Approcci microbiologici per la riduzione del grado alcolico e l'incremento dell'acidità del vino

Maurizio Ciani

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

DISVA- Università Politecnica delle Marche- Ancona



Effetti dei cambiamenti climatici

Aumento medio della temperatura (bolle di calore) differente distribuzione delle precipitazioni nell'anno

hanno modificato le fasi fenologiche classiche:

-anticipo della la ripresa vegetativa e maturazione delle uve

influenzando la dinamica degli elementi nutritivi nella pianta e gli aspetti qualitativi, organolettici e sensoriali del vino

Effetto dei cambiamenti climatici

stanno determinando profonde modificazioni della composizione delle uve quali:

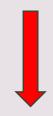
- eccessiva concentrazione zuccherina delle uve;
- •riduzione degli acidi organici delle uve;
- •innalzamento del pH;
- modificazione del tenore e tipologia di sostanze azotate nei mosti;
- modificazione del potenziale aromatico;

Perché il grado alcolico dei vini si è andato innalzando in questi ultimi anni?

Incremento contenuto alcolico vino



Effetto cambiamenti climati



Aspetti salutistici

Aspetti economici (tax)

Aspetti qualitativi



Miglioramento della Quali



Necessità di ridurre il grado alcolico nei vini

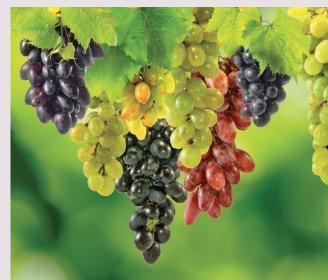
-Miglioramento della qualità dei vini

I premi vengono vinti da vini molto strutturati

- varietà a bassa resa
- modificazione delle tecniche agronomiche
- (alta densità di piantagione, sistemi di allevamento)

riduzione delle rese per ettaro





Riduzione del grado alcolico dei vini

Tecniche per ridurre il contenuto alcolico nel vino



Microbiological approaches for decreasing ethanol concentrations:

- genetically modified (GM) yeasts

-adaptative evolution-based strategy

- the use of non-Saccharomyces wine yeasts in combination with Saccharomyces cerevisiae

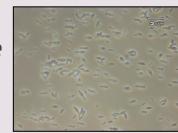
INOCULI MISTI

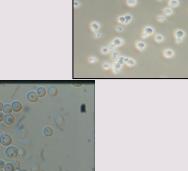
Saccharomyces/non-Saccharomyces
Specie più investigate:

Torulaspora delbrueckii Lachancea thermotolerans

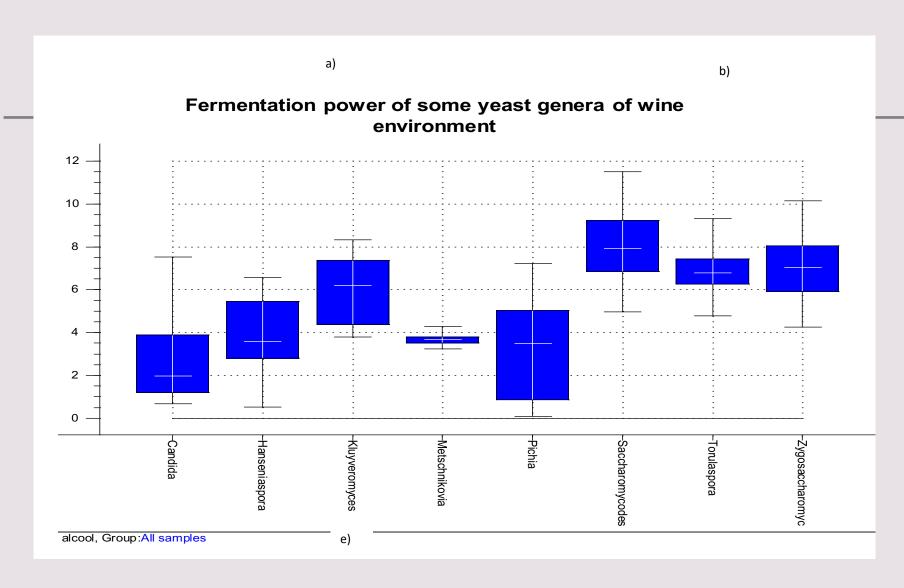
Starmerella bombicola/bacillaris

Hanseniaspora uvarum/vinae

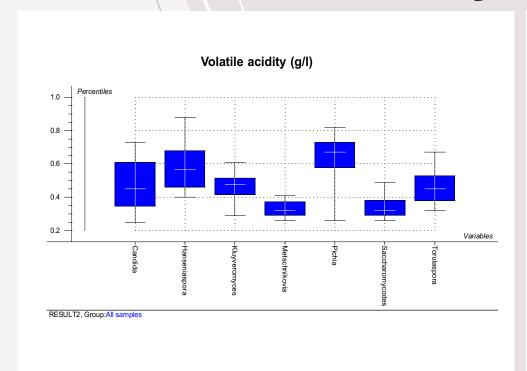


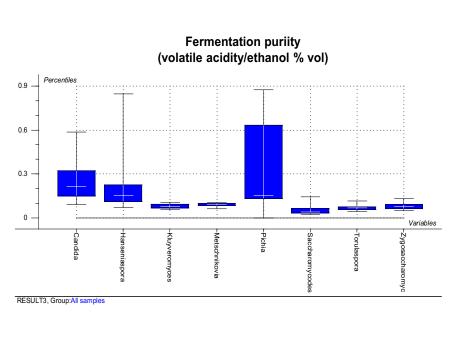


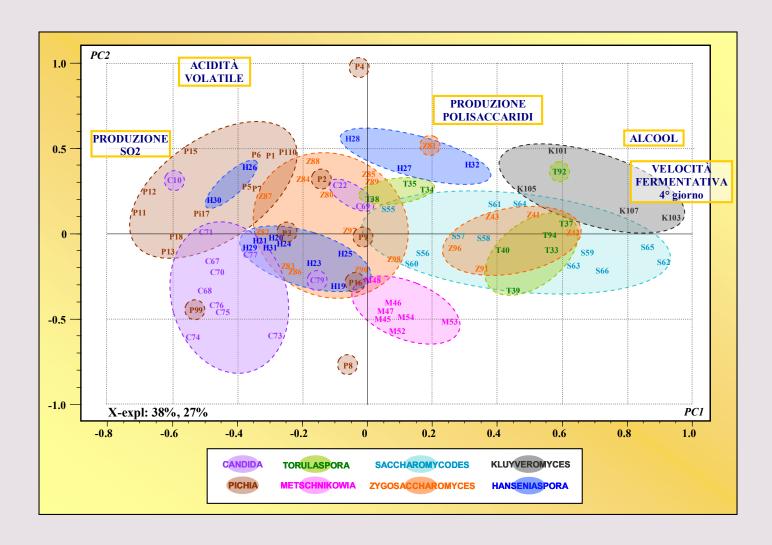
Diversity of non-Saccharomyces wine yeasts: some examples



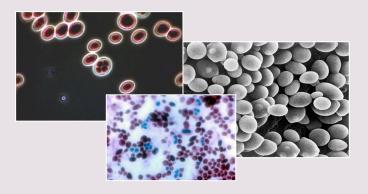
Diversity of non-Saccharomyces wine yeasts







Principal component analysis (PCA) of wines obtained inoculated with pure cultures of some non-Saccharomyces wine yeasts



I lieviti Non-Saccharomyces in fermentazioni miste con S. cerevisie

scopo

- 1. Raffrontare le "performance" con le colture pure di S. cerevisiae
- 2. -produzione di uno o più caratteri specifici
- 3. dare più complessità al vino (incremento qualiquantitativo dei composti volatili di interesse)
- 4. -Ridurre il tenore alcolico del vino





A tale scopo due aspetti dovrebbero essere investigati nei lieviti non-Saccharomyces

Minore rendimento in etanolo (Yeth)

(Deviazione della fermentazione alcolico; prodotti secondari)

Regolazione dell'attività respiro-fermentativa (maggiore attitudine a respirare, Crabtree positivi)

Cellule immobilizzate (alta densità)

Fermentazioni miste S. cerevisiae-Starmerella bombicola

(ex Candida stellata)

Incremento:

Velocità di fermentazione
Contenuto di glicerolo sino a 140%

0	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 1996, p. 128–132 099-2240/96/504.00+0 Copyright © 1996, American Society for Microbiology	Vol. 62, No. 1	
	Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized Candida stellata Cells		
	MAURIZIO CIANI* AND LUISA FERRARO Sezione Microbiologia Applicata, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Perugia, Perugia, Italy		
	Received 25 July 1995/Accepted 27 October 1995		

Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines

M. Ciani and L. Ferraro

Dipartimento di Biologia Vegetale sez. Microbiologia Applicata, Università di Perugia, Perugia, Italy

Positive interazioni tra i due lieviti per il consumo degli zuccheri, la produzione di glicerolo, acido succinico, etc.,.



published: 11 March 2016 doi: 10.3389/fmicb.2016.00278

S. bombicola 1,6%v/v

M. pulcherima 1,4%v/v



Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for **Reduction of Ethanol Content in Wine**

Laura Canonico, Francesca Comitini, Lucia Oro and Maurizio Ciani*



M. pulcherima 1,38%v/v



Article

Metschnikowia pulcherrima Selected Strain for Ethanol Reduction in Wine: Influence of Cell Immobilization and Aeration Condition

Laura Canonico, Francesca Comitini and Maurizio Ciani *

M. pulcherima 1,6%v/v T. delbrueckii 0,9 %v/v

Z. bailii 1%v/v



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology





Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-Saccharomyces yeasts under different aeration conditions



Laura Canonico^a, Mark Solomon^b, Francesca Comitini^a, Maurizio Ciani^a, Cristian Varela^{b,c,*}



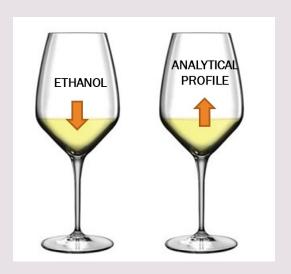
S. bombicola 1,46 %v/v



Starmerella bombicola and Saccharomyces cerevisiae in Wine Sequential Fermentation in Aeration Condition: Evaluation of **Ethanol Reduction and Analytical Profile**

Laura Canonico, Edoardo Galli, Alice Agarbati, Francesca Comitini and Maurizio Ciani * D





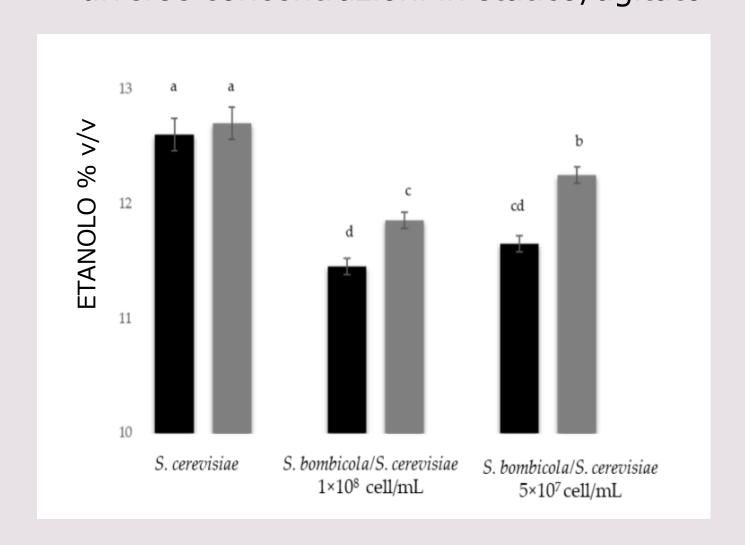
Starmerella bombicola e S. cerevisiae in fermentazioni sequenziali in condizioni di aerazione

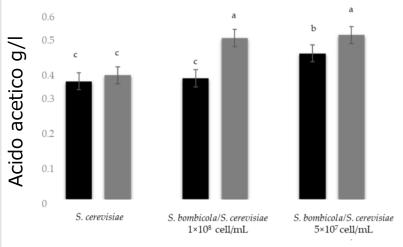
Screening preliminare: diverse concentrazioni di inoculo *S. bombicola* su mosto sintetico

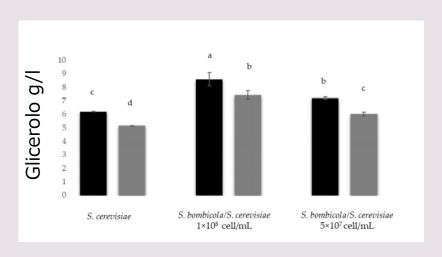


Prove di fermentazione su mosto d'uva Verdicchio valutando l'effetto della aerazione (20 mL / L / min durante le prime 72 h) sulla riduzione del contenuto di etanolo e sul profilo analitico e componente aromatica dei vini

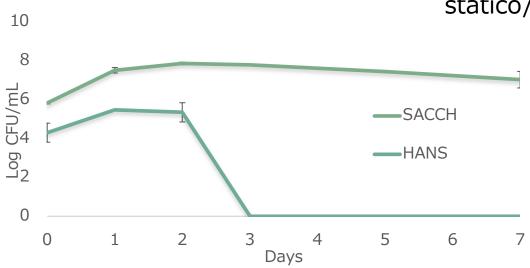
RISULTATI microfermentazioni *Starmerella bombicola* diverse concentrazioni in statico/agitato

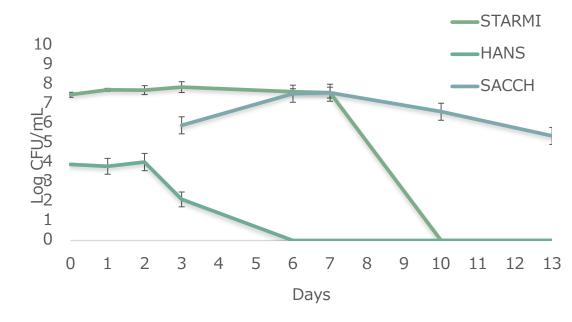




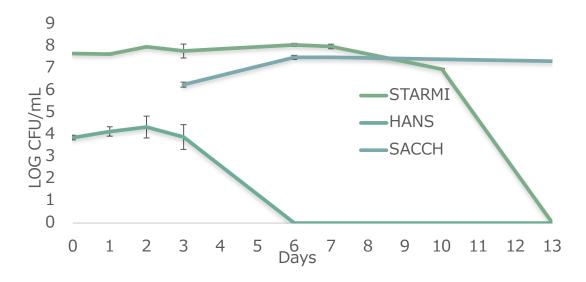


Prova Pilota statico/areato



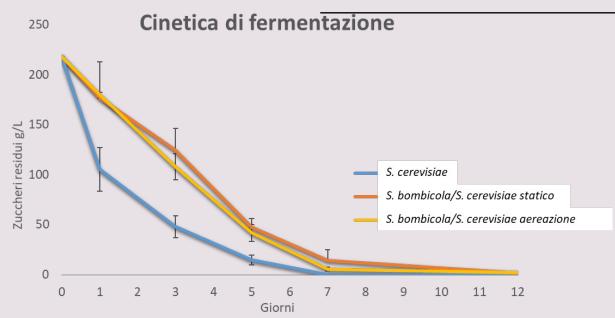






Prova	Pilota
static	o/areato

	Zuccheri	Etanolo	Rendimento	Glicerolo	Acidità volatile	Acido
	consumati	(% v/v)	in etanolo	(g/l)	(acido acetico g/l)	succinico
	(g/l)		(g/g) %		, and the second	(g/l)
S. cerevisiae	218±0.00ª	12.12±0.11ª	44.03±0.46ª	3.08±0.27°	0.35±0.01 ^a	0.25±0.21 ^b
S. bombicola /S. cerevisiae statico	216.44±0.47 ^{ab}	11.91±0.11 ^b	43.45±1.13ª	7.30±0.12 ^b	0.29±0.02 ^b	0.61±0.14 ^b
S. bombicola /S. cerevisiae	215.03±0.99 ^b	10.66±0.08°	38.99±0.73 ^b	10.50±0.12ª	0.29±0.00 ^b	2.69±0.10ª
20 ml/l/min						



		Prove fermentative	
Esteri	S. bombicola /S. cerevisiae 20 ml/l/min	S. bombicola /S. cerevisiae statico	S. cerevisiae coltura pura
Etil butirrato	1.08±0.35 ^a	0.40 ± 0.39^{b}	0.41 ± 0.02^{ab}
Etil acetato	26.17±2.51 ^b	21.58±1.04°	30.58±1.27a
Etil esanoato	0.04±0.011ª	0.03±0.019ª	0.06±0.004 ^a
Isoamilacetato	0.91±0.34 ^b	2.71±1.18 ^a	2.017 ± 0.05^{ab}
Alcoli n-propanolo	69.63±0.06ª	33.74±0.31 ^b	34.00±2.04 ^b
Isobutanolo	35.34±1.21ª	19.43±2.04 ^b	14.33±0.16 ^c
Alcol amilico	3.82±0.28a	1.30±0.24b	4.89±1.77ª
Alcol isoamilico	45.47±1.36 ^b	29.31±0.42c	64.50±2.63ª
β-Phenil ethanolo	24.8±0.28 ^b	35.8±0.07ª	30.1±0.018ab
Composti carbonil Acetaldeide	ici 30.12±2.22ª	9.26±0.53 ^b	10.59±0.19 ^b

RIASSUMENDO

Una riduzione del contenuto alcolico dei vini può essere ottenuto mediante l'uso di colture controllate miste Saccharomyces cerevisiae e non-Saccharomyces di interesse vinario

riduzione che potrebbe essere pari a 1 o 2 gradi alcolici senza stravolgimenti dei vini migliorando la produzione di uno o più caratteri specifici (es. produzione di glicerolo)

e/o incrementando la complessità del vino (attività liasica etc.)

PROSPETTIVE

- Studio delle condizioni fermentative più idonee per ridurre il contenuto alcolico nei vini
- Studio delle interazioni tra I lieviti inoculati in coltura mista
- (identificare gli effetti sinergici e migliorare le performance fermentative)

Incremento acidità fissa

riduzione degli acidi organici delle uve (innalzamento del pH)

Problematiche:

- -difficoltà nel controllo del processo fermentativo (lieviti selvaggi e batteri acetici e lattici) -scarsa attività antimicrobica della SO₂ a pH alti (≥ 3.6)
- -difficoltà nel controllo dei microbi alterativi (Brettanomyces)
- -Influenza sulle caratteristiche analitiche e sensoriali

Incremento acidità fissa

QUALE E' IL POSSIBILE APPROCCIO BIOTECNOLOGICO?

Lachancea thermotolerans

- •Incremento acidità totale, glicerolo
- •Riduzione acidità volatile, produzione di etanolo)



Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine

Mirko Gobbi ^a, Francesca Comitini ^a, Paola Domizio ^b, Cristina Romani ^{b, c}, Livio Lencioni ^b, Ilaria Mannazzu ^d. Maurizio Ciani ^{a,*}



Francesca Comitini ^a, Mirko Gobbi ^a, Paola Domizio ^b, Cristina Romani ^{b,c}, Livio Lencioni ^b, Ilaria Mannazzu ^d. Maurizio Ciani ^{a,*}

Microfermentazioni con L. thermotolerans e S. cerevisiae: influenza delle modalità di inoculo sul profilo analitico dei vini

		Modalità di inoculo					
	Saccharomyces	Saccharomyces L. thermotolerans Co-inoculo			Sequenziale		
	cerevisiae			24 h	48 h		
Etanolo (%; v/v)	13.04 ±0.29 ^b	10.46 ±0.35 ^a	12.09 ±0.44 ^{ab}	11.28 ±0.16 ^{ab}	11.56 ± 0.11^{ab}		
Zuccheri residui (g l-1)	5.93 ±0.18 ^a	54.73 ±6.38 ^c	4.51 ±0.92 ^a	27.87 ±8.61 ^b	18.70 ±1.47 ^{ab}		
рН	3.53 ±0.07 ^b	3.40 ±0.03 ^a	3.46 ±0.05ª	3.47 ±0.02 ^a	3.33 ±0.03ª		
Acidità totale (g l ⁻¹)	7.26 ±0.35 ^a	9.53 ±0.23 ^b	9.20 ±0.36 ^b	9.26 ±0.21 ^b	9.33 ±0.40 ^b		
Acidità volatile (g l ⁻¹)	0.44 ±0.05 ^c	0.26 ±0.04 ^{ab}	0.34 ±0.05 ^b	0.19 ±0.04 ^a	0.25 ±0.02 ^{ab}		
D,L-acido lattico (g l ⁻¹)	0.16 ±0.05 ^a	3.42 ±0.93 ^c	0.81 ±0.13 ^{ab}	0.76 ±0.22ab	1.55 ±0.23 ^b		
Glicerolo (g l ⁻¹)	7.04 ±0.48 ^a	7.16 ±0.25ª	7.19 ±0.05 ^a	7.73 ±0.41 ^b	7.40 ±0.34 ^{ab}		
ΔPolisaccaridi(mg l ⁻¹)	100.3 ±4.3 ^a	136.6 ±3.5 ^{ab}	139.2 ±6.1ab	163.3 ±6.8 ^b	131.1 ±10.1 ^{ab}		

Impiego di Lachancea thermotolerans

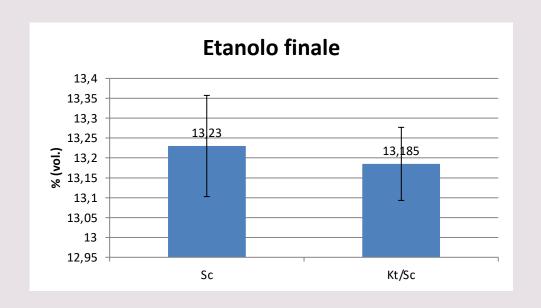
Prove in 50 L in duplicato

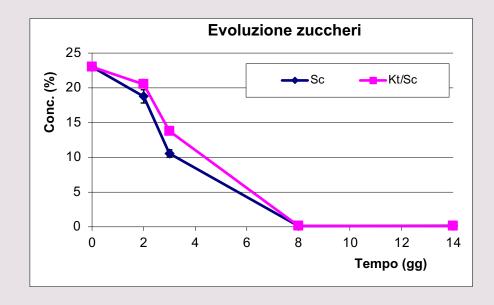
Mosto uve Montepulciano, APA 250 mg N./L, Temp. 20° iniziale e poi 25°C

A-inoculo S. cerevisiae 10⁶ cell/ml

B-inoculo scalare: L. thermotolerans 10⁷ cell/ml;

48 h dopo inoculo S. cerevisiae 106 cell/ml





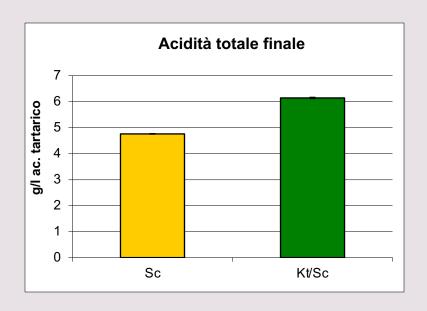
impiego di Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans

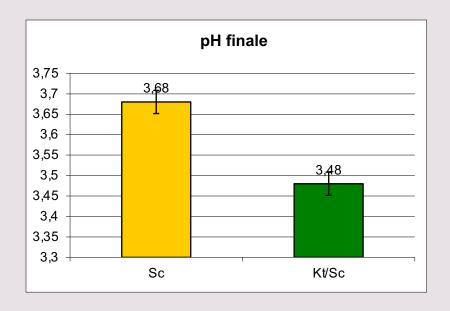
Prove in 50 L in duplicato

Mosto uve Montepulciano, APA 250 mg N./L, Temp. 20° iniziale e poi 25°C **A**-inoculo S. cerevisiae 10⁶ cell/ml

B-inoculo scalare: L. thermotolerans 10⁷ cell/ml;

48 h dopo inoculo S. cerevisiae 106 cell/ml





Incremento dell'acidità totale e riduzione del pH impiego di Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans

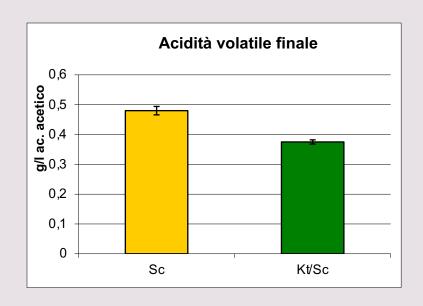
Prove in 50 L in duplicato

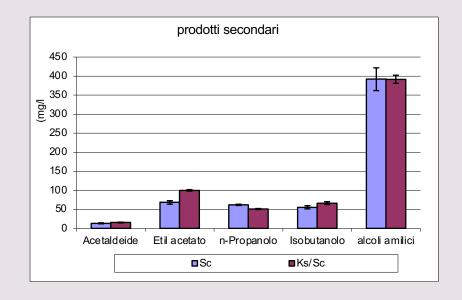
Mosto uve Montepulciano, APA 250 mg N./L, Temp. 20° iniziale e poi 25°C

A-inoculo S. cerevisiae 106 cell/ml

B-inoculo scalare: L. thermotolerans 10⁷ cell/ml;

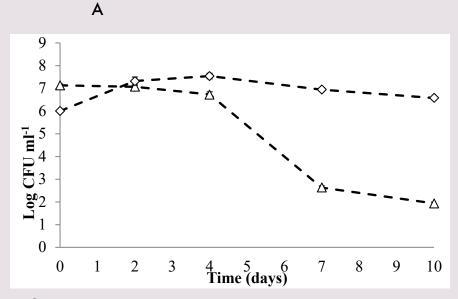
48 h dopo inoculo S. cerevisiae 106 cell/ml

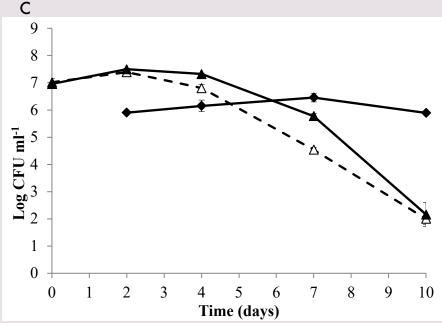




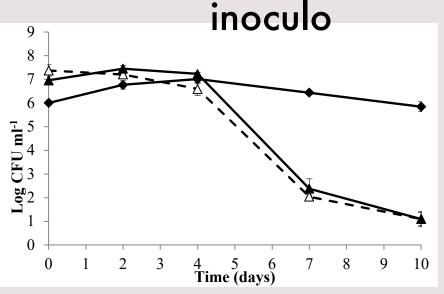
Lachancea thermotolerans influenza sull'acidità totale e sulla qualità dei vini nell'era del cambiamento climatico

Sequential fermentations involving any of the studied strains of L. thermotolerans with S. cerevisiae showed an **increased volatile profile** compared to the S. cerevisiae single fermentation, highlighting the **synergic effect** between the studied species.





Fermentazioni industriali (10 ql) L. thermotolerans/S. cerevisiae: influenza delle modalità di



Evoluzione dei lieviti (log CFU ml⁻¹)
durante la fermentazione industriale.
(A)CONTROLLO;
(B) (B) Co-inoculo
(C)fermentazione sequenziale.
S. cerevisiae controllo (-◊-), S. cerevisiae (-•)
e L. thermotolerans (-▲-) in fermentazioni miste
Indigeni non-Saccharomyces (-△-).

Fermentazioni industriali L. thermotolerans/S. cerevisiae:

	٨	Modalità di inoculo				
	Controllo	Co-inoculo	Inoculo sequenziale (48h)			
Etanolo (%; v/v)	12.45 ±0.14b	12.29 ±0.18b	11.77 ±0.20°			
рН	3.37 ± 0.01^{b}	$3.29 \; \pm 0.05^{ab}$	3.21 ±0.03°			
Acidità totale (g l-1)	7.03 ±0.23°	9.33 ±0.11 ab	12.45 ±0.18b			
Acidità volatile (g l-1)	0.30 ±0.02°	0.32 ±0.02°	0.48 ±0.02b			
Acido lattico (g l-1)	0.20 ±0.01°	2.35 ±0.77 ^{ab}	6.38 ±0.22 ^b			
Acido malico (g l-1)	2.10 ±0.10°	2.02 ±0.16°	1.96 ±0.12°			
Glicerolo (g l-1)	9.02 ±0.14°	9.68 ±0.10°	11.22 ±0.28 ^b			
Δ polisaccaridi (mg l-1)	378.8 ±9.0°	358.6 ±14.4°	377.0 ±24.6°			

Inoculation modality

	Control	culture Co-culture	Sequential culture
Ethanol (%; v/v)	12.45 ± 0.14b	12.29 ± 0.18b	11.77 ± 0.20°
pH \	$3.37 \pm 0.01b$	3.29 ± 0.05ab	$3.21 \pm 0.03^{\circ}$
Total acidity (g l−1)	7.03 ± 0.23a	9.33 ± 0.11ab	12.45 ± 0.18b
Volatile acidity (g l−1)	0.30 ± 0.02a	$0.32 \pm 0.02^{\circ}$	$0.48 \pm 0.02b$
d,I-lactic acid (g I-1)	0.20 ± 0.01a	2.35 ± 0.77ab	$6.38 \pm 0.22b$
Malic acid (g l−1)	2.10 ± 0.10a	2.02 ± 0.16a	1.96 ± 0.12a
Glycerol (g I-1)	9.02 ± 0.14a	9.68 ± 0.10a	11.22 ± 0.28b

Fermentazioni industriali L. thermotolerans/S. cerevisiae:

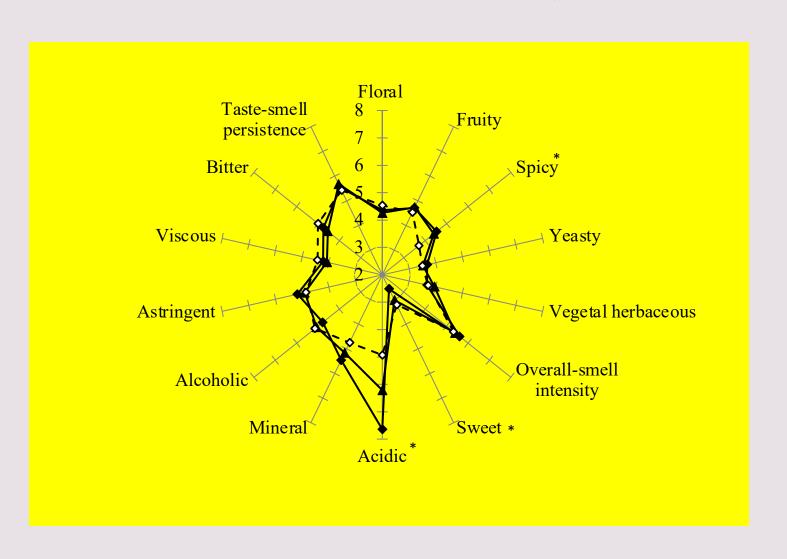
COMPOSTI VOLATILI(mg l-1):					
	Controllo	coinoculo	sequenziale		
Acetaldeide	46.18 ±6.14°	45.15 ±12.92°	47.04 ±19.01°		
1-Propanolo	71.78 ±6.06 ^b	68.74 ±4.09b	57.02 ±7.94°		
2-Metil-1-propanolo	55.01 ±3.36°	54.32 ±2.50°	63.52 ±2.78b		
2-Metil-1-butanolo	32.78 ±1.20°	34.10 ±2.51°	30.73 ±3.07°		
3-Metil-1-butanolo	135.40 ±4.04°	146.41 ±8.91°	140.26 ±6.52°		
Esanolo	0.47 ±0.01°	0.48 ±0.02°	0.39 ±0.01°		
2-fenil etanolo	21.62 ±0.07°	28.07 ±1.77 ^{αb}	35.39 ±0.64b		
Etil acetato	105.10 ±14.84°	94.33 ±5.79°	105.99 ±5.97°		
Isoamil acetato	0.10 ±0.01°	0.30 ±0.02ab	0.62 ±0.04b		
Fenil etil acetato	0.04 ±0.01°	0.02 ±0.01°	0.03 ±0.00°		
Etil lattato	1.06 ±0.15°	13.01 ±1.43ab	40.49 ±5.52b		
Etil esanoato	0.06 ±0.01°	n.d.	0.30 ±0.02b		
Etil ottanoato	0.26 ± 0.06^b	0.22 ±0.03ab	0.11 ±0.00°		

Control culture Co-culture

Sequential culture

2-Phenylethanol	21.62 ± 0.07 a	28.07 ± 1.77 ab	35.39 ± 0.64 b
Ethyl acetate	105.10 ± 14.84a	94.33 ± 5.79 a	105.99 ± 5.97°
Isoamyl acetate	0.10 ± 0.01a	0.30 ± 0.02 ab	0.62 ± 0.04 b
Phenylethyl acetate	$0.04 \pm 0.01a$	$0.02 \pm 0.01a$	0.03 ± 0.00 a
Ethyl lactate	$1.06 \pm 0.15a$	13.01 ± 1.43 ab	<mark>40.49 ± 5.52</mark> ь
Ethyl hexanoate	$0.06 \pm 0.01a$	n.d.	0.30 ± 0.02 b
Ethyl octanoate	0.26 ± 0.06 b	0.22 ± 0.03 ab	0.11 ± 0.00a
Ethyl butyrate	0.08 ± 0.02 a	0.24 ± 0.02ab	0.64 ± 0.14 b

Fermentazioni industriali L. thermotolerans/S. cerevisiae:

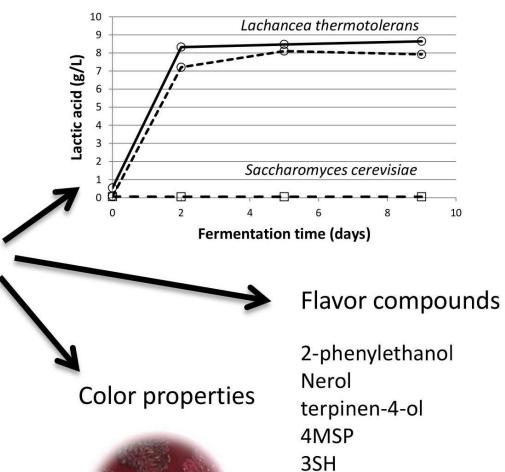


L. thermotolerans

Identification



Acidification



Glycerol

Table 1.

Basic oenological parameters of fermentations from Tempranillo red grapes.

Results are mean ± SD of three replicates. Different letters indicate statistical significance between groups. *S. cerevisiae* AG006 control (AG006) and sequential fermentations with *S. cerevisiae* (AG006) and *L. thermotolerans* Excellence X'Fresh (EXC); Levulia Alcomeno (LEV); EnartisFerm Qkappa (QKAPPA); L1 (L1) or L3

	AG006	EXC	LEV	QKAPPA	L1	L3
Ethanol (%, v/v)	14.74 ± 0.08c	14.46 ± 0.06b	14.52 ± 0.07b	14.69 ± 0.07c	14.21 ± 0.08a	14.17 ± 0.09a
Glucose + Fructo se (g/L)	1.24 ± 0.21a	2.62 ± 0.42b	2.25 ± 0.34b	1.31 ± 0.20a	4.73 ± 0.62c	3.69 ± 0.44c
Glycerol (g/L)	9.25 ± 0.32b	8.48 ± 0.33a	8.76 ± 0.24ab	8.87 ± 0.36ab	8.96 ± 0.47ab	8.82 ± 0.46ab
рН	3.77 ± 0.02d	3.65 ± 0.03b	3.69 ± 0.03bc	3.72 ± 0.02c	3.62 ± 0.02b	3.56 ± 0.02a
Lactic acid (g/L)	0.11 ± 0.03a	2.70 ± 0.18d	1.92 ± 0.26c	0.80 ± 0.11b	2.30 ± 0.64cd	3.19 ± 0.21e
Malic acid (g/L)	1.41 ± 0.12 b	1.16 ± 0.11a	1.26 ± 0.05ab	1.37 ± 0.11b	1.11 ± 0.10a	1.39 ± 0.15b
Acetic acid (g/L)	0.36 ± 0.05a	0.44 ± 0.06b	0.53 ± 0.07bc	0.46 ± 0.05b	0.45 ± 0.03b	0.56 ± 0.04c
Succinic acid (g/L)	1.47 ± 0.06b	1.26 ± 0.13a	1.41 ± 0.13ab	1.32 ± 0.04a	1.41 ± 0.17ab	1.22 ± 0.11a

(L3).

conclusioni

1. eccessiva concentrazione zuccherina delle uve (con conseguente innalzamento grado del alcolico;

Possibili rimedi biotecnologici
-nuovi ceppi di S. cerevisiae selezionati per adattamento selettivo
-uso di fermentazioni multistarter con lieviti non-Saccharomyces

2. riduzione degli acidi organici delle uve (innalzamento del pH)

Possibili rimedi biotecnologici
-uso di fermentazioni multistarter con lieviti non-Saccharomyces che possiedo azione acidificante (Lachancea. thermotolerans)