

PRINCIPALI LIEVITI DI IMPORTANZA ENOLOGICA

Enrico Vaudano

Nell'ambito enologico i microrganismi ricoprono un ruolo indispensabile essendo i primi attori nella trasformazione dell'uva in vino. In particolare i **lieviti**, funghi unicellulari, sono i responsabili della fermentazione alcolica, mentre i **batteri lattici** portano a termine la fermentazione malolattica, con la trasformazione dell'acido malico dell'uva in acido lattico, passaggio d'importanza fondamentale sia per quanto riguarda l'aspetto organolettico, sia per l'ottenimento di un prodotto stabile dal punto di vista microbiologico. Oltre a questo ruolo, negli ultimi anni è stata chiarita l'influenza che i microrganismi possono avere, nella loro naturale **variabilità metabolica**, sulle caratteristiche organolettiche del vino. Attraverso un'azione diretta su numerose classi di molecole presenti nell'uva e la produzione di molecole derivanti dal proprio metabolismo, essi generano tutta una serie di composti che, insieme ai prodotti principali della fermentazione, caratterizzano il vino con un'influenza dipendente dalla specie microbica o addirittura dal ceppo. Fin dalla definitiva conferma del ruolo dei microrganismi come responsabili della fermentazione alcolica ad opera di Pasteur, è emerso

chiaramente il ruolo predominante di un gruppo di specie appartenenti al genere **Saccharomyces**. In particolare alcune specie di questo genere (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* e poche altre) risultano le uniche in grado di completare la fermentazione del mosto, esaurendo gli zuccheri residui, esibendo cioè un potere fermentativo superiore a 10%, talvolta anche a 18% e producendo in misura accettabile **composti secondari** considerati dannosi per la qualità dei vini, primo fra tutti l'**acido acetico**.

Ma il microcosmo del vino è più complesso. Durante una vinificazione spontanea nell'ambiente mosto vino sono presenti diverse specie che, trasportate in cantina dal vigneto in quantità significative, si alternano o si sovrappongono durante la fermentazione. In alcuni casi ed in determinati momenti del processo produttivo del vino, alcuni di questi microrganismi possono rappresentare un pericolo per la qualità, determinando problemi di tipo tecnologico o anomalie sensoriali. Riveste quindi particolare importanza la capacità di riconoscimento delle diverse specie presenti. Accanto alle moderne tecniche basate sull'**analisi del DNA** sono ancora importanti i classici saggi

di riconoscimento basati sull'osservazione microscopica e morfologica delle colonie cresciute su particolari terreni solidi.

In questo approfondimento presentiamo le caratteristiche microscopiche e morfologiche delle principali specie di lievito riscontrabili nelle fermentazioni enologiche. I lieviti ed il relativo **materiale fotografico** presentato provengono dalla **Collezione** presente presso il Consiglio per la ricerca in Agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (**CREA**)-**Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti**, una delle maggiori collezioni italiane di interesse prettamente enologico. Costituita a partire dagli anni '70 del secolo scorso, ad oggi la collezione conta oltre 1500 isolati (ceppi conservati come coltura pura) di lieviti e 280 isolati di batteri lattici raccolti in ambito enologico durante fermentazioni alcoliche e malolattiche, in vigneti o ambienti di cantina di varie zone viticole.

La stessa collezione è corredata da una raccolta di DNA estratti da tutte le accessioni e risulta un importante punto di riferimento per studi di microbiologia, oltre a rappresentare il database di confronto per il riconoscimento di lieviti contaminanti.

Nelle pagine seguenti si trovano descritte le prevalenti forme di lievito di importanza enologica. Nella foto principale sono rappresentate le colonie ottenute mediante isolamento in scatola Petri e moltiplicazione su substrato di coltura WL (Wallerstein Laboratory) per 7 gg a 25 °C.

Il particolare che arricchisce ciascuna immagine invece, evidenzia le cellule osservabili direttamente nei vini contaminati.

Per tutte le immagini si è voluto mantenere il medesimo ingrandimento in modo da evidenziare le differenze di forma e dimensione facilitandone il riconoscimento. Come indicato nell'immagine a dx la linea nera rappresenta una lunghezza di 10 µm, che si mantiene costante in tutti i riquadri seguenti.

Queste pagine rappresentano, per tanto, un aiuto pratico per l'enologo che utilizza il microscopio. Tale strumento riteniamo sia di estrema necessità in cantina, per quanto a volte sottovalutato preferendo le più agevoli ed immediate analisi chimiche. Queste però hanno sempre il difetto di offrire il risultato di qualcosa già avvenuto e impossibile da arginare. Il microscopio invece può identificare processi microbici in divenire, consentendo all'enologo attento di agire d'anticipo rispetto a possibili, indesiderate, alterazioni microbiche.

LEGENDA

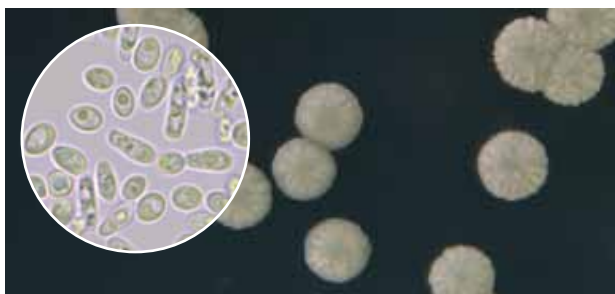
- Elementi per l'identificazione
- ✓ Importanza enologica



***Pichia membranaefaciens* - (Pichiaceae)**

- Cellule ovoidali o allungate dim. 1,8-4,5 x 2,5-17 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: molto grande, verde grigio chiaro, superficie rugosa arborescente-rizoide, consistenza farinosa, margine lobato.

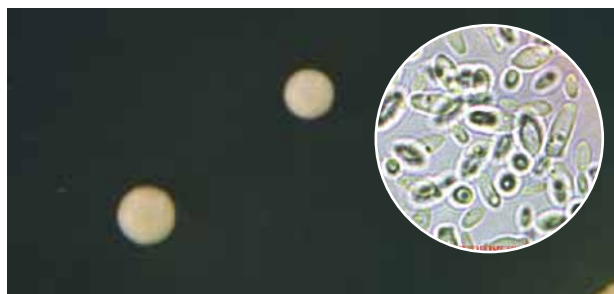
✓ Associata ad alcune specie di *Candida* produce la fioretta nei contenitori scolmi, lievito a metabolismo ossidativo ossida l'etanolo producendo alte concentrazioni di etil acetato e acetaldeide alterando le caratteristiche sensoriali nei vini. Forma sporigena di *Candida valida*.



Candida vini (Kregervanrija fluxuum) - (Pichiacee)

- Cellule ovoidali o allungate 2-6 x 3,5-11 µm, riproduzione sessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL: bianca consistenza burrosa, superficie rugosa, margine irregolare.

✓ Specie contaminante, insieme a Pichia membranifaciens può creare un velo (fioretta) nei recipienti scolmi con produzione di etil acetato ed acetaldeide importanti.



Brettanomyces bruxellensis - (Pichiacee)

- Cellule ovoidali, ellissoidali, ogivali o cilindriche dim. 2-7x 3-28 µm, riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL: piccole bianche a crescita lenta, lucide, margine intero, consistenza cremosa.

✓ La presenza di fenolo 4-etil fenolo e 4 etil guaiacolo (fenoli volatili, carattere Brett) viene usata come misura della contaminazione da Brettanomyces/Dekkera (forma asporigena/sporigena della stessa specie). Si forma a partire da composti fenolici dei vini grazie a due enzimi cinnamato-decarbossilasi e vinilfenolo-reduttasi. Tra i difetti aromatici generati odori medicinali (cerotto), animali (sudore di cavallo, animale bagnato, cuoio bagnato) e gli aromi di chiodi di garofano.



Candida guillermondi (ora Meyerozyma guillermondi) - (Debaryomycetacee)

- Cellule ovoidali o allungate di dim. 1,5-5 x 2-15 µm, riproduzione sessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL: bianco latte, consistenza cremosa, lucida, margine intero.

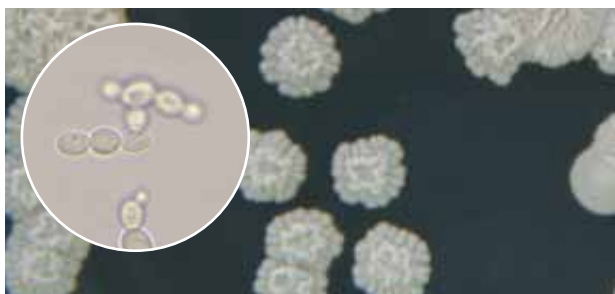
✓ Può portare alla formazione di un film superficiale che appare come una schiuma di aspetto simile al formaggio. Può provocare concentrazioni deleterie di acetato di etile.



Debaryomyces hansenii - (Debaryomycetacee)

- Cellule sferiche ovoidali 2-7 x 2-9 µm, riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL: colonia grande bianco latte, lucida, margine liscio, burrosa.

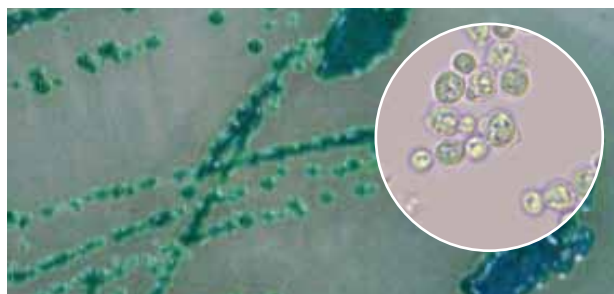
✓ Normale componente dell'habitat uva-vino. Produce alti livelli di β-glucosidasi, aumentando la concentrazione di monoterpenoli nel vino, soprattutto linalolo. Criotollerante.



Pichia carsonii (ora Priceomyces carsonii) - (Debaryomycetacee)

- Cellule sferiche o allungate dim. 1,4-4,5 x 2-6 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grande, bianca avorio, superficie rugosa arborescente, consistenza burrosa, margine dentellato.

✓ Ricontrata raramente, di scarso interesse enologico forma film e produce composti volatili negativi in presenza di ossigeno ossidando l'etanolo.



Candida stellata - (Debaryomycetacee)

- Cellule globose o ovoidali dim. 4-5x 4-6 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione oblastica. Colonia su terreno WL: piccola verde brillante lucida, margine intero, alone verde chiaro.

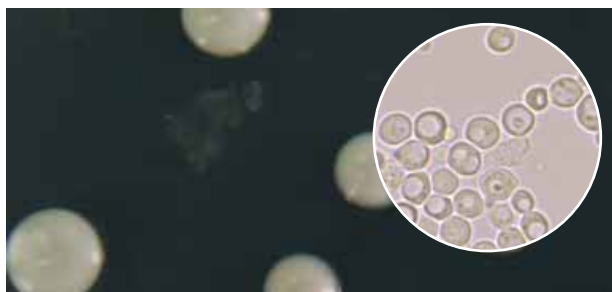
✓ Tipicamente associata all'inizio delle fermentazioni spontanee può essere presente fino a fermentazione inoltrata. Presente nei mosti mantenuti a bassa temperatura, è fruttosofila e produttrice di buone quantità di glicerolo, può formare film.



***Torulaspora delbrueckii* - (Saccharomycetaceae)**

- Cellula globosa o ellissoidale dim. 2-6 x 3-7 μm . Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grande dimensione, bianca avorio, superficie liscia, lucida, consistenza burrosa, elevata, margine intero grigio chiaro.

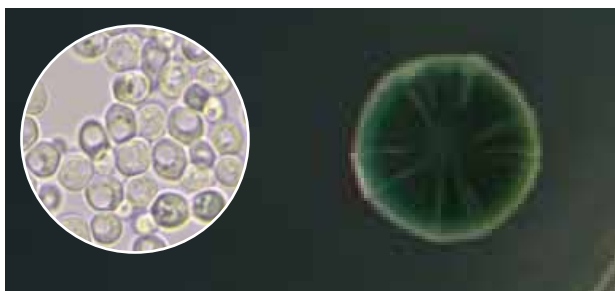
✓ Ha ottime caratteristiche enologiche, presente nella comune microflora del vino ha un buon potere alcoligeno, una ridotta produzione di acidità volatile, viene usato nelle fermentazioni sequenziali o in mix con *Saccharomyces*. In commercio sono presenti alcuni ceppi in forma secca attiva.



***Zygosaccharomyces florentinus* (ora *Zygotorulaspora florentina*) - (Saccharomycetaceae)**

- Cellule globose o ovoidali dim. 2-7 x 2,5-7 μm . Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: media dimensione, bianco latte, elevata, superficie liscia, lucida, consistenza burrosa, margine intero.

✓ Più raramente presente nella microflora viticolo-enologica ha discrete capacità fermentative con fruttifilia. È osmotollerante.



***Kluveromyces thermotolerans* (ora *Lachancea thermotolerans*) - (Saccharomycetaceae)**

- Cellule globose o ellissoidali dim. 3-6 x 6-8 μm . Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grande verde lucida con striature chiare margine liscio.

✓ Rientra nella comune microflora viticolo-enologica all'inizio di molte fermentazioni prima che *Saccharomyces* predomini. I vini ottenuti per fermentazione da *Kluveromyces* sono interessanti per le caratteristiche sensoriali gustative grazie alla produzione di acido lattico. Può ridurre l'acidità volatile e liberare monoterpenoli. È presente in alcuni preparati di lieviti commerciali.



***Saccharomyces exiguus* (ora *Kazachstania exigua*) - (Saccharomycetaceae)**

- Cellule globose, ellissoidali o allungate 2,5-5x3,5-6,5 μm s, riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL: grande, bianco crema, consistenza burrosa con striature chiare, margine liscio.

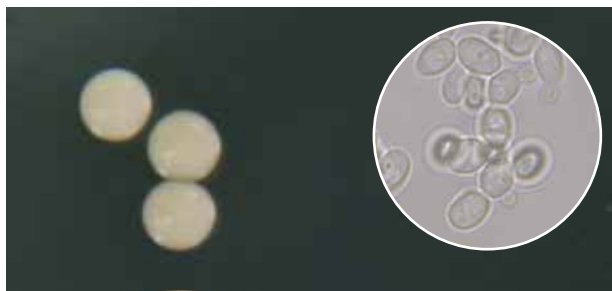
✓ Nota ora come *Kazachstania exigua*, si ritrova sulla superficie dell' uva e più raramente nel vino, produce grandi quantità di glicerolo associate ad acido acetico. Possiede alcune capacità enzimatiche interessanti verso precursori di origine carotenoidea che possono sviluppare aromi positivi.



***Zygosaccharomyces bailii* - (Saccharomycetaceae)**

- Cellule globose o ellissoidali dim. 3-9 x 3-13 μm . Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: media dimensione, verde con centro più chiaro, elevata, superficie liscia, lucida, consistenza burrosa, margine intero verde scuro.

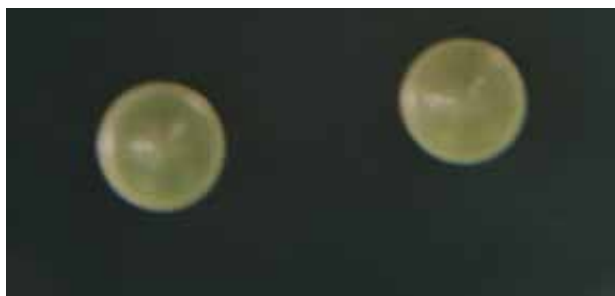
✓ Presente nella comune microflora ha buone capacità fermentative con spiccata fruttifilia. È osmotollerante. Si può utilizzare in fermentazioni scalari. Resiste a SO₂ e alte concentrazioni di etanolo. Può essere contaminante nei vini anche molto alcolici con residuo zuccherino.



***Zygosaccharomyces bisporus* - (Saccharomycetaceae)**

- Cellule globose o ellissoidali dim. 2-5 x 3-9 μm . Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: media dimensione, bianco crema, elevata a goccia, superficie liscia, lucida, consistenza burrosa, margine intero.

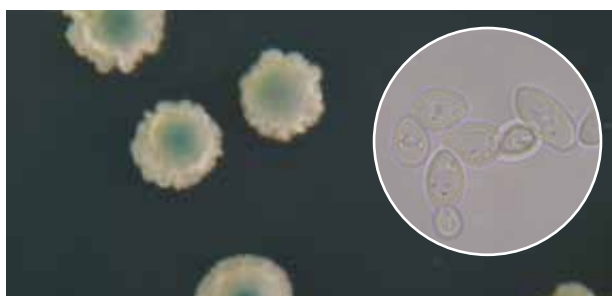
✓ Presenti nella comune microflora hanno buone capacità fermentative con spiccata fruttifilia. Come le altre specie co-generiche sono osmotolleranti. Non fermenta saccarosio. Si possono utilizzare in fermentazioni scalari.



Saccharomyces cerevisiae - (Saccharomycetaceae)

- Cellule globose, ovoidali o allungate dim. 3-8 x 5-10 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grandi dimensioni, verde chiaro con bordo grigio verde, superficie liscia, lucida, consistenza burrosa, margine intero.

✓ È il protagonista della FA nel vino. In genere è parte della microflora dell'uva (anche se in ridottissima %) mentre il suo habitat d'elezione è la cantina. È stato il primo lievito ad avere il suo intero genoma sequenziato. Ha un'alta tolleranza alla SO₂ e all'etanolo. Non cresce su agar lisina (caratteristica del genere *Saccharomyces*). Esistono centinaia di ceppi in commercio con diverse caratteristiche tecnologiche.



Saccharomyces bayanus - (Saccharomycetaceae)

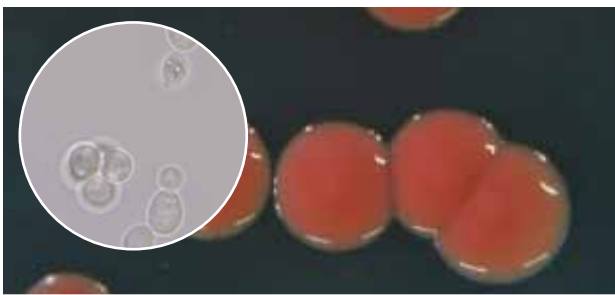
- Cellule globose, ovoidali o allungate dim. 2,5-6 x 3,5-10 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grandi dimensioni, verde intenso con bordo grigio verde, superficie rugosa, consistenza burrosa, margine lobato.

✓ Dal punto di vista tassonomico è una specie separata da *S. cerevisiae* da cui è distinguibile per essere meno efficiente o non fermentare il galattosio, non crescere a 37 °C e produrre quantità inferiori di acido acetico. Suddiviso in due varietà *uvarum* e *bayanus*, ibrido tra var. *uvarum* e *S. cerevisiae*. È coinvolto nella fermentazione alcolica con un optimum di temperatura inferiore a *S. cerevisiae*.



Saccharomyces cerevisiae è il microrganismo responsabile di alcune tra le più importanti trasformazioni di tipo fermentativo in ambito alimentare, quali la **vinificazione**, la produzione della **birra** e la lievitazione del **pane**. Per tale motivo abbiamo voluto riservare nel testo un "ingrandimento particolare". L'immagine a fianco mostra cellule in fase di sporulazione indicate dalla freccia in rosso.

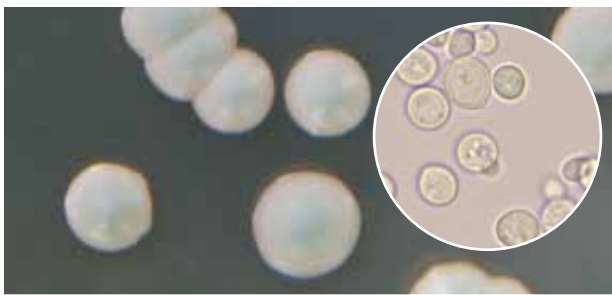
Questo microrganismo non solo determina le caratteristiche principali del prodotto fermentato attraverso la **sintesi di metaboliti primari** quali etanolo o anidride carbonica, ma concorre a definire parte delle caratteristiche qualitative, influenzando soprattutto l'**aspetto sensoriale olfattivo**. *Saccharomyces cerevisiae* è, infatti, in grado di generare, durante i processi fermentativi, centinaia di composti volatili la cui abbondanza sia qualitativa che quantitativa è dipendente dal ceppo utilizzato grazie alla naturale **biodiversità** metabolica presente all'interno della specie. Nella fermentazione del vino, ormai da decenni, questa naturale variabilità è stata sfruttata offrendo sul mercato diversi ceppi di *S. cerevisiae* selezionati aventi diverse caratteristiche metaboliche e fisiologiche, proposti sul mercato generalmente in forma di Lievito Secco Attivo (**LSA**). Le tecniche microbiologiche di discriminazione basate sull'analisi del DNA oggi permettono non solo l'identificazione della specie, ma anche la distinzione di diversi ceppi nell'ambito della specie *S. cerevisiae*.



Rhodotorula mucilaginosa - (Sporidiobolaceae)

- Cellule ellissoidali o sub-globose dim. 1,5-4 x 4-12 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione più frequentemente polare. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: grandi dimensioni, rosso, elevate, superficie lucida, a consistenza burrosa, margine intero grigio-bruno.

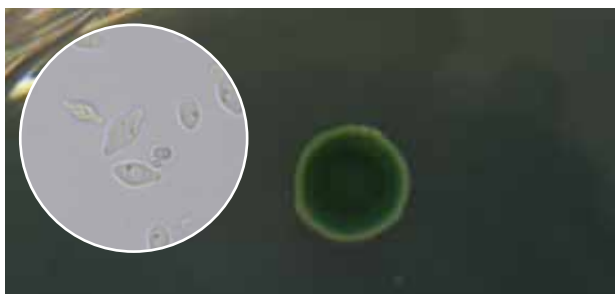
✓ Ricontrato raramente non è considerato un lievito contaminante, non essendoci evidenze di crescita nel mosto essendo incapace di fermentare. A differenza delle altre specie riportate, tutte Ascomiceti, *Rhodotorula* è un Basidiomicete.



Metschnikowia pulcherrima - (Metschnikowiaceae)

- Cellule globose o ellissoidali dim. 3-6x 6-8 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: medie dimensioni, bianco latte, consistenza cremosa, lucida con margine intero ed evidente contorno rosso bruno.

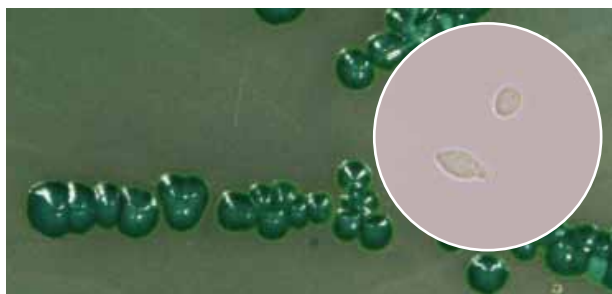
✓ Frequentemente riscontrata all'inizio della fermentazione fino a 3-4% di alcool, ha buona resistenza all'anidride solforosa ed ad alte concentrazioni zuccherine. Possiede attività proteasica.



***Hanseniaspora uvarum* anam. *Kloeckera apiculata* - (Saccharomycodacee)**

- Cellule apiculate a forma di limone, ovoidali 1,5-5 x 2,5-10, riproduzione asessuale per gemmazione bipolare. Colonia su terreno WL: grande, verde opaco, piatta, consistenza cremosa, margine liscio verde chiaro.

✓ Normale componente dell'habitat uva-vino fino a 4-5% di etanolo. Produce alte concentrazioni di etil-acetato. Scarsa resistenza alla anidride solforosa anche se alcuni ceppi sono meno sensibili.



***Hanseniaspora osmophila* (anam. *Kloeckera corticis*) - (Saccharomycodacee)**

- Cellule umbonate a forma di limone ovoidali 3,5-6x 7-18, riproduzione asessuale per gemmazione bipolare. Colonia su terreno WL: grande, elevata, verde brillante, lucida, margine liscio verde chiaro.

✓ Resistente ad anidride solforosa e ad alte concentrazioni zuccherine, potere alcoligeno tra 9 e 10%, produce alte concentrazioni di acetato, acetaldeide ed etilacetato. Specie pericolosa nelle fermentazioni di mosti da uve passite.



***Saccharomycodes ludwigii* - (Saccharomycodacee)**

- Grosse cellule a forma di limone ovoidali con gli umboni smussati, a volte forma "a birillo" dim. 4-7 x 8-25 µm, riproduzione asessuale per gemmazione bipolare. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: medio-grande, verde chiaro, lucida con margine intero verde intenso.

✓ Denominato "incubo dei cantinieri" per la capacità di svilupparsi in condizioni estreme di SO₂ fermentando addirittura i mosti muti. Potere alcoligeno elevato e produzione di composti volatili negativi.



***Schizosaccharomyces pombe* - (Schizosaccharomycetacee)**

- Cellule globose ellissoidali o cilindriche, riproduzione asessuale per fissione. Dim. 3-5 x 5-24. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: verde chiaro con striature irregolari, centro chiaro, consistenza burrosa, liscia, opaca, margine intero o ondulato più chiaro.

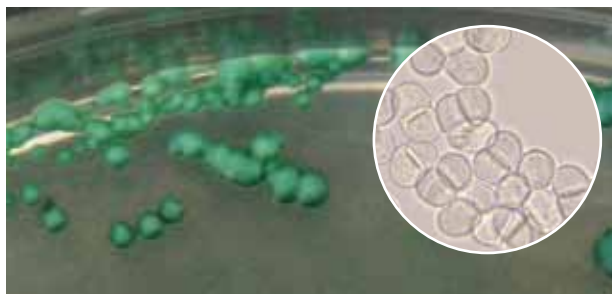
✓ È lo schizomicete maggiormente riscontrabile e di maggiore interesse enologico, ha un buon potere alcoligeno, resistente alla solforosa e una caratteristica di fermentare l'acido malico anche grazie ad un attivo trasportatore di malato di membrana.



***Schizosaccharomyces japonicus* - (Schizosaccharomycetacee)**

- Cellule globose, ellissoidali occasionalmente cilindriche, caratterizzate dalla riproduzione asessuale per fissione. Dim. 5-9 x 6-22 µm. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: medie dimensioni, verde chiaro con striature irregolari rialzata centralmente, burrosa, lucida, margine intero chiaro.

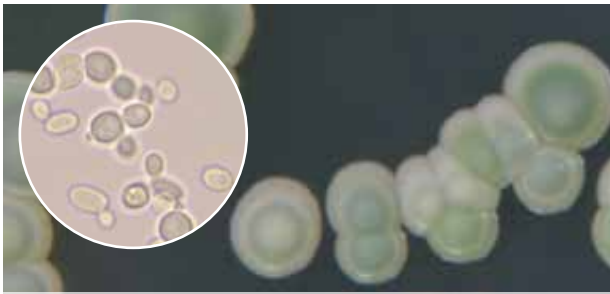
✓ Riscontrata raramente, di scarso interesse enologico. Può effettuare la fermentazione maloalcolica.



***Schizosaccharomyces octosporus* - (Schizosaccharomycetacee)**

- Cellule sub-globose o cilindriche caratterizzate dalla riproduzione asessuale per fissione. Dim. 4,5-7 x 9-22. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: medio-piccola, a goccia, verde intenso, lucida, margine intero verde scuro.

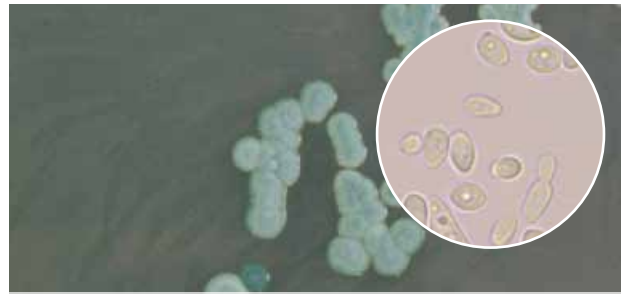
✓ Riscontrata raramente, di scarso interesse enologico. Può effettuare la fermentazione maloalcolica. Rispetto agli altri due schizomiceti non fermenta il saccarosio.



***Candida glabrata* - (Wickerhamomycetaceae)**

- Cellule sub-globose o ovoidali 2,5-4x 3-6 µm, riproduzione asessuale per gemmazione oloblastica che coinvolge cioè l'intera parete della cellula madre. Colonia su terreno WL: bianca verdognola al centro, consistenza burrosa, lucida, liscia, margine intero.

✓ Ricontrata raramente, di scarso interesse enologico, può formare film e produce alte concentrazioni di metaboliti dannosi quali acetaldeide e etil-acetato.



***Pichia anomala* (ora *Wickerhamomyces anomalus*) - (Wickerhamomycetaceae)**

- Cellule sferiche o allungate dim. 2-4 x 2-6 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: piccole dimensioni, verde azzurro chiaro, superficie rugosa a cratere interno di verde più intenso, consistenza burrosa, margine irregolare dentellato. Producono un debole odore gradevole.

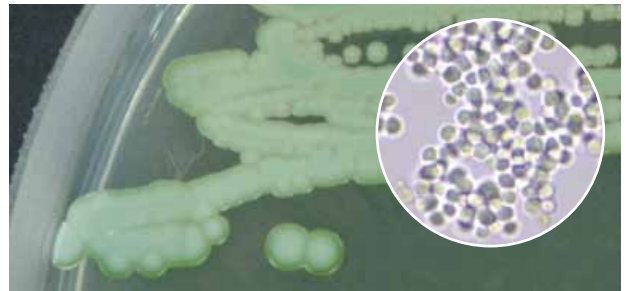
✓ A inizio fermentazione specie in uve bottrizzate può dare produzione di acido acetico ed etil-acetato. Forma pellicola superficiale. Sembra capace di contrastare lo sviluppo di muffe sull'uva e produrre fattore killer contro *Dekkera*/*Brettanomyces*. Può produrre composti positivi come esteri volatili e liberazione di terpenoli grazie ad attività glicosidasi.



***Pichia petersonii* (ora *Lindnera petersonii*) - (Wickerhamomycetaceae)**

- Cellule ellissoidali o allungate dim. 1,2-4 x 3-7 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: piccole dimensioni, verde chiaro, superficie rugosa a cratere interno di verde più intenso, consistenza burrosa, margine irregolare.

✓ Ricontrata raramente, di scarso interesse enologico. Può formare film e produrre composti volatili ad impatto organolettico negativo.



***Pichia jadinii* (ora *Lindnera jadinii*) - (Wickerhamomycetaceae)**

- Cellule ellissoidali o allungate dim. 2,5-8x4-11 µm. Riproduzione asessuale per gemmazione multilaterale. Colonia su terreno WL dopo 7 gg a 25 °C: medie dimensioni, verde chiaro con bordo verde più intenso, consistenza burrosa, lucida con margine intero.

✓ Ricontrata raramente, di scarso interesse enologico. Conosciuta come *Candida utilis* utilizzata come additivo alimentare sottoforma di auto lisato. Nel vino può formare film.

Note