

La dominanza dello starter

Il lievito inoculato prevale sempre in vinificazione?

Patrizia Romano, Angela Capece, Rocchina Pietrafesa,
Rossana Romaniello, Gabriella Siesto, Angela Pietrafesa, Grazia Alberico

Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali,
Università degli Studi della Basilicata, Potenza.

Il mosto d'uva è un substrato naturale ricco di lieviti che derivano dalle uve o dallo stesso ambiente di cantina e che possono compartecipare, insieme allo starter inoculato, o addirittura dominare durante il processo fermentativo. Per salvaguardare l'obiettivo principale della fermentazione inoculata, diventa di fondamentale importanza che lo starter inoculato domini durante il processo fermentativo. Per raggiungere questo risultato, tra i parametri selettivi di una coltura starter è stato di recente introdotto il carattere "dominanza dello starter".

L'uso di colture starter selezionate per la vinificazione è una pratica che si è ampiamente diffusa per sfruttare caratteristiche peculiari di determinati ceppi di lievito. L'uso di colture starter in tutte le aree vitivinicole del mondo rappresenta un importante vantaggio per la produzione del vino, in quanto permette di sfruttare caratteristiche peculiari e proprie di determinati ceppi di lievito per la produzione di vini con qualità organolettiche desiderate, ma anche riproducibili e costanti. È ben noto, infatti, che i lieviti giocano un ruolo rilevante nella determinazione della composizione chimica del vino: durante la fermentazione metabolizzano gli zuccheri e gli altri composti presenti nel mosto in etanolo e centinaia di prodotti secondari, che contribuiscono a conferire originalità e peculiarità al carattere del vino [1].

Sebbene i lieviti *Saccharomyces* siano presenti in frequenza bassa sulle uve, la predominanza di *S. cerevisiae* nelle fermentazioni ha portato al suo riconoscimento come principale lievito vinario, e vari ceppi di questa specie sono commercializzati come colture starter per la produzione di vino. Durante la fermentazione, i vinificatori possono modulare in modo creativo il carattere e la qualità del vino, anche attraverso una gestione ottimale del lievito, e al tempo stesso possono "modellare" strategicamente i vini in base ai cambiamenti di mercato [2].

In ogni caso, la coltura starter inoculata deve essere in grado di competere con i lieviti indigeni naturalmente presenti nel mosto d'uva [3, 4] e, se non si instaura una dominanza assoluta dello starter inoculato, anche i vini prodotti dall'aggiunta di colture starter possono essere il risultato di una fermentazione mista.

Si presume generalmente che i lieviti indigeni siano soppressi dallo starter, tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che i lieviti indigeni possono ancora partecipare alla fermentazione inoculata [4], conferendo la loro impronta metabolica. Infatti, la dominanza dei ceppi inoculati non viene sempre assicurata, ma potrà dipendere dalle specifiche condizioni di vinificazione, come la quantità e la vitalità dell'inoculo ed il suo corretto uso, e dalla tecnologia impiegata nella vinificazione, oltre che dalla capacità di interazione con gli altri microrganismi [5].

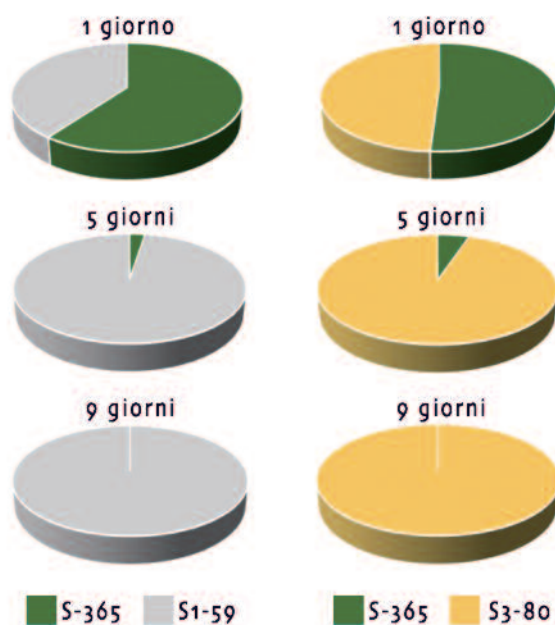


Figura 1 - Percentuale di dominanza dei singoli ceppi inclusi nello starter misto durante la fermentazione.

Studi recenti suggeriscono che il comportamento dominante di *S. cerevisiae* si manifesti quando il ceppo percepisce la presenza di altri lieviti [6].

Quando si utilizzano particolari colture di lievito per ottenere un carattere o uno stile speciale nel prodotto finale, è necessaria una crescita dominante del ceppo inoculato, per cui l'abilità dello starter inoculato di competere con i lieviti indigeni del mosto diventa un parametro fondamentale. Solo se questa condizione è garantita, lo starter inoculato può produrre l'effetto desiderato nel prodotto finale.

La valutazione del carattere "dominanza" del ceppo starter di *S. cerevisiae* nel processo di vinificazione richiede lo sviluppo di tecniche che possano chiaramente differenziare il ceppo inoculato dai ceppi presenti nel mosto d'uva.

Metodi molecolari, come l'analisi di restrizione del DNA mitocondriale (mtDNA) e l'amplificazione di regioni specifiche del genoma di *S. cerevisiae*, come la regione interdelta, sono risultati strumenti utili per il controllo microbiologico del processo fermentativo al fine di valutare il livello di dominanza della coltura starter. In questo articolo, riportiamo i risultati di prove di fermentazione condotte in laboratorio e su scala pilota in cantina impiegando miscele di ceppi diversi di *S. cerevisiae*, al fine di valutare il carattere "dominanza" di ciascuno dei ceppi inclusi nello starter misto. Inoltre, l'analisi delle componenti volatili dei vini ottenuti permetterà di valutare, oltre all'influenza del lievito starter sull'aroma del vino, l'esistenza di una potenziale correlazione tra livello di dominanza del ceppo e influenza

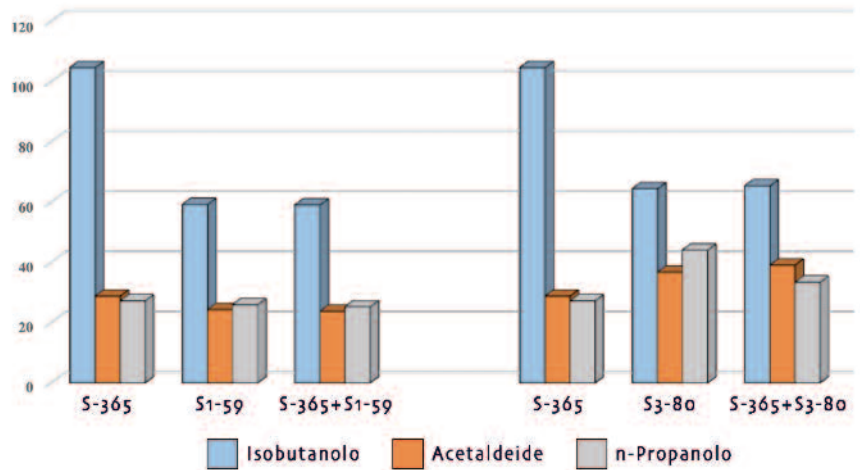


Figura 2 - Confronto tra i vini sperimentali per il contenuto di isobutanolo, acetaldeide e n-propanolo (mg/L) nei vini sperimentali. I risultati sono riportati come media delle due repliche per campione.

sulle caratteristiche organolettiche del vino.

I risultati ottenuti

Per dimostrare l'importanza del carattere "dominanza" come parametro essenziale per la selezione di colture starter, la capacità di guidare le fermentazioni inoculate è stata valutata in fermentazioni condotte utilizzando miscele di ceppi selvaggi di *S. cerevisiae*, isolati da fermentazione spontanea di diverse uve e appartenenti alla collezione dei Lieviti Fermentativi dell'Università della Basilicata.

Una prova è stata condotta su scala di laboratorio, utilizzando uno starter costituito da una miscela di diversi ceppi di lievito. Durante il processo di fermentazione sono stati isolati numerosi lieviti, che sono stati caratterizzati mediante tecniche molecolari, note per essere estremamente veloci ed efficienti.

Nei vini sperimentali ottenuti sono stati determinati per gascromatografia i principali composti aromatici per valutare l'influenza dei diversi starter sul bouquet

CAMPIONI	Acetaldeide	Acetato di etile	n-Propanolo	Isobutanolo	Alcol D-Amilico	Alcol Isoamilico
S1-59	24,2 ± 1,3	14,7 ± 1,2	25,8 ± 0,4	59,1 ± 1,8	139,2 ± 1,1	285,6 ± 7,6
S3-80	38,6 ± 1,6	15,9 ± 1,7	43,9 ± 0,4	64,3 ± 1,0	130,7 ± 0,7	245,8 ± 2,4
S-365	28,7 ± 0,9	12,7 ± 1,3	27,1 ± 0,3	104,5 ± 1,0	110,6 ± 1,7	257,8 ± 3,0
S-365+S1-59	23,7 ± 1,1	14,5 ± 0,6	25,1 ± 0,3	58,9 ± 0,8	140,1 ± 0,4	262,3 ± 3,9
S-365+S3-80	39,0 ± 1,4	17,1 ± 0,3	33,3 ± 1,0	65,3 ± 0,8	134,2 ± 1,3	253,9 ± 3,3

Tabella 1 - Composti secondari (mg/l) determinati nei vini sperimentali. I risultati sono riportati come media delle due repliche per campione + DS.

finale del vino, in funzione della dominanza di ceppo.

Tre ceppi di *S. cerevisiae* (S-365, S1-59, S3-80), precedentemente selezionati per buona attitudine enologica, sono stati inoculati in 400 mL di mosto Aglianico come colture starter miste costituite da due ceppi in diverse combinazioni, in confronto alle fermentazioni condotte con i singoli ceppi. Il livello di “dominanza” di ciascun ceppo incluso nello starter misto è stato valutato mediante analisi molecolare dei lieviti isolati dai campioni a diversi intervalli di tempo (1, 5 e 9 giorni) durante la fermentazione.

Da ogni campione in fermentazione mista sono stati isolati 40 lieviti che, dopo estrazione del DNA, sono stati sottoposti ad amplificazione delle sequenze interdelta, una tecnica molecolare molto utile per discriminare ceppi di *S. cerevisiae*.

I profili molecolari degli isolati sono stati confrontati con quelli dei tre ceppi. I risultati della dominanza sono riportati in Figura 1 come percentuali di presenza dei due ceppi che costituiscono ogni starter.

Come si può notare, dopo un giorno di fermentazione i due starter misti hanno esibito lo stesso comportamento, con una percentuale pressoché uguale di dominanza di ciascuno dei due ceppi che costituiscono lo starter misto. Successivamente, man mano la fermentazione procede, si evidenziano differenze significative nella percentuale di dominanza. Così, nella fermentazione inoculata con lo starter misto S-365+S1-59 già al quinto giorno il ceppo S1-59 predomina col 97,5% e a fine fermentazione rimane l'unico ceppo presente. Analogamente il ceppo S-365 (in coltura mista con il ceppo S3-80) dopo pochi giorni di fermentazione è risultato presente in bassissima percentuale e a fine processo è risultato assente, con dominanza quindi del ceppo S3-80.

Da queste due fermentazioni emerge che il ceppo S-365, pur essendo dotato di buone caratteristiche enologiche, in fermentazione mista esibisce una scarsa capacità di dominanza e quindi in fermentazione inoculata come starter singolo potrebbe avere problemi di competizione con i *Saccharomyces* indigeni. I due ceppi S1-59 e S3-80 hanno esibito un buon livello di dominanza e quindi potrebbero essere degli ottimi candidati per fermentazione inoculata.

La fase successiva ha riguardato l'analisi dei vini ottenuti dalle fermentazioni singole e miste, mediante analisi gas-cromatografica, al fine di individuare differenze significative nella qualità aromatica dei vini in funzione degli starter inoculati e della percentuale di dominanza dei ceppi.

Per validare il risultato, le fermentazioni sono state condotte in doppio per ogni combinazione di starter e in Tabella 1 sono riportati i dati, come media e deviazione standard (DS), del contenuto dei principali com-

posti secondari nei vini ottenuti dalle fermentazioni singole e miste.

L'importanza della capacità di dominare

L'esame dei dati dimostra che la capacità dello starter di dominare determina il contenuto dei diversi composti secondari, influenzando la qualità organolettica finale del vino.

In particolare, confrontando i vini prodotti con gli starter misti con quelli ottenuti con i corrispondenti ceppi in fermentazione singola si rileva che la qualità organolettica finale è significativamente influenzata dallo starter che ha dominato il processo.

La Figura 2 mostra il confronto tra i vini sperimentali per il contenuto di isobutanolo, acetaldeide e n-propanolo, riportando i risultati come media delle due repliche per campione. Si nota che in entrambe le fermentazioni miste, la qualità organolettica dei vini ottenuti è riconducibile al profilo analitico del ceppo di *S. cerevisiae* che ha dominato. Particolarmente evidente è il caso dell'isobutanolo che in fermentazione singola col ceppo S-365 è stato prodotto in quantità elevate, pari a circa 100 mg/l, mentre gli altri due ceppi (S1-59 e S3-80) in fermentazione singola hanno prodotto circa la metà.

Nei due vini prodotti con gli starter misti, S-365+S1-59 e S-365+S3-80, il contenuto di isobutanolo è risultato pari a quello prodotto dai due ceppi S1-59 e S3-80 in fermentazione singola, confermando la corrispondenza con la scarsa dominanza del ceppo S-365, ritrovata mediante analisi molecolare. I dati analitici, convalidando i risultati ottenuti dalla valutazione molecolare della dominanza dei ceppi in coltura mista, sottolineano l'importanza di questo parametro (capacità di dominare) nella selezione dei ceppi starter.

Un altro fattore che evidenzia l'importanza del parametro “capacità di dominare” dello starter riguarda l'uso di lieviti indigeni selezionati per la produzione di vini privi dell'aggiunta di solfiti. È pratica comune in vinificazione aggiungere anidride solforosa al mosto inoculando colture starter selezionate in modo da eliminare o minimizzare l'influenza dei lieviti naturalmente presenti. Da alcuni anni si è però diffusa un'attenzione sempre crescente rivolta alla produzione di vini a ridotto contenuto di SO₂, che può provocare reazioni allergiche, in particolare in soggetti sensibili. In conseguenza di ciò, gli operatori del settore vitivinicolo da diversi anni sono interessati alla produzione di vini a ridotto contenuto di solfiti.

Poiché questi composti sono prodotti naturali dell'attività metabolica del lievito vinario principale, *S. cerevisiae*, non si può pensare di produrre un vino senza solfiti, ma solo un vino privo dell'aggiunta di solfiti.

In questo contesto, l'uso di colture starter selezionate di *S. cerevisiae*, dotate di una elevata dominanza, può giocare un ruolo importante per garantirne la predominanza sui lieviti selvaggi. Pertanto, nel nostro studio, sono stati scelti due ceppi di *S. cerevisiae* risultati dominanti in precedenti prove su scala di laboratorio, dotati di elevato vigore fermentativo e basso-produttori di anidride solforosa.

I due ceppi, S-21 e S-40, sono stati saggiati come starter misto in fermentazione di Aglianico del Vulture su scala pilota (400 L) in cantina.

Sono state condotte due prove, con e senza aggiunta di anidride solforosa, e la "dominanza" dei due ceppi è stata saggiata mediante analisi molecolare di lieviti isolati dalle due prove durante il processo fermentativo a diversi intervalli di tempo (dopo 5 giorni e a fine fermentazione). I risultati, riportati in Tabella 2, evidenziano che nella fermentazione con aggiunta di anidride solforosa, oltre ai due ceppi inoculati come starter misto, a fine fermentazione è stata registrata la dominanza (48%) di lieviti indigeni (21 profili molecolari diversi). Diversamente, nella fermentazione senza aggiunta dell'antimicrobico, a fine processo si è registrata la dominanza dei due ceppi componenti lo starter, S-21 e S-40, con percentuale rispettivamente di 54% e 43% e una bassa presenza di lieviti indigeni (circa 3%).

L'unica differenza tra le due fermentazioni è stato il livello di inoculo, maggiore nella fermentazione senza aggiunta di SO₂.

Questo risultato sembra indicare che ceppi di *S. cerevisiae*, opportunamente selezionati e dotati di un elevato vigore fermentativo ed un elevato livello di dominanza e impiegati come starter misto con inoculo abbondante, riescono più facilmente a inibire lo sviluppo dei lieviti indigeni che, essendo presenti già sulle uve, sono meglio adattati al mosto d'uva.

I risultati relativi al livello di dominanza nelle due prove di fermentazione permettono di concludere che la sola aggiunta di SO₂ non è una pratica sufficiente a garantire la predominanza della coltura starter, cosa che invece sembra possa essere assicurata da un livello di inoculo dello starter leggermente superiore a quello solitamente utilizzato in cantina, impiegando ceppi opportunamente selezionati anche per una elevata capacità di dominare

	Fermentazione in mosto su scala pilota			
	+ SO ₂		Senza aggiunta di SO ₂	
	5 gg	Fine	5 gg	Fine
Indigeni	61%	48%	9%	3%
S-21	29%	13%	61%	54%
S-40	10%	39%	31%	43%

Tabella 2 - Livello di dominanza dei lieviti inclusi nelle colture starter miste per la fermentazione su scala pilota.

Conclusioni

Il monitoraggio dei ceppi inoculati durante il processo di vinificazione è fondamentale per verificare che abbiano realmente condotto il processo fermentativo e per verificare se ceppi indigeni indesiderati abbiano sviluppato nel corso della fermentazione. La sola pratica dell'inoculo del ceppo starter non garantisce la sua assoluta predominanza, per cui per salvaguardare l'obiettivo principale della fermentazione inoculata, cioè l'ottenimento di vini caratterizzati da qualità costante e riproducibile nel tempo, bisogna essere in grado di garantire che lo starter sia effettivamente l'attore principale della fermentazione. E per questo motivo, il nostro schema di selezione prevede di saggiare tra i parametri selettivi il carattere "dominanza dello starter", basato sulla valutazione dell'effettiva capacità di dominare del ceppo di *S. cerevisiae* scelto come candidato ideale per la vinificazione industriale.

Bibliografia

- [1] Romano P., Pietrafesa R., Romaniello R., Zambuto M., Calabretti A., Capece A. (2015) "Impact of yeast starter formulations on the production of volatile compounds during wine fermentation." *Yeast* 32, 245-256.
- [2] Fleet G. H. (2008) "Wine yeasts for the future." *FEMS Yeast Res.* 8, 979-995.
- [3] Albergaria H., Arneborg N. (2016) "Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2035-2046.
- [4] Capece A., Siesto G., Romaniello R., Lagreca V.M., Pietrafesa R., Calabretti A., Romano P. (2013) "Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region." *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 485-492.
- [5] Ciani M., Capece A., Comitini F., Romano P. (2016) "Yeast interactions in inoculated wine fermentation." *Front. Microbiol.* 7 (983).
- [6] Perrone B., Giacosa S., Rolle L., Coccolin L., Rantsiou K. (2013) "Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation." *Int. J. Food Microbiol.* 165, 156-162 (2013).