

## I LIEVITI IBRIDI IMPIEGATI IN ENOLOGIA: L'ESEMPIO DEL CEPPO INDUSTRIALE S6U, IBRIDO NATURALE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* X *SACCHAROMYCES UVARUM*, NELLA PRODUZIONE DI VINO AMARONE DELLA VALPOLICELLA

Emanuele Tosi <sup>1</sup> e Giacomo Zapparoli <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro per la Sperimentazione in Vitivinicoltura, Provincia di Verona, Servizio Agricoltura, San Floriano, Verona;

<sup>2</sup>Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università degli Studi di Verona, Verona

### Introduzione

I ceppi di lievito utilizzati nell'industria sono organismi altamente specializzati in grado di esprimere appieno le loro potenzialità fermentative negli ambienti creati appositamente dall'uomo. Essi sono derivati da un processo di selezione, chiamato di addomesticamento, che ha plasmato il loro genoma e che è la base del loro adattamento evolutivo (Querol et al., 2003). Infatti, la notevole capacità di adattamento al processo industriale di questi ceppi deriva dall'elevato polimorfismo cromosomico e dalla notevole plasticità del loro genoma in grado di riorganizzarsi attraverso eventi mutazionali di differente tipo (riarrangiamenti cromosomici, ricombinazioni e *crossing-over* mitotici, conversioni geniche, ecc) (Codon et al., 1998; Mortimer, 2000).

I ceppi industriali di lievito utilizzati per guidare la fermentazione alcolica nelle vinificazioni appartengono quasi tutti o per la maggior parte alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. Questa specie possiede, infatti, ottime caratteristiche enologiche che la rendono ideale nell'utilizzo per la produzione industriale di vino. Pochi, invece, sono i ceppi impiegati come starter nelle vinificazioni che appartengono ad altre specie; *S.uvarum* è un parente stretto di *S.cerevisiae* e si distingue da questo, da un punto di vista enologico, per alcune importanti proprietà quali, per esempio, la vigoria fermentativa a basse temperature (Ranieri et al., 1999). In passato questa specie era classificata come razza fisiologica di *S. cerevisiae* e, successivamente, è stata inclusa nel taxon *S. bayanus* (Kurtzman e Fell, 1998). Solo recentemente, i tassonomi hanno riproposto la reintroduzione di *S.uvarum* come specie a se stante per i suoi caratteri genomici che la distinguono dalle specie *S.bayanus* e *S.cerevisiae* (Nguyen e Gaillardin, 2005).

Tra le specie del genere *Saccharomyces* si possono costituire degli ibridi ed è stato dimostrato che questo evento rappresenta una modalità di evoluzione dei lieviti. Sebbene si generino organismi sterili, a seguito di incompatibilità genomica, l'ibridazione interspecifica è l'origine di cellule allopoliploidi, dotate cioè di due o più *sets* di cromosomi di entrambe le specie parentali (Greig et al., 2002). L'ibridazione interspecifica può essere anche indotta in laboratorio e Sebastiani et al. (2002) hanno dimostrato che è possibile ottenere ibridi *S. cerevisiae* x *S. bayanus* allotetraploidi fertili in grado di originare progenie stabile. La poliploidia favorisce l'adattamento a specifiche condizioni offrendo anche vantaggi derivati dall'acquisizione di caratteri intermedi alle due specie coinvolte nell'ibridazione. Per esempio la speciazione di *S.pastorianus* è il risultato di una ibridazione naturale tra ceppi *S.cerevisiae* e *S.uvarum* o altre di specie parentali, come così l'origine di alcuni ceppi isolati da vino. Tra quest'ultimi si annovera l'S6U, isolato e selezionato dall'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Velletri (Ciolfi, 1994), diventato poi un ceppo industriale prodotto dalla ditta Lallemand (Lallemand Inc., Canada) e commercializzato per le industrie enologiche.

Sebbene inizialmente questo ceppo fosse stato ascritto alla specie *S.cerevisiae* razza fisiologica *uvarum*, riconosciuta poi come specie *S.uvarum* come detto precedentemente, le analisi del genoma hanno evidenziato come in realtà è un allotetraploide capace di produrre spore diploidi vitali (per circa il 100%), dotate ciascuna di essa dei due *sets* di cromosomi delle specie parentali (Johnston et al., 2000). Come per altri ibridi, il ceppo S6U presenta caratteristiche enologiche intermedie tra le due specie parentali offrendo prestazioni, soprattutto in certe particolari condizioni di vinificazione, spesso migliori di quanto si possano ottenere se si impiegassero ceppi appartenenti alle specie parentali. I numerosi studi condotti su questi ibridi sperimentati in differenti processi di vinificazione hanno confermato come il loro comportamento sia intermedio per quanto

riguarda le principali proprietà tecnologiche di *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (Zambonelli et al., 1997; Reynolds et al., 2001; Giudici et al., 2005).

### **Il ceppo industriale S6U nella vinificazione**

Il ceppo S6U viene presentato, nelle schede tecniche delle ditte che lo commercializzano, come lievito capace di condurre la fermentazione alcolica a basse temperature, di possedere come caratteristica principale alte rese in glicerolo, di non degradare l'acido malico, di produrre bassa concentrazione di acido acetico e, per quanto riguarda i caratteri organolettici, di esaltare i vini con profumi speziati e floreali (per la produzione di elevate concentrazioni di 2-feniletanolo), oltre che dare corposità e rotondità (per la maggiore resa in glicerolo) al vino. Questo ceppo è consigliato per la vinificazione di vini rossi da invecchiamento ma anche per produrre vini bianchi corposi. Per le caratteristiche presentate il ceppo S6U può essere idoneo per guidare la fermentazione alcolica di mosti derivati da uve appassite e quindi per la produzione di vini cosiddetti "passiti".

Nella produzione di questi particolari vini il processo di vinificazione può presentare delle difficoltà principalmente a causa della elevata concentrazione zuccherina che mediamente è presente nei mosti, oltre che dalla bassa temperatura che caratterizza il periodo coincidente con l'ammostatura delle uve. Inoltre, dato l'elevato valore economico che riserva questa vinificazione, devono essere garantiti buoni parametri qualitativi. E' questo il caso della vinificazione di uve appassite per la produzione dei vini Recioto e Amarone della Valpolicella e infatti, il ceppo S6U è tra quelli che viene preferito da diversi produttori di questi vini (comunicazione personale).

### **Il ceppo S6U nella produzione di vino Amarone della Valpolicella**

Da diversi anni il ceppo S6U viene impiegato presso il Centro Sperimentale di Vitivinicoltura della Provincia di Verona come ceppo di confronto per le vinificazioni sperimentali di uve appassite. I dati raccolti nel corso delle sperimentazioni riguardanti la produzione di vino Amarone hanno permesso di valutare le sue capacità e attitudini a condurre la fermentazione alcolica a partire da mosti ottenuti da uvaggi tipici della Valpolicella con uve sottoposte a surmaturazione secondo le modalità previste dal Disciplinare (Malacrinò et al., 2005a; Malacrinò et al., 2005b). Di seguito viene riportata una descrizione dei principali caratteri enologici che si sono evidenziati dal confronto tra il ceppo S6U e altri ceppi industriali appartenenti delle due specie parentali. Le figure qui riportate si riferiscono ad una sperimentazione condotta nel 2004, presa a titolo di esempio, nella quale sono stati confrontati il ceppo S6U e due ceppi industriali delle specie *S. cerevisiae* e *S. uvarum*.

Il ceppo S6U mostra, come alcuni altri ceppi commerciali della specie *S. cerevisiae*, rapidità di attivazione in presenza di gradi zuccherini superiori a 300 g/L dove la pressione osmotica può rappresentare un fattore di stress in grado di influenzare negativamente l'importante fase di adattamento delle cellule reidratate. Dopo pochi giorni dall'inoculo (generalmente da 2 a 6 giorni a seconda delle condizioni ambientali) nella massa vinaria la popolazione cellulare, superata la fase di adattamento, inizia ad incrementare e, nello stesso tempo, inizia il consumo degli zuccheri e la concomitante produzione di etanolo.

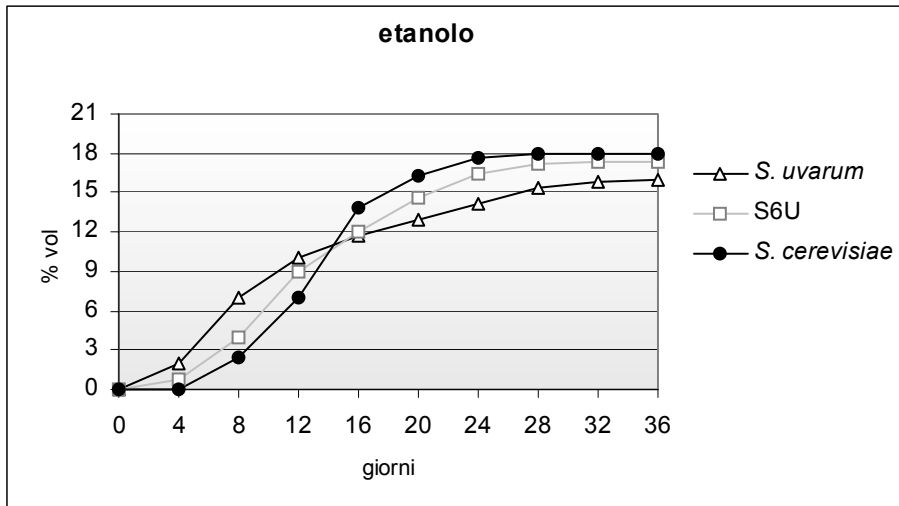


Figura 1. Andamento della produzione di etanolo misurata durante la fermentazione di uva appassita condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U. La temperatura della cantina era di 11-14°C.

In presenza di basse temperature (<14°C), si è osservato che il ceppo S6U tende ad anticipare l'inizio della fermentazione rispetto a ceppi *S. cerevisiae* e la produzione di etanolo nelle vasche inoculate da questo ceppo segue generalmente un andamento intermedio rispetto a quelle inoculate con ceppi appartenenti alla specie parentali, raggiungendo una resa vicina a quella di *S. cerevisiae* e superiore a quella di *S. uvarum* (Figura 1). Nelle fasi iniziali della fermentazione quando la massa vinaria ha una temperatura ancora bassa, la velocità di consumo degli zuccheri è più elevata per S6U rispetto a *S. cerevisiae*.

Successivamente, con il progressivo aumento della temperatura nel mosto in fermentazione la maggiore vigoria di quest'ultima specie porta ad una più rapida conversione di zuccheri anticipando così il completo sviluppo di etanolo, soprattutto rispetto a *S. uvarum*. In sintesi, il profilo cinetico di S6U offre i vantaggi di un buon avvio della fermentazione alle basse temperature (paragonabile a *S. uvarum*), uniti ad un decorso fermentativo rapido ed una resa in alcol elevata (paragonabile a *S. cerevisiae*).

Nelle fermentazioni condotte a temperature più alte (15-18°C) il ceppo S6U invece si comporta in modo del tutto analogo ad altri ceppi commerciali *S. cerevisiae* utilizzati nelle stesse condizioni. Il potere alcoligeno e la resa in etanolo sono elevati, tanto che in esperienze maturate presso il Centro Sperimentale, si è potuto constatare come questo ceppo sia in grado di portare a "secco" senza difficoltà mosti con concentrazioni zuccherine molto elevate (280-300 g/L), qualora sussistano normali condizioni di vinificazione (temperatura di cantina favorevole, buono stato sanitario delle uve, buona condizione nutrizionale del mosto, ecc.).

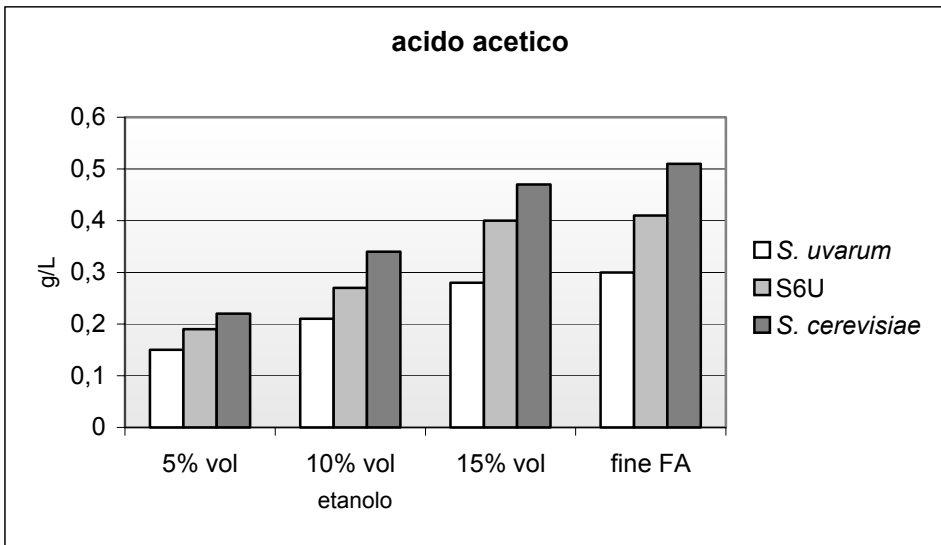


Figura 2. Concentrazione di acido acetico misurata a 5, 10 e 15% vol di etanolo sviluppato e a fine fermentazione alcolica (FA) condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U.

Circa la produzione degli altri principali metaboliti della fermentazione alcolica, quali l'acido acetico e il glicerolo, si è rilevato, anche in questo caso, da parte del lievito S6U una capacità di produzione intermedia rispetto alle due specie parentali. È risaputo che *S. uvarum* è particolarmente apprezzato per la sua capacità di produrre basse concentrazioni di acidità volatile e nelle fermentazioni di mosto ad alta concentrazione zuccherina questo importante parametro di qualità può raggiungere livelli eccessivi a causa dello stress osmotico che le cellule subiscono nella fase iniziale della fermentazione. Generalmente nella vinificazione di Amarone i ceppi di questa specie producono concentrazioni più basse (di 0,2-0,4 g/L) (Figura 2). In Amarone il contenuto in acidità volatile può facilmente superare 0,5 g/L fino ad arrivare a 1 g/L e oltre, pur non dando la percezione di spunto acetico a livello olfattivo. Infatti, da un punto vista organolettico, lo spunto acetico è principalmente legato alla presenza di acetato di etile, e la sua percezione dipende anche, più in generale, dalle caratteristiche chimico-fisiche del vino. Precedenti esperienze hanno evidenziato che non esiste una stretta correlazione positiva tra la produzione di acido acetico e di acetato di etile da parte dello stesso ceppo di lievito. Bovo et al. (2005) hanno riscontrato concentrazioni di 85 mg/L in vino Amarone fermentato da *S. uvarum* contro 50 mg/L fermentati da *S. cerevisiae* e da un ibrido *S. cerevisiae* x *S. uvarum*, quando la concentrazione di acido acetico è risultata di 0,2 e 0,4 g/L, rispettivamente.

Il ceppo S6U ha una resa in glicerolo intermedia tra le due specie parentali arrivando a produrre mediamente 1-2 g/L in più rispetto a *S. cerevisiae* (Figura 3).

*S. uvarum* ha una tendenza a produrre una quantità maggiore di acetaldeide rispetto a *S. cerevisiae* e al ceppo S6U, e la sua presenza è generalmente, sopra una certa soglia, poco gradita perché incide negativamente sul *bouquet* del vino. L'aroma del vino Amarone non sembra risentire in senso negativo di concentrazioni pari a 50-60 mg/L, valori di acetaldeide, questi, tra i più alti riscontrati nel corso di diverse sperimentazioni.

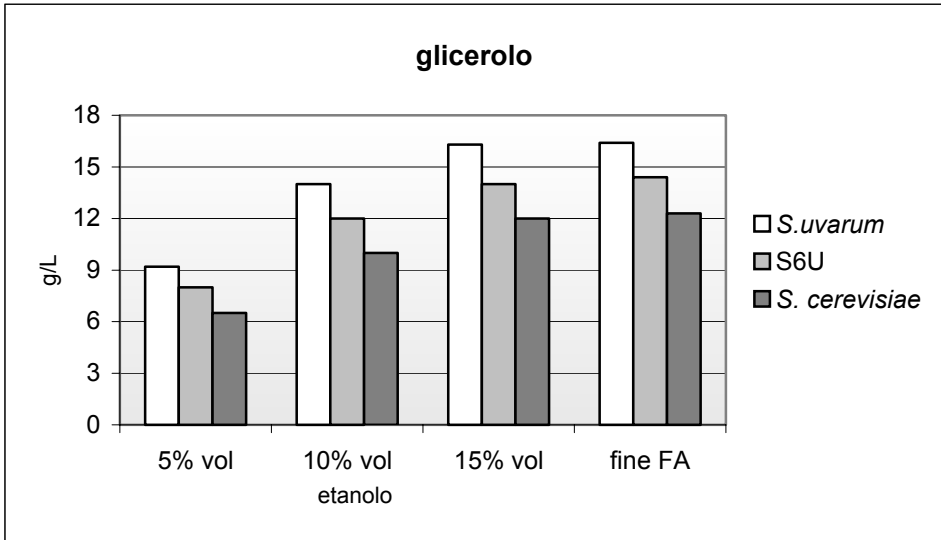


Figura 3. Concentrazione di glicerolo misurata a 5, 10 e 15% vol di etanolo sviluppato e a fine fermentazione alcolica (FA) condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U.

Per quanto riguarda la produzione di alcuni metaboliti che contribuiscono alla costituzione dell'aroma, come quelli derivati dal catabolismo amminoacidico, l'Amarone ha mediamente un contenuto totale di alcoli superiori variabile tra 300 e 600 mg/L e anche in questo caso non si sono evidenziati comportamenti significativamente diversi tra i ceppi sperimentati delle specie *S. uvarum* e *S. cerevisiae* oltre che del ceppo ibrido S6U. Tuttavia, nel caso del 2-feniletanolo, un composto che contribuisce al carattere aromatico con la nota di "rosa", il suo contenuto in vino sembra essere in relazione alla specie che ha condotto la fermentazione alcolica. Anche per la produzione di questo importante metabolita, il ceppo S6U si colloca nella posizione intermedia tra le due specie parentali (Figura 4).

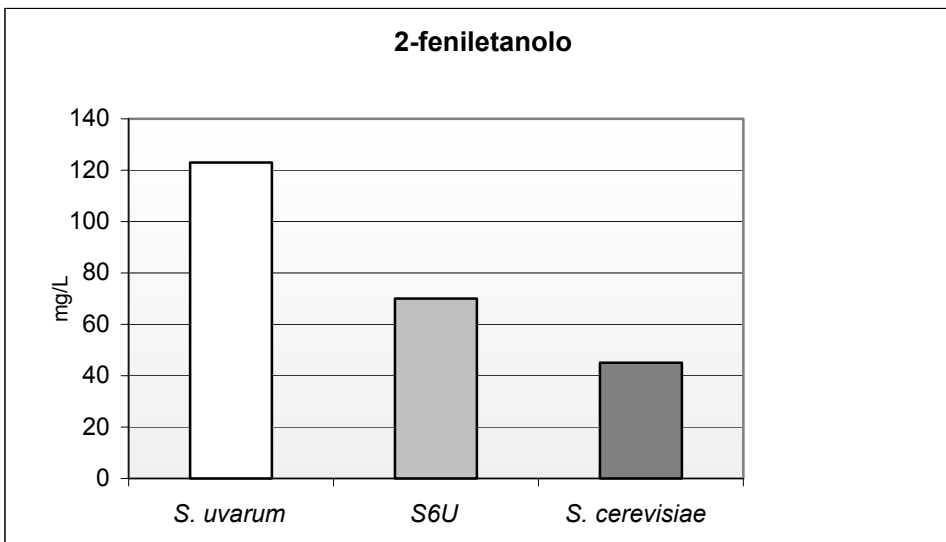


Figura 4. Concentrazione di 2-feniletanolo a fine fermentazione alcolica (FA) condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U.

Sull'acido malico il ceppo S6U sembra avere una debole capacità degradativa, osservata anche per altri ceppi delle due specie parentali, che può essere quantificata in termini di riduzione del 10-20% rispetto a quanto presente nel mosto, che mediamente varia da 0,5 a 2,5 g/L.

Per quanto riguarda il contributo del lievito al profilo aromatico del vino, in vinificazioni sperimentali, con i limiti derivati principalmente dall'impiego di volumi e di modalità di lavorazione distanti da quelle che generalmente caratterizzano i processi industriali, il ceppo S6U rispetto ad altri ceppi confrontati a parità di condizioni di sperimentazione mostra una tendenza ad esaltare le note "fruttate" e soprattutto "floreali" del vino Amarone. Queste sono osservazioni basate su un approccio di valutazione per lo più empirico e siamo consapevoli della necessità di ricorrere all'impiego di metodi rigorosi e professionali affinché il giudizio di questo lievito su base organolettica possa assumere anche una valenza scientifica. Tuttavia, il profilo sensoriale del vino Amarone è caratteristico e peculiare (Ubigli et al., 2000), e come per molti altri vini, la complessità aromatica dipende da numerosi fattori più o meno controllabili dal produttore, *in primis* dalla composizione dell'uvaggio. Dalla nostra esperienza, il confronto di buoni ceppi con caratteristiche generali simili, in sede di panel test, risente molto delle condizioni sperimentali adottate allo scopo e ne consegue che la classificazione di un ceppo sulla base del suo contributo a specifici caratteri aromatici del vino non è sempre generalizzabile e trasferibile ad altre condizioni di cantina.

## Conclusioni

Il ceppo S6U è idoneo a condurre fermentazioni alcoliche di mosti ad alte concentrazioni zuccherine per la produzione di vini passiti come l'Amarone della Valpolicella. Il carattere ibrido osservato in riferimento ai principali caratteri enologici possono garantire *performances* fermentative e standard qualitativi che non potrebbero essere raggiunti nelle stesse condizioni di vinificazione con l'impiego di ceppi appartenenti alle due specie parentali. Il buon potere alcoligeno che consente di portare a "secco" il vino a 17-18 % vol di etanolo e la concomitante buona resa in glicerolo rappresentano forse i più importanti tratti caratterizzanti il ceppo S6U che lo rende, così, specifico rispetto ad altri ceppi di *S. cerevisiae* e *S. uvarum*. La migliore capacità fermentativa a basse temperature del ceppo S6U rispetto a ceppi *S. cerevisiae* (anche se molti di essi sono in grado di avviare la fermentazione a temperature di circa 10-12°C) può essere di interesse in processi di vinificazione sprovvisti di adeguati sistemi di termoregolazione dei locali o delle vasche di fermentazione, come in realtà produttive di piccole dimensioni.

In commercio è oramai disponibile un'ampia gamma di lieviti in grado di soddisfare la maggior parte delle esigenze dei produttori. Se da un punto di vista tecnologico la scelta del ceppo S6U può essere giustificata sulla base di specifiche necessità di produzione, come quelle richieste per il vino Amarone, in riferimento al suo contributo al *bouquet* del vino la preferenza da parte del produttore per questo ceppo piuttosto che per un altro può essere sostanzialmente soggettiva.

Infine, non si può dimenticare che la tecnologia di ibridazione offre la possibilità di ottenere ceppi ibridi interspecifici e intraspecifici dotati di tratti enologici dei due ceppi parentali in comune facendo in laboratorio (*yeast breeding*) quello che ha fatto la natura per l'S6U (van Rensburg, 2005).

## Bibliografia

- Bovo E, Mosconi R, Tosi E (2005) *Enoforum* 2005, Piacenza 21-23 Marzo 2005  
 Ciolfi G (1994) *L'Enotecnico*: 71-50  
 Codon AC, Benitez T, Korhola M (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 154-163  
 Giudici P, Solieri L, Pulvirenti A, Raineri S, Caggia C (2005) *Enoforum* 2005, Piacenza 21-23 Marzo 2005  
 Greig D, Louis EJ, Borts RH, Travisano M (2002) *Science* 298: 1773-1775  
 Johnston JR, Baccari C, Mortimer RK (2000) *Res. Microbiol.* 151: 583-590  
 Kurtzman CP, Fell JW (1998) *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*  
 Malacrinò P, Tosi E, Caramia G, Prisco R, Zapparoli G (2005a) *Lett. Appl. Microbiol.*  
 Malacrinò P, Tosi E, Zapparoli G (2005b) *Inf. Agr.* 4: 81-83  
 Mortimer RK (2000) *Genome Res.* 10: 403-409  
 Nguyen H-V, Gaillardin C (2005) *FEMS Yeast Res.* 5: 471-483  
 Querol A, Fernandez-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. (2003) *Int. J. Food Microbiol.* 86:3-10

- Ranieri S, Zambonelli C, Hallsworth JE, Pulvirenti A, Giudici P (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 177-185  
Reynolds AG, Edwards CG, Cliff MA, Thornagate JH, Marr JC (2001) *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 336-344  
Sebastiani F, Barberi C, Canalone E, Cavalieri D, Polsinelli M (2002) *Res. Microbiol.* 153: 53-58  
Ubigli M, Cravero MC, Bosso A (2000) *Camera di Commercio di Industria Artigianato ed Agricoltura Verona*  
Van Rensburg P (2005) *Aus. N. Zel Grapegrower Winemak.* 2: 56-60  
Zambonelli C, Passarelli P, Ranieri S, Bertolini L (1997) *J. Sci. Food Agric.* 74: 7-12