisare che nessun ceppo di *T. delbrueckii* ha prodotto 4-etil-fenolo e 4-etil-guaiacolo.

Un altro punto importante, prevedendone un impiego industriale, è che tutti i ceppi testati sono insensibili al fattore Killer K2 prodotto da numerosi *S. cerevisiae*, e non sono in grado di produrre questa tossina, ciò significa che sono compatibili con tutti i *S. cerevisiae*.

Inoculo misto di *T. delbrueckii* - *S. cerevisiae*

La resistenza all'etanolo della specie *T. delbrueckii* è minore di quella di *S. cerevisiae*, le fermentazioni spesso non arrivano ad esaurimento totale degli zuccheri.

Per poter sfruttare il metabolismo specifico di *T. delbrueckii* si possono associare i suoi ceppi migliori con ceppi di *S. cerevisiae*, a garanzia della chiusura della fermentazione.

Questi studi sulla caratterizzazione della specie *T. delbrueckii* in condizioni enologiche hanno permesso di selezionare ceppi interessanti adatti all'elaborazione di vini rossi, rosati bianchi secchi e liquorosi in associazione con *S. cerevisiae*.

Si è provato ad operare con inoculi misti, sia in co-

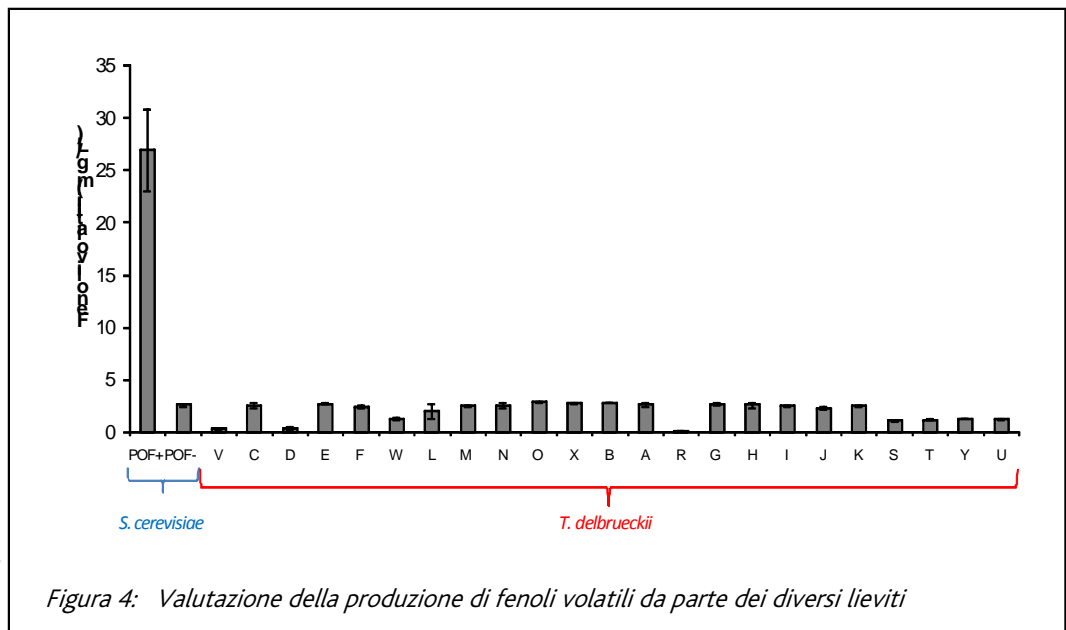


Figura 4: Valutazione della produzione di fenoli volatili da parte dei diversi lieviti

inoculo sia con inoculi sequenziali delle due specie. Il primo approccio consiste nell'introdurre i due tipi di lievito nello stesso momento; per favorire l'avvio della fermentazione da parte del lievito non-*Saccharomyces* si inocula quest'ultimo ad un tasso molto più elevato del ceppo di *S. cerevisiae*. Il secondo approccio, detto sequenziale, consiste nell'introduzione del *S. cerevisiae* 24-48 ore dopo l'avvio dell'attività fermentativa da parte della *Torulaspora*.

Associando un ceppo di *S. cerevisiae* con diversi ceppi di *T. delbrueckii* sono state eseguite diverse prove di inoculo misto, in condizioni di laboratorio e di cantina, nella produzione di vini bianchi secchi, rosati o liquorosi.

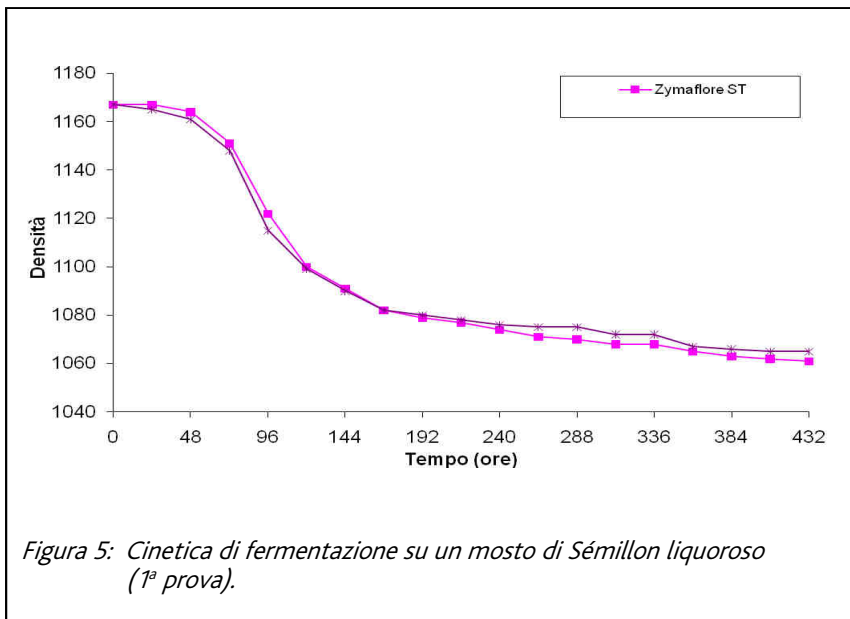
Le fermentazioni sono state tutte portate a secco o a 14% vol. sui vini liquorosi.

La presenza di *T. delbrueckii* fino a termine fermentazione è sempre stata verificata per PCR, ciò a conferma della buona impiantazione del ceppo. In confronto ad un testimone fermentato solo con *S. cerevisiae* l'AV nelle diverse prove si è mantenuta più bassa del 15 – 45% a seconda del mosto e del ceppo utilizzato. Durante le numerose prove realizzate non sono state osservate differenze a livello di durata della fase di latenza tra le modalità con co-inoculo e le modalità di riferimento con solo *S. cerevisiae*. Anche la durata complessiva della fermentazione è confrontabile, può tuttavia variare a seconda del ceppo di *T. delbrueckii* abbinato al ceppo di *S. cerevisiae*.

Prova di impiego nella fermentazione di un Sauternes.

Con l'obiettivo di studiare la produzione di AV in un mosto di Semillon ricco in zuccheri (358 g/L, ossia 22,2% vol. potenziali) è stata realizzata una prova in condizioni reali di vinificazione (fermentazione in barrique nuove) in una cantina della denominazione "Sauternes".

Si è inoltre verificato l'impatto aromatico all'analisi



sensoriale.

La temperatura del mosto ad inizio fermentazione era di 20°C. Si sono seguiti due diversi protocolli: un a tesi di riferimento con fermentazione condotta unicamente da *S. cerevisiae* (ceppo Zymaflore ST) ed una tesi con co-inoculo (*T. delbrueckii* ceppo A / *S. cerevisiae* ceppo ST).

La presenza di *T. delbrueckii* è stata confermata con PCR. Le cinetiche di fermentazione delle due tesi sono simili (fig. 5). Per contro la produzione di AV nella modalità con co-inoculo è nettamente inferiore (18% in meno).

In una seconda prova realizzata su un'altra aliquota di mosto liquoroso (370 g/L di zuccheri, ossia 23,4% vol. potenziali), nella tesi con co-inoculo, è stata osservata una diminuzione di AV del 34%, rispetto al testimone con *Saccharomyces* in purezza. Questo ulteriore abbattimento dell'AV è stato possibile gestendo le temperature in modo differente.

Con un panel di 20 degustatori esperti è stato realiz-

zato, sui prodotti della prima prova, un test triangolare, che ha confermato differenze significative tra il testimone e la modalità con co-inoculo. All'analisi sensoriale descrittiva (panel di 12 degustatori esperti) si sono evidenziate interessanti caratteristiche.

A livello olfattivo il vino ottenuto dal co-inoculo è percepito come più intenso, con note più marcate di frutti freschi e frutti canditi, ma anche con note boisé più nette. Nell'insieme viene giudicato più complesso rispetto al testimone, con note agrumate e floreali.

A livello gustativo, viene percepita una sostanziale differenza come volume in bocca, il campione co-inoculato è ritenuto più grasso. La percezione aromatica in bocca appare superiore, anche se la differenza è meno evidente. Il

vino frutto dell'inoculo misto è apprezzato per la sua maggiore complessità.

Da queste prove si deduce che l'inoculo misto *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* permette di ottenere vini più complessi, stimati essere più corposi, con AV ridotta di almeno 1/3.

Conclusione.

Nell'ambito di questi lavori si è preso in considerazione l'interesse enologico di un lievito non *Saccharomyces*, la *Torulasporea delbrueckii*. In un primo momento si è messa in evidenza una grande variabilità fenotipica all'interno di questa specie. Alcuni ceppi di *T. delbrueckii* permettono di ottenere, durante la fermentazione, una produzione di acidità volatile (AV) assai contenuta. Inoltre si è visto che *T. delbrueckii* è caratterizzata da una bassa produzione di fenoli volatili, anche inferiore a quella di ceppi di *S. cerevisiae* POF(-).

In un secondo tempo, in seguito alla valutazione di diversi parametri tecnologici quali: durata della fase di latenza, durata della fermentazione, resistenza all'alcol, resistenza alla SO₂, sensibilità al fattore Killer K2, si sono potuti selezionare ceppi enologicamente interessanti da applicare in associazione con *S. cerevisiae*.

E' stato quindi dimostrato che l'inoculo misto delle due specie permette di garantire la chiusura delle fermentazioni, modificando la complessità aromatica dei vini ed apportando maggiore lunghezza in bocca.

Tratto da lavori di:
Philippe Renault, Maryam Ehsani,
Marina Bely

