

A cura di:



Teodosio
D'Apolito¹



Ilaria
Filomeno¹

Giuseppe Bino²
Grazia Cofano²
Désirée Zingaropoli²

L'IMPORTANZA DELLA SCELTA DEL LIEVITO PER LO STILE DI VINO RICERCATO

Lo studio ha rivolto l'attenzione alle cinetiche di fermentazione di 8 lieviti secchi selezionati della linea iYeast® di Lafood® allo scopo di individuare più efficacemente il lievito più adatto a una conduzione ottimale delle fermentazioni e del risultato ricercato

Dal punto di vista biochimico, la fermentazione alcolica coinvolta nella produzione vinaria, prevede la trasformazione ad opera dei lieviti, degli zuccheri fermentescibili presenti nel mosto in alcol etilico, anidride carbonica e numerosi componenti minori. I tempi, la resa in alcol etilico e la composizione del vino finito, vengono ad essere fortemente influenzati dal tipo e dal numero di popolazioni dei lieviti coinvolti in questa trasformazione.

Conoscere l'andamento ed il comportamento cinetico dei lieviti per la fermentazione alcolica, è indispensabile all'enoologo per:

- Dedurre le caratteristiche del vino finito;
- Dedurre le esigenze nutritive prima e durante la fermentazione alcolica;
- Identificare le tipologie di lievito più adatte per la fermentazione di mosti peculiari con caratteristiche differenti;
- Identificare un range di temperatura di fermentazione ideale.

Obbiettivi

Questo lavoro si pone come obiettivo quello di studiare l'andamento cinetico di 8 lieviti selezionati della gamma iYeast® Lafood® per evidenziare tra loro eventuali differenze di comportamento a parità di condizioni (mosto da fermentare e temperatura di processo).

Materiali e metodi

Le prove di cinetica sono state condotte su due differenti mosti: uno bianco ed uno rosso.

Per ogni mosto le prove sono state effettuate utilizzando differenti lieviti iYeast® Lafood® al fine di annotare le caratteristiche di ognuno evidenziando eventuali differenze tra le cinetiche fermentative. Il mosto bianco all'inoculo dei lieviti aveva le seguenti caratteristiche chimiche (**Tab. 1**).

¹ Vinifare wine consulting

² Lafood®Group



Acidità Totale (g/L)	pH	Glucosio +Fruttosio (g/L)	Titolo alcolometrico effettivo (%vol)	Titolo alcolometrico potenziale (%vol)	Acidità volatile (g/L)	Acido Malico (g/L)
6,00	3,64	195,00	0,00	11,70	0,00	1,00

Tab. 1 - Parametri chimico fisici del mosto bianco ad inizio fermentazione



Acidità Totale (g/L)	pH	Glucosio +Fruttosio (g/L)	Titolo alcolometrico effettivo (%vol)	Titolo alcolometrico potenziale (%vol)	Acidità volatile (g/L)	Acido Malico (g/L)
5,00	3,88	195,00	0,05	11,75	0,05	3,10

Tab. 2 - Parametri chimico fisici del mosto rosso ad inizio fermentazione.

Le determinazioni dei parametri chimici sono state effettuate attraverso i metodi analitici indicati dalla metodologia ufficiale (art. 46/3 del Reg. Ce 1493/99, Dm 12/3/86, Dm 30/12/86, Dm 16/12/93).

Nelle diverse prove di cinetica sono stati impiegati quattro diversi ceppi di lievito selezionati della linea iYeast® di Lafood®:

- iYeast®Passion Fruit
- iYeast®Tropical White
- iYeast®ApplePear
- iYeast®Apple Viva

Il mosto rosso all'inoculo dei lieviti aveva le seguenti caratteristiche chimiche (**Tab. 2**).

Le determinazioni dei parametri chimici sono state effettuate attraverso i metodi analitici indicati dalla metodologia ufficiale (art. 46/3 del Reg. Ce 1493/99, Dm 12/3/86, Dm 30/12/86, Dm 16/12/93).

Nelle diverse prove di cinetica sono stati impiegati quattro diversi ceppi di lievito selezionati della linea iYeast® di Lafood®:

- iYeast®Grand Zin
- iYeast®Le More
- iYeast®Pepenero
- iYeast®Toro Nero

Le prove di cinetica fermentativa sono state condotte presso il laboratorio Vinifare Wine Consulting (www.vinifare.it).

L'impianto impiegato risulta costituito da una beuta in vetro di capienza nominale di 3 litri. La Beuta è tap-pata con un tappo in silicone in cui

vi sono due fori di diametro idoneo a fare entrare due cannule in vetro. La prima serve per prelevare, tramite collegamento ad una pompetta peristaltica, il campione da analizzare ed ha l'estremità che si trova all'interno della beuta collocata a una lunghezza tale da arrivare quasi al fondo della stessa mentre l'estremità esterna presenta un rubinetto di prelievo. La seconda cannula serve per far fuoriuscire l'anidride carbonica prodotta durante il processo fermentativo senza che ci sia ingresso di inquinanti esterni. Quest'ultima ha l'estremità interna alla beuta che si trova subito al di sotto del tappo in silicone mentre all'estremità esterna presenta un gorgogliatore.

I diversi componenti del bioreattore, preventivamente sterilizzati in autoclave (120 °C per 20'), sono stati assemblati operando direttamente sulla fiamma di un becco Bunsen. Quando l'assemblaggio è stato ultimato, all'interno dell'apparato è stato fatto il vuoto (0,7 kPa), mentre si è proceduto a fiammeggiare la superficie esterna.

Per assicurare il controllo della temperatura durante il processo fermentativo, la beuta è stata immersa a bagnomaria in acqua che è stata refrigerata a ricircolo mediante una centralina in grado di mantenere la temperatura costante a 21 °C.

Dopo aver riportato il biofermentatore a temperatura e a pressione ambiente, sono stati introdotti al suo interno il mezzo di reazione ed i lieviti. All'interno del bioreattore è stato

inizialmente immesso il mosto, reso sterile per filtrazione (\emptyset pori = 0,22 μ m), è seguito poi l'inoculo dei LSA, non preventivamente reidratati.

Il momento dell'inoculo ha rappresentato l'inizio del processo fermentativo al quale hanno fatto riferimento i tempi dei successivi prelievi. L'omogeneità del mezzo di reazione è stata garantita da un'ancoretta magnetica mantenuta in movimento da una piastra esterna. Per assicurare la presenza di una popolazione microbica relativamente costante, in tutte le prove considerate, sono state impiegate quantità di lievito di 20 g/hL (pari a circa 10^{10} UFC /mL). Una volta al giorno sono stati effettuati dei prelievi del mezzo. Il campione prelevato è stato diviso in due aliquote. La prima è stata destinata alla valutazione microbiologica per determinare la carica microbica attiva al momento del prelievo (UFC/mL), mentre la seconda è stata impiegata per le analisi chimiche.

La tecnica microbiologica utilizzata per la determinazione del numero di microrganismi attivi durante la fermentazione è stata quella delle conta di cellule vitali su piastra Petri.

La manipolazione dei campioni per le analisi microbiologiche è avvenuta, in tutti gli stadi, sotto cappa a flusso laminare ed in presenza della fiamma viva del becco Bunsen tale da evitare eventuali contaminazioni. L'aliquota di campione (1 mL) è stata diluita più volte con un volume noto (9 mL) di acqua peptonata sterile al fine di evitare fenomeni di plasmolisi dei lieviti.

Si è proseguito con le diluizioni seriali del campione fino a raggiungere le desiderate riduzioni della popolazione microbica (es. 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11}), che sono state individuate in rapporto al volume di campione iniziale ed in modo tale da assicurare lo sviluppo di un numero di colonie limitato e quindi correttamente contato.

Il mezzo di crescita usato è stato il WL nutrient agar disponibile in commercio in fiale sterili da 2 ml ciascuna. 10 mL di campione prelevato ed appositamente diluito sono stati filtrati attraverso la membrana della piastra Petri montata su una beuta codata nella quale viene creata una depressione. Data l'elevata incertezza connessa con questo tipo di determinazioni microbiologiche (~ 1 ordine di grandezza), per uno stesso campione e per ogni diluizione sono state preparate due piastre repliche.

Le piastre così ottenute sono state incubate alla temperatura di 30° C per 48-72 ore.

Contando il numero di colonie presenti sulle piastre (UFC) ed il coefficiente di diluizione, è possibile determinare il numero di cellule di lievito attive (UFC/mL).

Le concentrazioni dei componenti presenti in ciascun prelievo sono state effettuate attraverso i metodi analitici indicati dalla metodologia ufficiale (art. 46/3 del Reg. Ce 1493/99, Dm 12/3/86, Dm 30/12/86, Dm 16/12/93) ed in particolare:

- Titolo alcolometrico effettivo: OIV-MA-AS312
- Acidità volatile: OIV-MA-AS313
- Glucosio + fruttosio: OIV-MA-AS311
- pH: OIV-MA-AS313

Nel corso della sperimentazione, è stata valutata la cinetica di metabolizzazione dei principali substrati energetici convertiti dai saccaromiceti nel corso della fermentazione alcolica (glucosio + fruttosio).

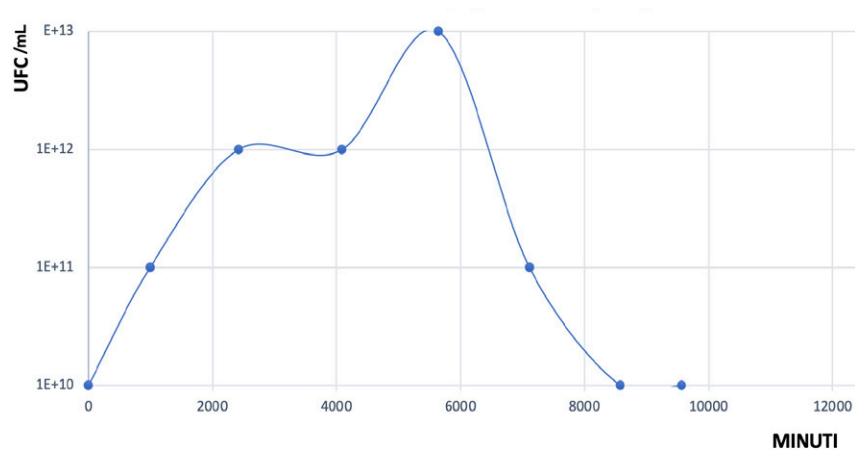
La velocità di conversione degli esosi presenti nel mezzo di reazione è stata determinata, in accordo con una cinetica del primo ordine, risolvendo la seguente equazione differenziale:

$$v = -dS_{t=t}/dt = k_e \cdot S_{t=t}$$

dove:

v = velocità di conversione degli esosi (mmol/L);

Graf. 1 - APPLEPEAR popolazione (UFC)



$S_{t=t}$ = concentrazione glucidica (mmoli \cdot L⁻¹ \cdot h⁻¹) ad un generico tempo t (h);
 k_e = costante cinetica di metabolizzazione dei substrati fermentescibili (h⁻¹).

Da cui integrando tra t = 0 e t = t , e passando alla forma logaritmica si ottiene:

$$\ln S_{t=t} = \ln S_{t=0} - k_e \cdot t$$

Che nel piano (t, ln S) rappresenta

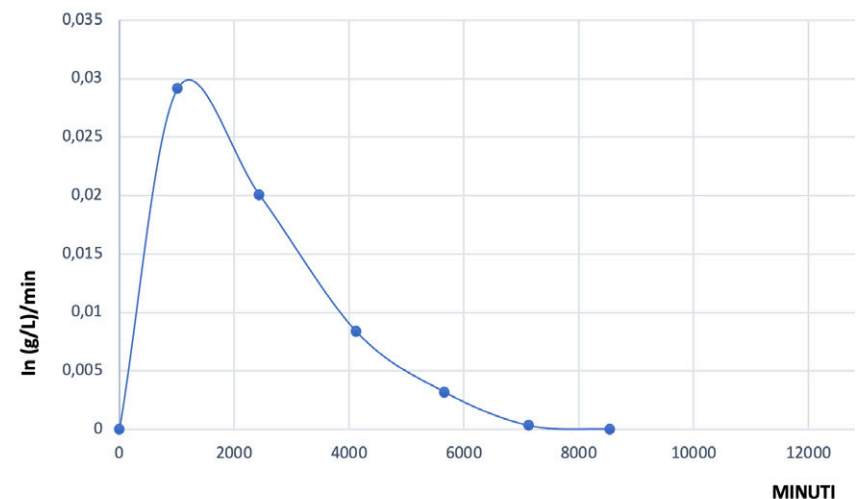
enziale del tipo:

$$S_{t=t} = S_{t=0} \cdot e^{-k_e \cdot t}$$

Risultati e discussione

Nelle prove riguardanti i ceppi utilizzati per fermentare i mosti di uve bianche, tutti i lieviti partono da una popolazione iniziale di 10¹⁰ UFC/mL. Durante l'esecuzione dello studio si

Graf. 2 - APPLE VIVA velocità di fermentazione

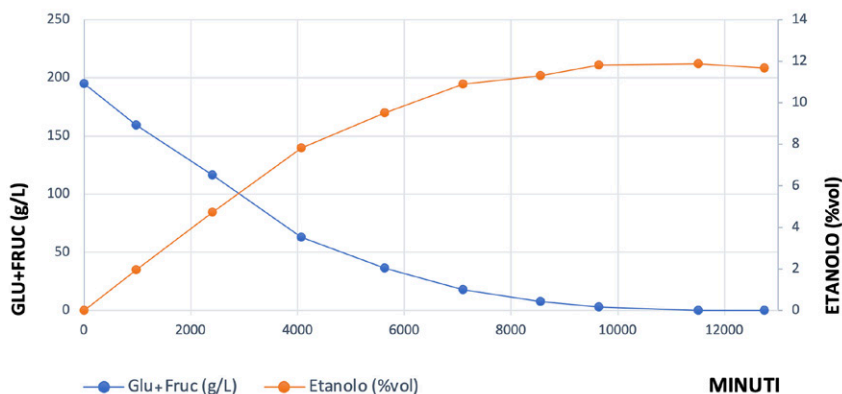


l'equazione di una retta di pendenza $-k_e$ e intercetta $\ln S_{t=0}$ (concentrazione glucidica iniziale).

La relazione che esprime l'andamento della conversione di glucosio in funzione del tempo di reazione, nel piano (t, [S]) rappresenta un'equazione espo-

sono potute notare differenze sullo sviluppo delle popolazioni di lievito così come ci si aspettava, proprio relativamente allo scopo dello studio di identificare la biotecnologia adatta a fermentare quel tipo di mosto. Il lievito che ha ottenuto la massima concen-

Graf. 3 - TROPICAL WHITE cinetica fermentativa



trazione di cellule è *iYeast®Applepear* (Graf. 1) che ha raggiunto infatti le 10^{13} UFC/mL. L'incremento della concentrazione di lieviti, è avvenuta sino ai 6000 minuti circa per *iYeast®Applepear* e per *iYeast®Apple Viva*. La variazione delle concentrazioni di glucosio+fruttosio ed etanolo di ogni LSA durante la fermentazione alcolica del vino bianco mostra che,

iYeast®Applepear e *iYeast®Apple Viva* (Graf. 2) sono i lieviti che hanno chiuso per primi la fermentazione. Studiando i grafici possiamo evincerne alcune interessanti valutazioni atte poi a scegliere l'eventuale lievito di nostro interesse. *iYeast®Tropical White* caratterizzato da una popolazione in cellule di lievito pressoché costante, durante tutto

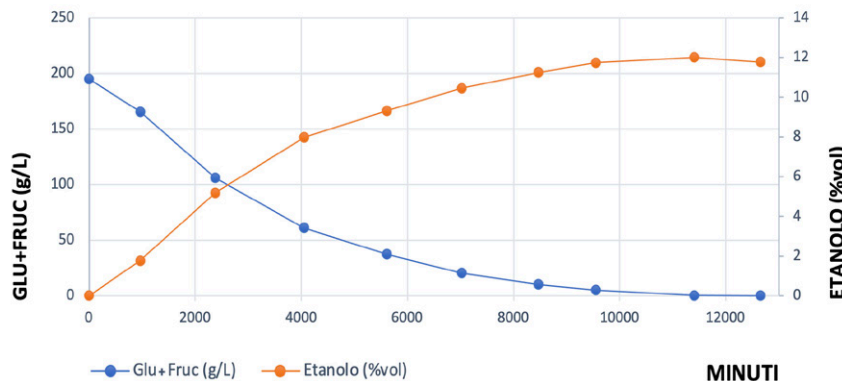
il processo ha registrato la maggiore velocità di fermentazione al primo prelievo, salvo poi calmierare equilibratamente la sua cinetica arrivando senza particolari problemi a chiudere la fermentazione senza alcuna coda. *iYeast®Tropical White* che ha dimostrato una cinetica molto veloce nelle primissime fasi (Graf. 3), sembra quindi che sia molto adatto anche a condurre fermentazioni in cui si ha necessità di abbassare, anche notevolmente, le temperature di fermentazione.

iYeast®Passion Fruit sembra abbia una cinetica senza picchi sia nella prima fase della fermentazione che nella chiusura della stessa, dimostrando una equilibrata sicurezza fermentativa, volta a condurre fermentazioni in diverse condizioni termiche e nutritive (Graf. 4).

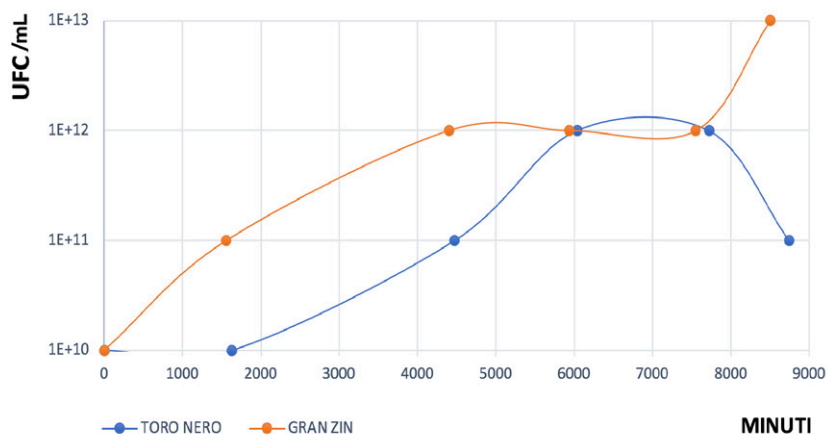
iYeast®Applepear sembra avere poche esigenze nutritive perché è in grado di moltiplicarsi anche in mezzi non molto ricchi di sostanze azotate. In media chiude presto la fermentazione e senza code, quindi possiamo considerarlo un lievito che permette di fermentare anche matrici difficili e più scarse nelle quantità di azoto endogeno.

Anche *iYeast®Apple Viva*, come *iYeast®Passion Fruit*, sembra abbia una cinetica equilibrata e senza picchi. Chiude presto la fermentazione e senza code dimostrando un'elevata affinità verso matrici con elevato grado zuccherino e verso fermentazioni da condurre entro un ampio range di temperatura.

Graf. 4 - PASSION FRUIT cinetica fermentativa



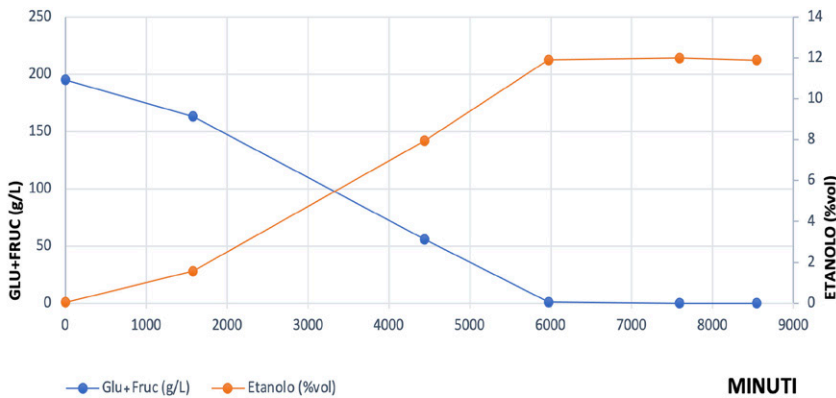
Graf. 5 - CONFRONTO popolazione (UFC)



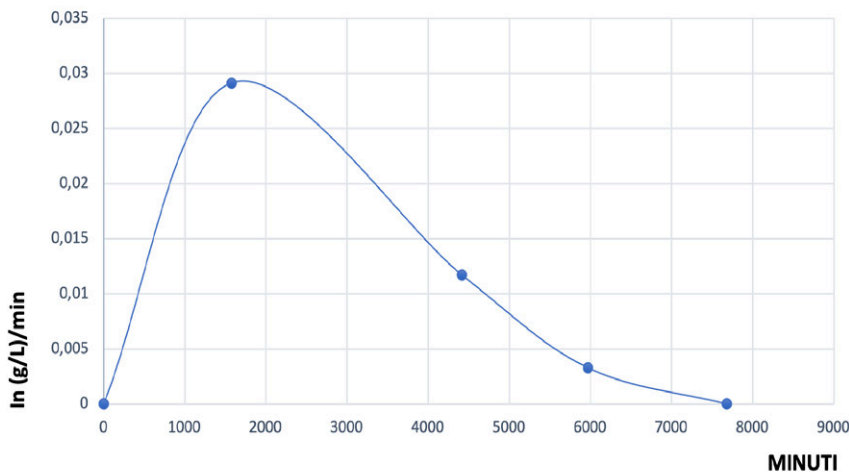
Nelle prove concernenti i ceppi atti a fermentare i mosti di uve rosse, tutti i lieviti partono da una popolazione iniziale di 10^{10} UFC/mL. Tuttavia l'andamento delle popolazioni di ciascun lievito durante la fermentazione alcolica è diverso da ceppo a ceppo. Se nei lieviti *iYeast®Toro Nero*, *iYeast®Pepenero* e *iYeast®Le More* si assiste ad un incremento iniziale della popolazione ed un successivo decremento man mano che il processo di fermentazione si sta ultimando, con il lievito *iYeast®Grand Zin* si è arrivati a concludere la fermentazione con una popolazione ancora in aumento a dimostrazione di una spiccata resistenza e alcol tolleranza (Graf. 5).

La variazione delle concentrazioni di

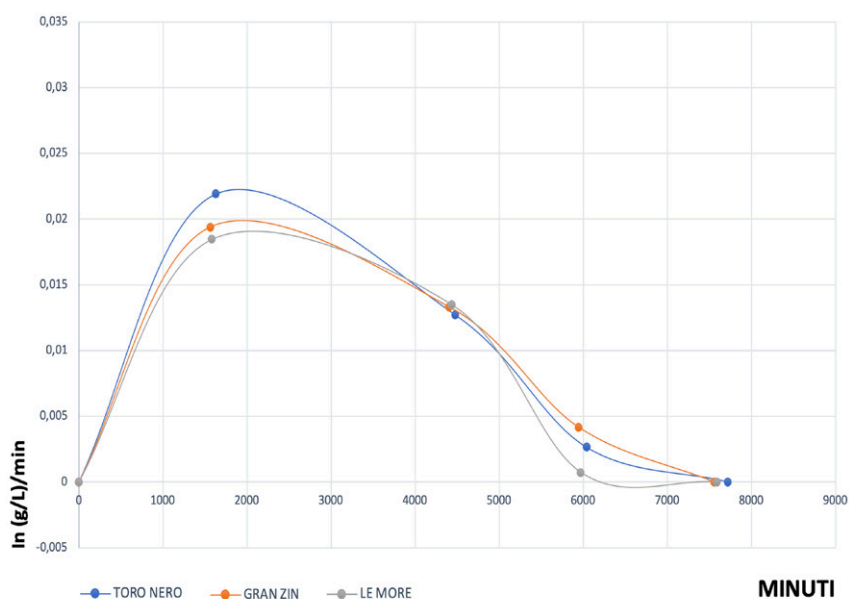
Graf. 6 - LE MORE cinetica fermentativa



Graf. 7 - PEPENERO velocità di fermentazione



Graf. 8 - CONFRONTO velocità di fermentazione



glucosio+fruttosio ed etanolo di ogni LSA durante la fermentazione alcolica del vino rosso mostra che, tutte le fermentazioni si sono concluse in un tempo minore degli 8000 minuti con, in particolare, *iYeast®Le More* che ha fermentato tutti gli zuccheri intorno ai 6000 minuti (**Graf. 6**).

In merito alla velocità di fermentazione di ogni LSA durante la fermentazione alcolica del vino rosso, il lievito che ha raggiunto una velocità cinetica maggiore è stato il *iYeast®Pepenero* (**Graf. 7**). Tutti gli altri lieviti hanno dimostrato delle velocità cinetiche seppur poco più basse, costanti (**Graf. 8**). *iYeast®Grand Zin* ha dimostrato di essere un lievito con alta capacità a moltiplicarsi, molto resistente ed alcool tollerante, la cui popolazione tende sempre a salire garantendo un numero elevato e persistente di cellule vive (**Graf. 5**) che garantiscono cinetiche sicure, costanti ed equilibrate. *iYeast®Le More* sfrutta una buona capacità di riproduzione garantendo fermentazioni veloci e sicure anche in mosti difficili. *iYeast®Pepenero* è caratterizzato da periodi di latenza più lunghi rispetto agli altri lieviti ma velocità di fermentazioni maggiori (**Graf. 8**).

Conclusioni

Grazie a questo studio si evince come sia di fondamentale importanza la conoscenza delle cinetiche fermentative, ovvero la conoscenza del metabolismo del lievito e delle sue condizioni peculiari di optimum fermentativo, in relazione alla matrice da fermentare e allo stile di vino da produrre.

Attraverso questo lavoro si intende dare elementi atti ad aiutare l'enologo nella scelta puntuale del lievito secco attivo, partendo dall'obiettivo enologico prefissato, in maniera tale da poter condurre le fermentazioni come programmato e come sperato, per raggiungere agevolmente il risultato voluto e ottenere lo stile del vino ricercato. ■



Inquadra il QR Code per collegarti alla sezione lieviti del nostro sito:

lafoodwine.com