

Un lievito non-*Saccharomyces* per la rivelazione di terpeni e tioli

Grazie alle sue attività enzimatiche un ceppo selezionato di *Metschnikowia pulcherrima* offre nuove possibilità per valorizzare l'espressione aromatica dei vini

Il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* in vinificazione è stato oggetto di numerosi lavori di ricerca che hanno confermato, oltre al miglioramento della qualità globale del vino, il loro contributo positivo sul piano aromatico (Ciani & Ferraro, 1998; Garcia et al., 2002).

Tra i diversi non-*Saccharomyces*, *Metschnikowia pulcherrima* è stata approfonditamente caratterizzata per le attività enzimatiche secondarie che le consentono principalmente il rilascio di terpeni e tioli volatili.

Lallemand, grazie a numerosi approfondimenti e studi, ha selezionato un particolare ceppo di *M. pulcherrima* (LEVEL² FLAVIA™) che si caratterizza per la peculiare abilità nel rilascio di composti aromatici varietali.

SELEZIONE DI UN CEPPO SPECIFICO DI *Metschnikowia pulcherrima*

Nel 2007, nell'ambito di una collaborazione scientifica tra Lallemand e il laboratorio di ricerca LAMAP dell'Università di Santiago del Cile (USACH), sono stati condotti alcuni studi volti ad approfondire il potenziale enzimatico di diversi lieviti non-*Saccharomyces*. In un primo momento ne sono state monitorate le attività enzimatiche specifiche e successivamente il livello di espressione in funzione dei diversi parametri enologici come pH, temperatura e alcol (Ganga et al., 2013). Questo progetto ha portato alla selezione di un nuovo ceppo di *Metschnikowia pulcherrima* dalle peculiari attività enzimatiche, α -arabinofuranosidasiche e β -glucosidasiche. Inoltre, lo studio congiunto delle

attività enzimatiche e delle cinetiche fermentative ha consentito di mettere a punto un protocollo di lavoro in grado di massimizzare il rilascio dei precursori aromatici e assicurare il completamento della fermentazione alcolica. **La migliore soluzione tecnica individuata per massimizzare questi due obiettivi prevede l'inoculo di un *Saccharomyces cerevisiae* 24 ore dopo quello di *M. pulcherrima*.**

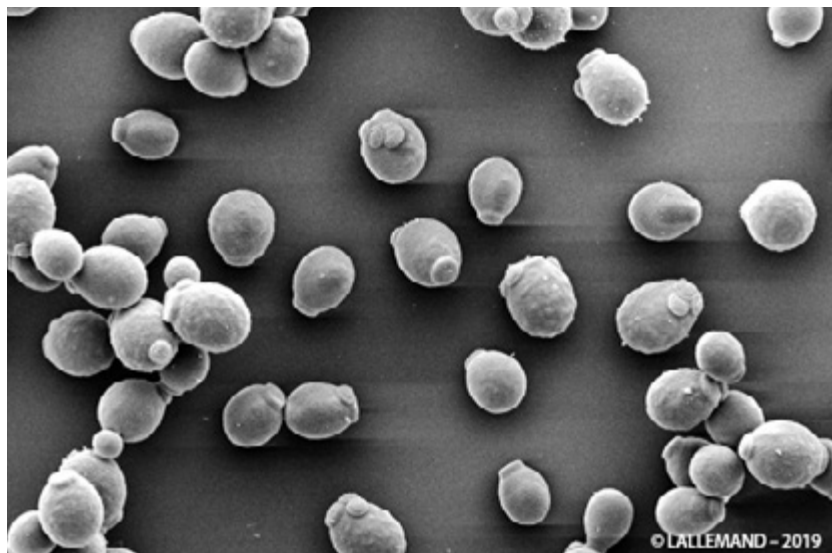
L'IMPATTO SUI TERPENI

I terpeni come linalolo, geraniolo e nerolo, sono una categoria di composti aromatici responsabili di sentori floreali e fruttati (Vilanova & Sieiro, 2006) che caratterizzano il profilo aromatico di alcuni vini (Günata et al., 1988). Questi composti sono presenti nelle uve sotto forma di precursori glicosidici legati a degli zuccheri, solitamente di tipo arabinico e glucosidico. Una successione di reazioni sequenziali di diversi enzi-

mi, come l' α -arabinofuranosidasi e la β -glucosidasi (Günata et al., 1988, 1993), provoca la rottura dei legami glicosidici e permette il rilascio dei terpeni in forma libera, contribuendo positivamente al profilo aromatico dei vini.

Dalle prime prove condotte nel 2011 è stata subito messa in luce la capacità di questo nuovo ceppo di incrementare l'espressione aromatica di alcuni vitigni ricchi in terpeni. I risultati ottenuti in una prova comparativa sulla vinificazione di uve Moscato di Alessandria hanno evidenziato un contenuto finale di terpeni liberi considerevolmente più elevato nel vino con l'aggiunta della *M. pulcherrima* rispetto al vino controllo (**figura 1**) (Carriles et al., 2014).

In un ulteriore lavoro l'attività enzimatica β -glucosidasi intra cellulare presente in diversi ceppi selezionati del lievito *S. cerevisiae* è stata confrontata con quella del ceppo di *M. pulcherrima*, utilizzando la tecnica



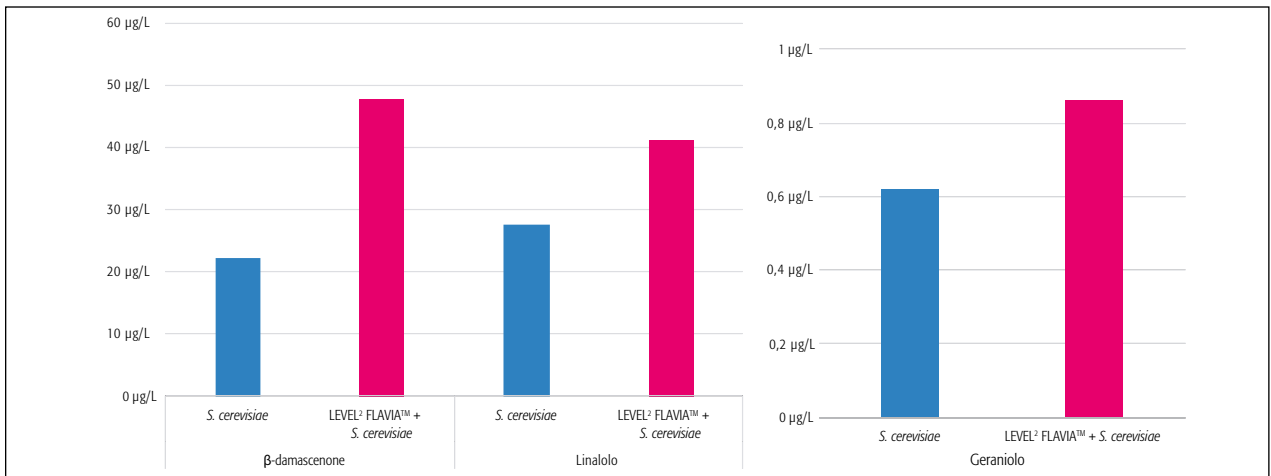


Figura 1. Impatto dell'utilizzo del ceppo di *M. pulcherrima* selezionato sulle concentrazioni finali di terpeni e norisoprenoidi in una prova comparativa condotta su Moscato di Alessandria, 2011, Cave Capel (Cile) (Carriles et al., 2014)

della permeabilizzazione cellulare. ***M. pulcherrima* è risultata avere la maggiore attività β-glucosid- asica (70 pkat/10⁸ cellule) rispetto agli altri lieviti testati (attività massima di 20 pkat/10⁸)¹, rivelandosi più efficiente nel rilascio di terpeni** (Bisotto et al., 2015).

L'ATTIVITÀ β-LIASICA E L'IMPATTO SUI TIOLI VOLATILI

Nel 2019, grazie a una tesi di dottorato condotta in collaborazione con l'INRAE (Francia), si è potuta dimostrare un'ulteriore importante attività enzimatica di LEVEL² FLAVIA™ che consente il rilascio di tioli volatili, essendo stata infatti rilevata la presenza di attività β-lasica.

I tioli volatili sono una famiglia di composti aromatici che svolgono un ruolo determinante nel profilo organolettico di alcuni vini bianchi (Tominaga et al., 1998), apportando sentori di pompelmo e frutto della passione (3-mercapto-esan-1-

olo, 3MH e 3-mercapto-esil-acetato, 3MHA) e bosso (4-mercapto-4-metilpentan-2-one, 4MMP). 3MH e 4MMP sono presenti nell'uva sotto forma di precursori aromatici inodori coniugati a cisteina, glutazione o dipeptidi (Glu-Cis e Cis-Glu). Durante la fermentazione alcolica la scissione del legame C-S da parte della β-lasi dei lieviti consente la liberazione di questi composti aromatici. Il 3MHA deriva invece dall'acetilazione del 3MH.

I lieviti enologici sono caratterizzati da un'ampia variabilità nell'attività β-lasica, legata al polimorfismo del gene IRC7 che codifica per questo enzima (Cordente et al., 2015). La maggior parte dei lieviti possiede una versione incompleta di questo gene che codifica quindi per una proteina non funzionale e per questo motivo **la capacità di convertire i precursori tiolici in tioli volatili differisce notevolmente sia a**

livello di specie che a livello di ceppo (Belda et al., 2016).

Nella caratterizzazione eseguita in collaborazione con l'INRAE il nuovo ceppo di *M. pulcherrima* ha mostrato un'attività β-lasica capace di raggiungere i 28 pkat/ml (60 pkat/10⁸ cellule) (**figura 2**).

Questa attività non solo è risultata dieci volte superiore rispetto a quella di un lievito *S. cerevisiae* di riferimento (2 pkat/ml), ma è stata rilevata sin dall'inizio della fermentazione alcolica ed è stata mantenuta a un livello elevato durante tutta la fermentazione e ben oltre il termine della fase di crescita (circa trenta ore). **Questo conferma l'importante contributo enzimatico del ceppo nella rivelazione del potenziale tiolico delle uve.**

Un lavoro di ricerca condotto su un mosto sintetico (220 g/L di zuccheri, 190 mg/L di azoto prontamente assimilabile - 2/3 di azoto organico, 1/3 di azoto ammoniacale e 5 mg/L di fitosteroli) aggiunto di precursori tiolici ha messo in luce il contributo aromatico di questa *M. pulcherrima* sul rilascio dei composti aromatici. L'inoculo sequenziale (*M. pulcherrima* e *S. cerevisiae*) è stato comparato con un controllo con solo *S. cerevisiae*. L'analisi del contenuto di tioli volatili al termine della fermen-

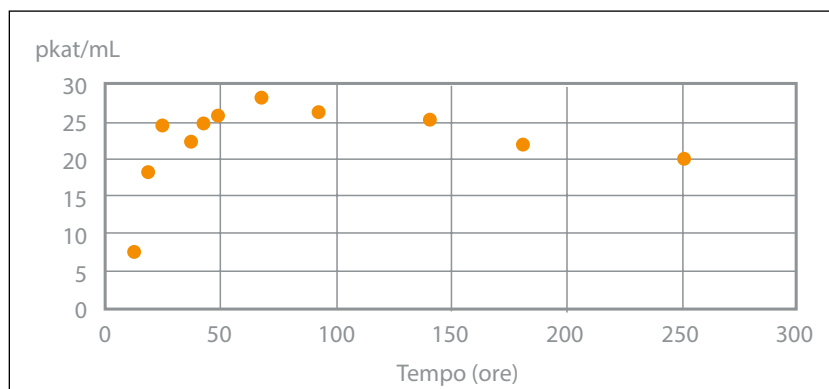


Figura 2. Attività della β-lasi di LEVEL² FLAVIA™ in fermentazione alcolica su mosto sintetico

¹: Il pico katal (pkat) equivale a 10⁻¹² Katal, l'unità di misura adottata dal Sistema Internazionale di Misura SI per esprimere l'attività catalitica degli enzimi, ovvero di quanto la velocità di una reazione risulti aumentata per la presenza del catalizzatore.

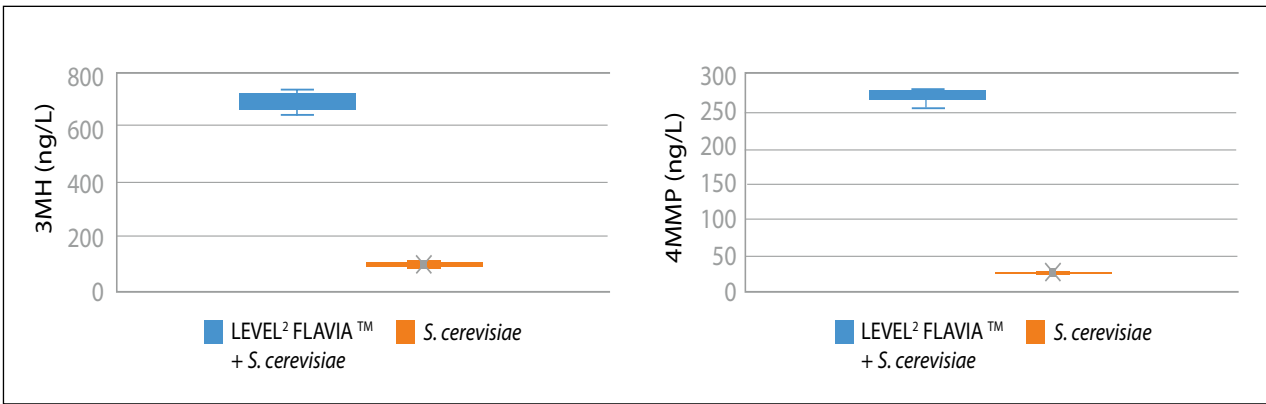


Figura 3. Impatto dell'inoculo sequenziale di LEVEL² FLAVIA™ + *S. cerevisiae* sul rilascio di 3MH e 4MMP in comparazione ad una coltura pura di *S. cerevisiae*. Le concentrazioni dei tioli sono state rilevate al 90% dell'avanzamento della fermentazione su terreno sintetico (220 g/l di zucchero, 190 mg/l di APA e 5 mg/l di fitosteroli) nelle prove eseguite in triplo

tazione alcolica ha evidenziato un maggior contenuto di 3MH e 4MMP nella tesi con *M. pulcherrima*, rispettivamente di 7 e 8,8 volte superiore, rispetto al controllo (**figura 3**). Anche per quanto riguarda il contenuto di 3MHA sono state registrate notevoli differenze: nel vino di controllo il suo contenuto è risultato inferiore alla soglia di percezione, mentre nei vini con *M. pulcherrima* è stato rilevato alla concentrazione di 7,8 ng/L. Il rilascio di tioli volatili da parte di questa *M. pulcherrima* nel corso della fermentazione è fortemente influenzato dalla disponibilità di nutrienti nel mezzo e, in particolar

modo, risulta strettamente correlato al livello di azoto prontamente assimilabile (APA). Da alcune prove eseguite su mosto sintetico aggiunto di precursori tiolici con diversi livelli di APA (da 80 a 300 mg/L) è emerso che le concentrazioni di 3MH e 4MMP aumentano all'aumentare del contenuto di azoto fino a 200 mg/L, livello al quale si riscontra il massimo rilascio, mentre tendono a diminuire oltre questa soglia. Inoltre è stato dimostrato che la formazione di 3MH è influenzata dalla disponibilità di lipidi nel mezzo (**figura 4**). Per quanto riguarda la formazione di

3MHA, nell'intervallo di concentrazioni di APA testato, il suo contenuto è aumentato in maniera lineare in funzione dell'azoto disponibile.

L'IMPORTANZA DELLA NUTRIZIONE ORGANICA

Il ceppo di *M. pulcherrima* LEVEL² FLAVIA™ è stato caratterizzato anche per le sue esigenze nutrizionali e ne è emersa una minore necessità di azoto rispetto a *S. cerevisiae*. Il monitoraggio del consumo di APA in condizioni enologiche ha rilevato che in 24 ore vi è stato un consumo di soli 23 mg/L di azoto assimilabile per poi arrivare a un massimo di

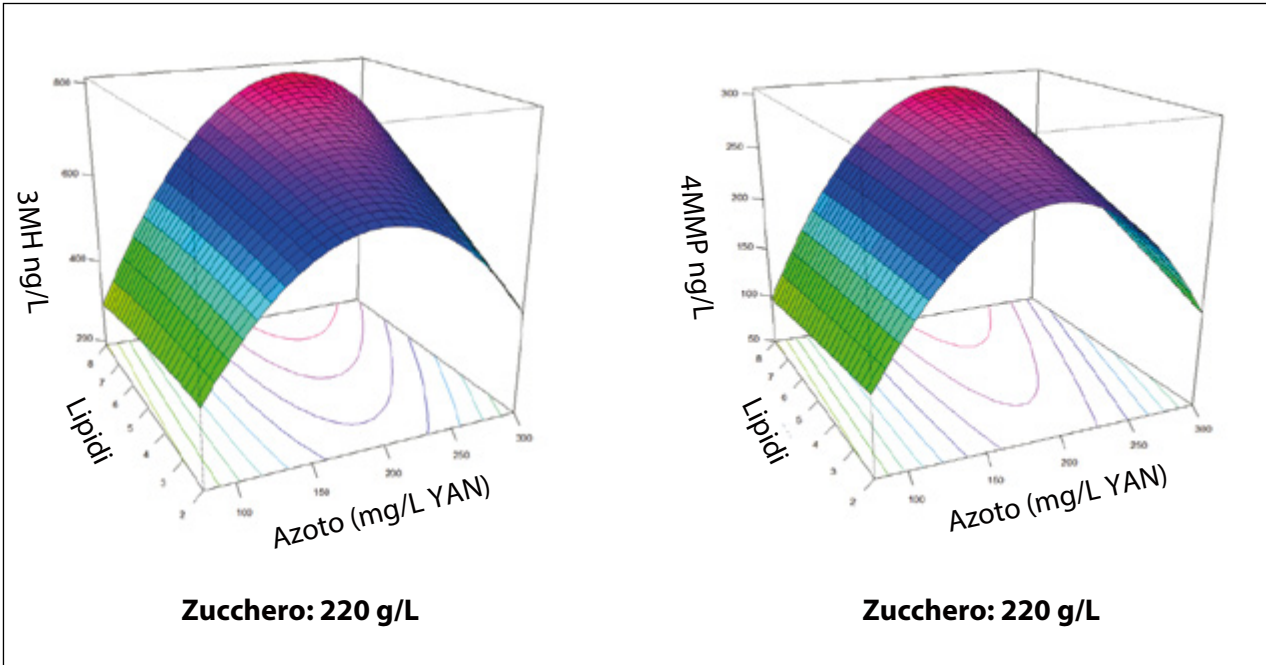


Figura 4. Impatto del contenuto di azoto nel rilascio di 3MH e 4MMP da parte del ceppo selezionato di *M. pulcherrima* LEVEL² FLAVIA™ al variare del contenuto di APA (80, 190 e 300 mg/L), e fitosteroli (2, 5 e 8 mg/L) in un mosto sintetico con contenuto di 220 g/L di zuccheri nelle prove eseguite in triplo

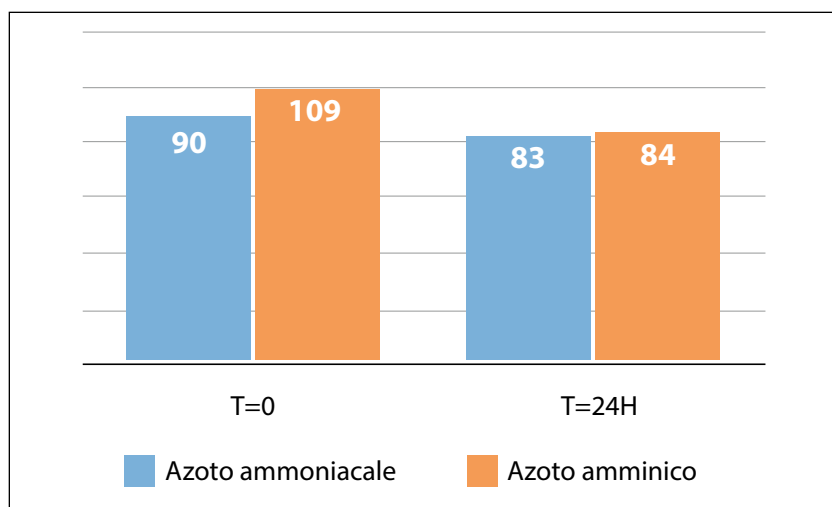


Figura 5. Evoluzione del consumo di diverse fonti di azoto nel tempo (a $T = 0$, $T = 24h$) da parte di LEVEL² FLAVIA™ (R&D Lallemend Enology, febbraio 2020)

55 mg/L dopo 72 ore. Scendendo più nel dettaglio il monitoraggio del consumo delle diverse fonti di azoto (ammoniacale e amminico) ha mostrato la preferenza del lievito non-*Saccharomyces* per l'azoto in forma organica, con un rapporto di consumo maggiore di 1:2 tra le due

fonti (7 mg/L di ammoniacale contro 25 mg/L di amminico) (figura 5).

Questo comportamento conferma la necessità di un'adeguata gestione della nutrizione nelle fermentazioni condotte con lieviti non-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* in inoculo sequenziale.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati emersi è stato possibile dimostrare il potenziale enzimatico di questa *M. pulcherrima* in riferimento alle peculiari attività di β -glucosidasi, α -arabinofuranosidasi e β -liasi che, partecipando attivamente al rilascio di terpeni, norisoprenoidi (β -damascenone) e tioli (3MH, 3MHA e 4MMP), contribuiscono positivamente all'espressione aromatica dei vini. Questi studi hanno inoltre evidenziato la variabilità nel rilascio di composti aromatici in funzione della disponibilità nutrizionale del mezzo, sottolineando l'importanza di un'adeguata strategia nutrizionale, preferibilmente organica, per garantire un'ottimale conversione dei precursori aromatici.

La bibliografia è online:

<https://bit.ly/3ny0TAp>



Soluzioni PER UN bianco originale

L'INOCULO SEQUENZIALE con lieviti non- *Saccharomyces*...

...e *Saccharomyces*



FLAVIA®
Metschnikowia pulcherrima
ceppo MP346 selezionata da USACH in Cile per la capacità di intensificare il **RILASCIO DI AROMI TERPENICI E TIOLICI** dai precursori varietali.



RHÔNE 2056®
Ceppo aromatico produttore di **ESTERI FERMENTATIVI**, ideale nelle varietà neutre. Buona espressione varietale nei **VITIGNI AROMATICI**.



CY3079®
Un grande classico per i vini **BIANCHI DI ALTA GAMMA** e affinati in legno. Alto rilascio di **POLISACCARIDI** ed esaltazione degli aromi primari.



RHÔNE 4600®
Unisce **COMPLESSITÀ AROMATICA E SICUREZZA FERMENTATIVA**. Intensa espressione di fiori bianchi, albicocca, ananas ed agrumi. Scelta di pregio anche per i **VINI ROSATI**.

Distribuiti in esclusiva per l'Italia da:

DAL CIN GILDO s.p.a.
Via 1 Maggio, 67
20863 Concoreggo (MB)
tel. 039 6049477 -
www.dalcin.com



LIEVITI
ENOLOGICI



BATTERI
ENOLOGICI



NUTRIENTI
E PROTETTORI



DERIVATI SPECIFICI
DI LIEVITO



ENZIMI



CHITOSANO



SOLUZIONI
PER IL VIGNETO

