

DOCUMENTO
TECNICO

***Massimo Iorizzo**
***Ferdinando Massarella**
***Francesca Bonifacio**
****Francesco Di Loreto**

* Università degli Studi del
 Molise - Di.S.T.A.A.M.
 (Dip. Di Scienze e Tecnologie
 Agro-Alimentari, Ambientali e
 Microbiologiche) - Campobasso
 ** essedielle S.a.s. - Caldari di
 Ortona (CH)



M. Iorizzo

ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E PRIMA CARATTERIZZAZIONE DI LIEVITI DI INTERESSE ENOLOGICO

È stata condotta una ricerca nelle regioni Abruzzo, Molise e Puglia mirata al reperimento di lieviti di interesse enologico. I lieviti sono stati isolati da vini ottenuti, in cantine artigianali, per fermentazione spontanea. Tra i lieviti, appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, sono stati individuati alcuni stipti che hanno presentato caratteri tecnologici e qualitativi di particolare interesse.

Introduzione

Negli ultimi anni le tradizionali tecniche di vinificazione sono state sostituite da quelle più moderne.

Queste innovazioni hanno portato ad un miglioramento ed una standardizzazione della produzione vinaria ed hanno fatto sì che andassero quasi scomparendo quei gusti e quegli aromi che caratterizzavano alcuni vini dell'Italia centro-meridionale.

Un programma di miglio-

ramento della produzione vitivinicola, non può prescindere da una valorizzazione dei vini che preveda standard qualitativi costanti nelle diverse annate ed un arricchimento dei vini in caratteri peculiari e distintivi (1), (2), (3).

I lieviti commerciali, utilizzati in cantina, hanno completamente soppiantato la tradizionale fermentazione spontanea che, se da un lato portava ad una forte variabilità annua delle vinificazioni con prodotti non qualitativa-

mente accettabili, dall'altra spesso conferiva ai vini alcuni caratteri di peculiarità (4), (5).

La selezione e l'utilizzo di lieviti autoctoni in possesso di prerogative particolari contribuirebbe ad una maggiore caratterizzazione dei vini.

Inoltre la scelta mirata di un ceppo di lievito, in funzione delle caratteristiche del mosto di partenza e del prodotto che si vuole ottenere, diminuirebbe al minimo i problemi legati a squilibri

Tab. 1 - Caratteristiche fisiologiche dei lieviti isolati

Specie	Fermentazione						Assimilazione						Crescita			N° ceppi
	GLU	GAL	MAL	MEL	RAF	SAC	GLU	GAL	MAL	MEL	RAF	SAC	18°C	30°C	37°C	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	54
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1

(Kurtzman, C.P., et al., 1998; Vaughan-Martini, A., et al., 1999)

compositivi del vino; questi ultimi comportano, ad oggi, quasi esclusivamente interventi correttivi di tipo chimico (acidificazione, alcalizzazione, etc.) con una penalizzazione della qualità globale del vino (6), (7).

Il reperimento di lieviti autoctoni, in possesso di prerogative uniche o particolari, è un obiettivo fondamentale da raggiungere nell'ambito di un programma mirato al miglioramento delle nostre produzioni vinicole.

Nel presente lavoro vengono illustrati i risultati preliminari di una ricerca mirata all'isolamento ed alla caratterizzazione di lieviti isolati da vini ottenuti per fermentazione spontanea di mosti d'uva dell'Italia centro-meridionale.

Materiali e metodi

Isolamento dei lieviti.

Sono stati campionati 15 differenti vini, ottenuti per fermentazione di mosti di uve di diverse varietà, campionati in località delle regioni Abruzzo, Molise e Puglia.

Come terreno culturale per gli isolamenti è stato utilizzato il WL nutrient agar; per ogni campione di vino sono state isolate 10 colonie poi sottoposte a caratterizzazione morfo-fisiologica.

Identificazione e caratterizzazione dei lieviti.

La capacità di fermentare ed assimilare i carboidrati è stata valutata secondo criteri e

metodi di Kurtzman e Fell (1998) (8),(9).

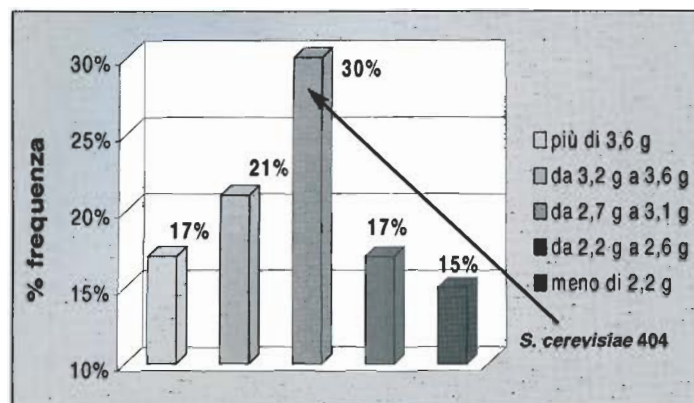
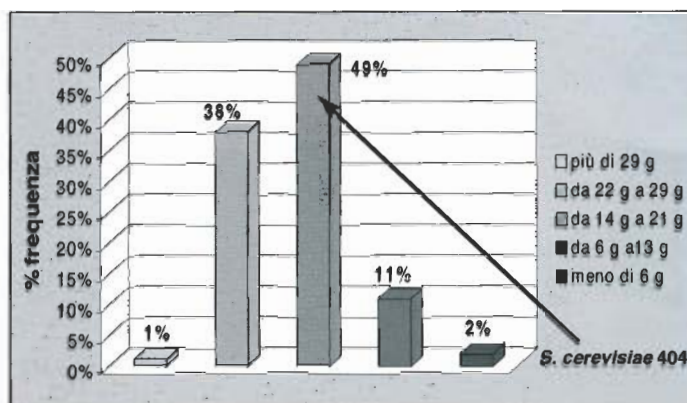
Caratterizzazione enologica dei lieviti. Dei lieviti isolati, sono stati studiati i seguenti caratteri tecnologici:

- vigore fermentativo (calo peso dopo 2 giorni di fermentazione);

- sui fermentati finali sono stati determinati acido acetico, acido malico e glicerolo per via spettrofotometrica mediante kit enzimatici reperiti in commercio;

- resistenza alla SO₂: vigore fermentativo in presenza di 80 mg/L (10);

- potere alcoligeno: calo peso a fine fermentazione di un mosto arricchito con glucosio sino al raggiungimento del 30% in zuccheri (11).

Fig. 1 - Istogrammi di frequenza relativi al vigore fermentativo (g)**Fig. 2 - Istogrammi di frequenza relativi al potere fermentativo (g)**

Le fermentazioni sono state condotte a 18-20°C e il decorso delle fermentazioni è stato monitorato mediante pesate sino al raggiungimento del peso costante.

Inoltre sono stati valutati i seguenti altri parametri: tipo di sviluppo in YPD liquido, la capacità di produrre H₂S su BiGGY agar (12).

In tutte le prove approntate è stato usato, come ceppo di riferimento, il *S. cerevisiae* 404, facente parte della collezione del DiPROVAL dell'Università degli Studi di Bologna.

Risultati della ricerca

Identificazione e caratterizzazione dei lieviti. Complessivamente 111 colture sono risultate sporigene, di forma ellittica e con gemmazione multilaterale.

Nella Tab. 1 sono riportate le caratteristiche fisiologiche dei lieviti isolati.

In base ai risultati ottenuti, tutti i ceppi sono stati classificati come *S. cerevisiae*.

Appare interessante una certa variabilità che ha permesso di suddividere *S. cerevisiae* in 14 gruppi.

Dalla tabella si può vedere come il primo, che è anche il più numeroso "54", e il terzo gruppo "8" riuniscono i ceppi che presentano il classico profilo fisiologico di tale specie (13), (14).

La differenza tra questi due gruppi è nella capacità di assimilare il melibiosio (MEL).

Caratterizzazione enologica dei lieviti. Gli istogrammi di frequenza riportati nelle Figg. 1, 2, 3, 4 e 5 illustrano il comportamento complessivo della popolazione microbica.

Modalità di sviluppo nei mezzi liquidi. A seguito delle prove effettuate, 98 ceppi hanno presentato un tipo di sviluppo pulverulento, 10 uno sviluppo flocculento e 3 uno sviluppo pulverulento abbinato a produzione di un velo superficiale.

Vigore fermentativo. Il ceppo di riferimento (*S. cerevisiae* 404) ha presentato un vigore fermentativo pari a 3,1 g.

I 111 ceppi presi in esame hanno provocato perdite di peso comprese tra un minimo di 2 g ed un massimo di 4,2 g.

Dall'osservazione della Fig. 1, relativo a questo carattere, si nota come il 30% della popolazione abbia prodotto cali di peso compresi tra 2,7 g e 3,1 g.

Molto interessanti da un punto di vista tecnologico, inoltre, sono le prestazioni dei lieviti (17%) che hanno dato cali di peso superiori a 3,6 g.

Potere fermentativo. Il ceppo di riferimento (*S. cerevisiae* 404) ha prodotto un calo peso finale pari a 16,6 g.

I ceppi isolati hanno provocato una perdita di peso compresa tra 5,9 g e 29,1 g.

Resistenza all'anidride solforosa. Al secondo giorno di fermentazione e in presenza di anidride solforosa, i ceppi analizzati hanno provocato una perdita di peso compresa tra 1,2 g e 4,2 g.

Il calo peso del ceppo *S. cerevisiae* 404 è risultato di 3,5 g.

Circa il 3% dei lieviti isolati sono stati in grado di produrre un calo superiore a 4,1 g.

Acidità totale. Gli istogrammi di frequenza relativi a questo parametro sono riportati nella Fig. 4.

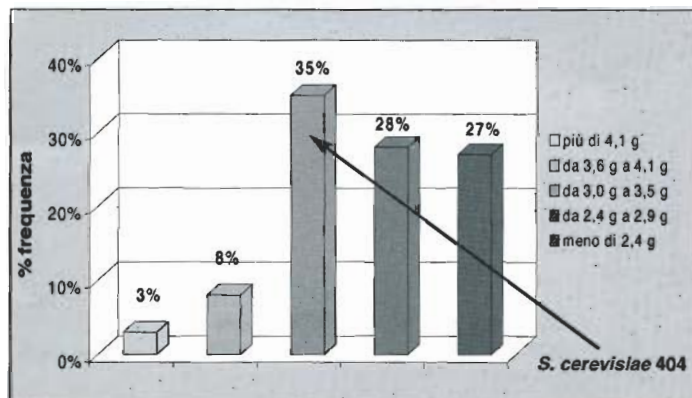
La maggior parte dei lieviti analizzati (42%) ha prodotto vini con acidità totale compresa tra 4,49 e 4,76 g/L di acido tartarico.

Il lievito di riferimento *S. cerevisiae* 404 ha prodotto un vino con un'acidità totale di 4,76 g/L.

Produzione di H₂S. Nella Fig. 5 sono illustrati gli istogrammi di frequenza relativi alla produzione di H₂S; è stata adottata una scala cromatica da 0 a 3 in funzione dell'intensità di colorazione delle colonie (15).

Il 5% della popolazione non ha prodotto quantità significative di acido solfidrico dando origine a colonie prive di pigmentazione.

Il 20% dei ceppi, compreso il ceppo di riferimento *S. cerevisiae* 404, ha sintetizzato bassissime quantità di idrogeno solforato. Il 45% della popolazione ha prodotto discrete quantità di tale

Fig. 3 - Istogrammi di frequenza relativi alla resistenza alla SO₂ (g)

composto, mentre il 30% ha sviluppato notevoli quantitativi producendo un'intensa colorazione marrone delle colonie.

Produzione di acido acetico. Nella Fig. 6 sono riportati gli istogrammi di frequenza relativi alla produzione di acido acetico.

Il 30% della popolazione studiata ha prodotto vini contenenti meno di 0.20 g/L di questo composto.

Nel vino ottenuto con il ceppo *S. cerevisiae* 404 è stato riscontrato un valore di acido acetico pari a 0.19 g/L.

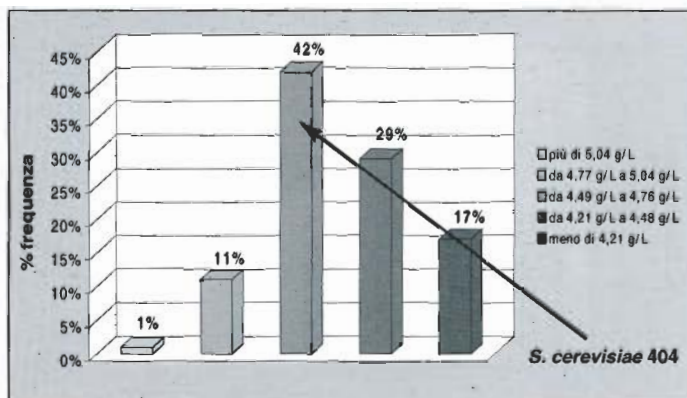
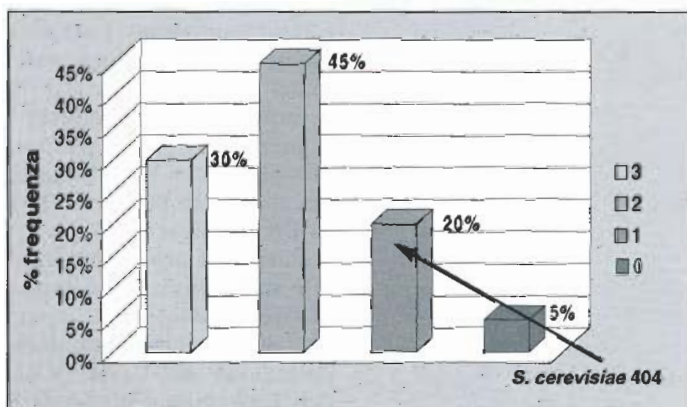
Azione sull'acido malico. Il mosto di partenza presentava un valore di acido malico di 3.15 g/L.

La maggior parte dei lieviti analizzati ha mostrato capacità demalicante; il 45% ha quasi dimezzato le quantità, preesistenti nel mosto, di questo composto.

Nel vino ottenuto col ceppo di riferimento *S. cerevisiae* 404 è stato riscontrato un valore di acido malico pari a 3.06 g/L.

Il 25% dei ceppi ha mostrato una capacità di sintetizzare questo composto, il 15% dei ceppi non ha modificato le quantità preesistenti nel mosto mentre gli altri lieviti hanno svolto una più o meno intensa attività demalicante.

Produzione di glicerolo. I dati relativi alla produzione di questo composto sono riportati nella Fig. 8, mediante

Fig. 4 - Istogrammi di frequenza relativi all'acidità totale (g/L acido tartarico)**Fig. 5 - Istogrammi di frequenza relativi alla produzione di H₂S**

l'ausilio di istogrammi di frequenza.

Nel vino ottenuto col ceppo *S. cerevisiae* 404 si è registrato un contenuto di 4.42 g/L di glicerolo.

Interessante appare la capacità del 20% dei ceppi di sintetizzare quantità di glicerolo superiori a 8g/L.

Considerazioni conclusive

Il lavoro svolto, mirato all'isolamento, all'identificazione e alla caratterizzazione tecnologica dei lieviti, ha portato alla costituzione di una collezione di 111 ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*.

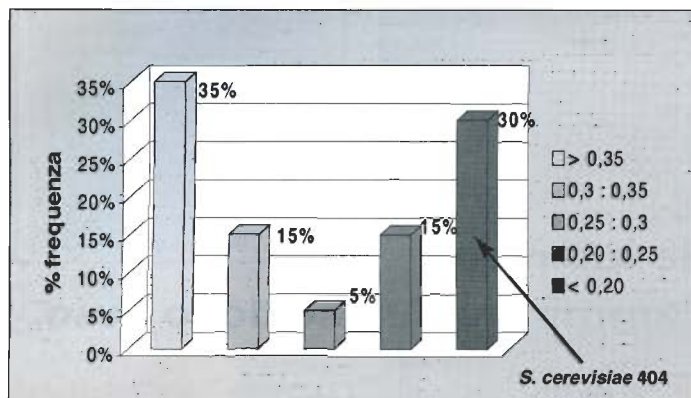
Le prove di micro-vinificazione hanno permesso di individuare alcuni ceppi che si sono distinti per vigore fermentativo, potere alcoligeno e resistenza all'anidride solforosa, risultando per-

tanto di particolare interesse enologico

Tali caratteri, infatti, nel loro complesso conferiscono competitività ai lieviti, aggiunti come starter nei mosti, che risulterebbero in grado quindi di prevalere più facilmente sulla microflora indigena.

Le buone tecnologie applicate ormai diffusamente e la scarsa diversificazione dei lieviti commerciali hanno penalizzato, negli ultimi anni, le produzioni di piccole e circoscritte zone geografiche; queste infatti si distinguevano per la peculiarità di alcuni vini ottenuti per fermentazione spontanea di uve autoctone.

L'utilizzo di buoni e particolari lieviti, isolati da vini e mosti ottenuti vinificando uve provenienti da cultivar autoctone, può contribuire a mantenere standard qualitativi elevati nel rispetto della tipicità.

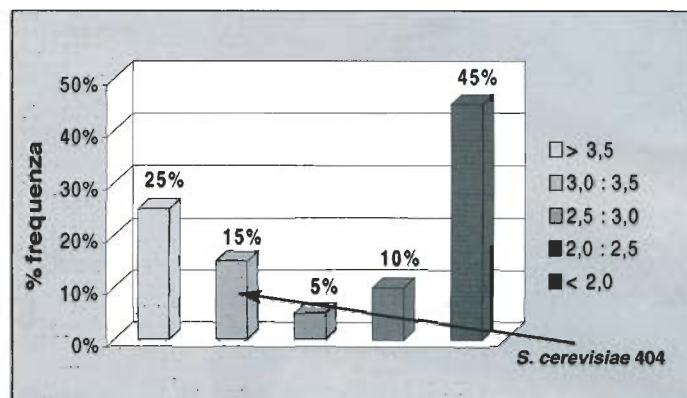
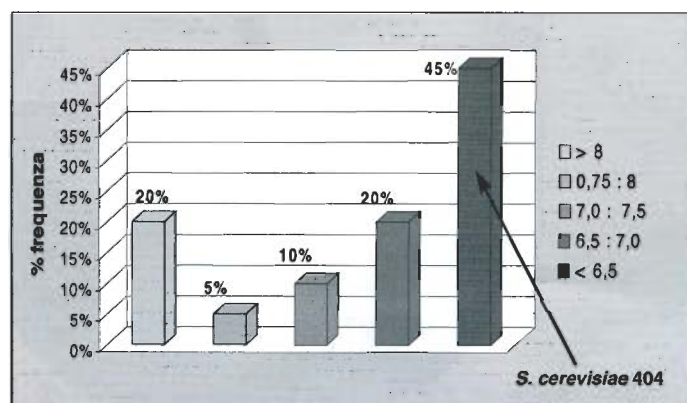
Fig. 6 - Istogrammi di frequenza relativi alla produzione di acido acetico

Sono tuttora in corso studi sulla caratterizzazione dei lieviti isolati e si prevede nella prossima campagna vinicola di utilizzare, in cantina, alcuni ceppi in vinificazioni su scala semi-industriale.

Il presente lavoro è stato svolto nell'ambito di una convenzione scientifica tra L'Università degli Studi del Molise Di.S.T.A.A.M. e l'azienda S.a.s. Enologia & Alimentazione di Caldari di Ortona.

Bibliografia

- (1) Catena M., Castellari L., Zambonelli C. 1994. *Il concetto di normalità nei lieviti della fermentazione vinaria*. Viticoltura n°37, 1994, pp.5-9.
- (2) Ciani M., Picciotti G., Ferraro L. 1996. *Verifica e confronto della attitudine enologica di lieviti selezionati per la vinificazione*. Annali Fac. Agr. Univ. PG.-Vol. XLVIII, 1994. pp. 49-58.
- (3) Zambonelli C., Castellari L., Ferruzzi M., Magrini A., Passarelli P., Giudici P., -Grazia L., Tini V. 1994. *I ceppi criotolleranti di Saccharomyces per il miglioramento e la modificazione della composizione chimica dei vini*. Viticoltura 37 (10-17).
- (4) Ciani M., Picciotti G., Ferraro L. 1996. *Verifica e confronto della attitudine enologica di lieviti selezionati per la vinificazione*. Annali Fac. Agr. Univ. PG.-Vol. XLVIII, 1994. pp. 49-58.

Fig. 7 - Istogrammi di frequenza relativi all'azione sull'acido malico**Fig. 8 - Istogrammi di frequenza relativi alla produzione di glicerolo**

- (5) Picciotti G., Ciani M. (1999). *Valutazione di alcuni caratteri fisiologici e tecnologici di colture selezionate per vinificazione*. Industrie delle bevande, 161: 243-246.
- (6) Giudici P., Zambonelli C. (1992). *Criteri di selezione dei lieviti per enologia*. Vignevini, 19,22.
- (7) Zambonelli C., *Microbiologia e biotecnologia dei vini*, Edagricole, Bologna 1998.
- (8) Kurtzman, C.P., Fell, J. W. (1998). *The Yeasts: a taxonomic study*. 4th Revised and Enlarged Edition. Elsevier.
- (9) Rainieri S., Zambonelli C., Hallsworth J. E., Pulvirenti A., Giudici P. (1999). *Saccharomyces uvarum, a distinct group within Saccharomyces sensu stric-*

- to*. FEMS Microbiology Letters, 177: 177-185.
- (10) Giudici P., Zambonelli C. (1992). *Criteri di selezione dei lieviti per enologia*. Vignevini, 19,22.
- (11) Castelli T. (1954). *Les agent de la fermentation vinnaire*. Arch. Microbiol, 20, 323.
- (12) Nickerson W.J. (1953). *Redution of inorganic substances by yeast*. J. Infection Diseases 93: 43.
- (13) Kurtzman, C.P., Fell, J. W. (1998). *The Yeasts: a taxonomic study*. 4th Revised and Enlarged Edition. Elsevier.
- (14) Vaugham-Martini, A. and Martini, A. 1999. *A taxonomic key for the genus Saccharomyces*. System. Appl. Microbiol. 16: 113-119.
- (15) Nickerson W.J. (1953). *Redution of inorganic substances by yeast*. J. Infection Diseases 93: 43.