



La sinergia tra SO₂ ed etanolo è il “cattivo” per i lieviti all’inizio della presa di spuma degli spumanti

Bruno Cisilotto^{1,2}, Fernando Joel Scariot¹, Luisa Vivian Schwarz¹, Ronaldo Kauê Mattos Rocha¹, Ana Paula Longaray Delamare¹, Sergio Echeverrigaray¹

¹ Laboratory of Enology and Applied Microbiology, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Brazil.

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves, Brazil.

Nel nostro lavoro, mostriamo che ad un pH comunemente presente nei vini base per la produzione degli spumanti (cioè 2,8-3,3), si verifica una sinergia tra l'SO₂ aggiunta come conservante e l'etanolo presente nel vino base. Questa sinergia provoca un forte stress sui lieviti che porta ad una importante perdita di vitalità, che a sua volta provoca un aumento della durata della fase di latenza, fermentazione lenta e difficoltà nel completare la presa di spuma.

Creazione di ipotesi e disegno sperimentale

L'ipotesi che la sinergia tra SO₂ ed etanolo sia il principale fattore di stress all'inizio della seconda fermentazione dei vini spumanti è emersa dall'osservazione che la vitalità della popolazione di lieviti diminuiva e le fasi di latenza differivano in durata in alcune fermentazioni entro la prima settimana dopo l'inoculo del *pie-d-de-cuve*.

Come accennato nell'introduzione e nella discussione di un nostro articolo¹, lo stress causato da etanolo e SO₂ è descritto in letteratura. Esistono calcoli e formule nella letteratura di chimica enologica che teorizzano la frazione di SO₂ molecolare tenendo conto della concentrazione di etanolo², nonché studi che mostrano l'effetto sinergico di SO₂ ed etanolo sui lieviti alteranti nei vini “finiti”. Inoltre, si raccomanda che le concentrazioni di SO₂ libera nei vini base per spumanti siano inferiori a 10 mg/L prima dell'inizio della seconda fermentazione³. Tuttavia, non abbiamo trovato nella letteratura scientifica alcuna ricerca che descriva la sinergia tra SO₂ ed etanolo e mostri lo stress causato nei ceppi di lievito comunemente usati per la seconda fermentazione degli spumanti.

In quest'ottica, abbiamo creato un modello fermentativo sperimentale per testare il comportamento del lievito *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118® (ceppo specificamente commercializzato per la produzione di vini spumanti) in diversi ambienti. I trattamenti comprendevano un mezzo sintetico con i) aggiunta di SO₂, ii) aggiunta di etanolo, iii) aggiunta di SO₂ ed etanolo e iv) né SO₂ né etanolo aggiunti (controllo). In questo modo è stato possibile valutare e confrontare il comportamento dei lieviti in ciascun sistema fermentativo tramite analisi di marcatori di stress, marcatori di vitalità e attività cellulare e dell'espressione di geni legati allo stress da SO₂.

Interpretazione dei risultati

I risultati ottenuti nei nostri esperimenti hanno mostrato che la sinergia tra SO₂ ed etanolo intensifica lo stress e colpisce in modo significativo la popolazione di lieviti, con diminuzione della vitalità e della attività, aumento della produzione di ROS, diminuzione del pH intracellulare, aumento della produzione di acetaldeide e aumento dell'espressione di geni legati allo stress causato da SO₂¹. Lo stesso effetto di diminuzione della vitalità e del vigore del lievito è stato osservato in una seconda fermentazione condotta industrialmente¹. La Figura 2 illustra l'effetto di ciascun trattamento in termini di vitalità e cinetica di fermentazione. In questo caso, l'esperimento è stato condotto ad una temperatura di 20 °C. La sopravvivenza cellulare è stata valutata con

Sinergia tra SO₂ ed etanolo durante la seconda fermentazione dei vini spumanti

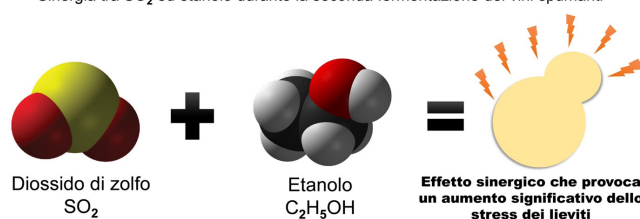


FIGURA 1. Schema grafico dell'effetto sinergico tra SO₂ ed etanolo.

ioduro di propidio (IP), colorante intercalante del DNA, utilizzando un citometro a flusso (Figura 2A) e la valutazione degli zuccheri riducenti utilizzando il metodo con acido 3,5-dinitrosalicilico (DNS) come agente riducente e lettore di micropiastre con assorbanza a 595 nm (Figura 2B) (per ulteriori informazioni, vedere l'articolo).

I risultati in Figura 2 mostrano il comportamento di un inoculo adattato con etanolo nei diversi trattamenti, simulando l'inizio di una seconda fermentazione. Nei trattamenti con sola aggiunta di SO₂ si può notare che i lieviti hanno un comportamento molto simile al controllo, pur subendo una piccola riduzione della vitalità durante le prime ore di adattamento. Nel trattamento con etanolo da solo non si ha diminuzione di vitalità, ma si ha una diminuzione della velocità di fermentazione e del consumo di zuccheri a causa dell'inibizione della crescita della popolazione¹. Nel trattamento con etanolo al 5 % e 20 mg/L SO₂ è interessante notare che, sebbene i lieviti abbiano subito una perdita di vitalità leggermente più pronunciata all'inizio e abbiano subito un maggiore stress¹, la cinetica fermentativa è aumentata di velocità dopo 48 h con un aumento nella percentuale di vitalità del lievito, dimostrando che la quantità di etanolo gioca un ruolo importante nell'effetto sinergico. Nei trattamenti con quantità pari o superiori al 10 % di etanolo e con una quantità iniziale di SO₂ superiore a 10 mg/L, si è verificata una marcata diminuzione della vitalità della popolazione e di conseguenza una riduzione della velocità di consumo dello zucchero. Questo rallenta la fermentazione e può portare all'arresto della fermentazione.

Osservazioni finali

Nonostante diversi studi cerchino un sostituto dell'SO₂⁴ per l'uso in vinificazione, uno che abbia un effetto così completo (attività antiossidante e antimicrobica), oltre a essere a basso costo e sicuro

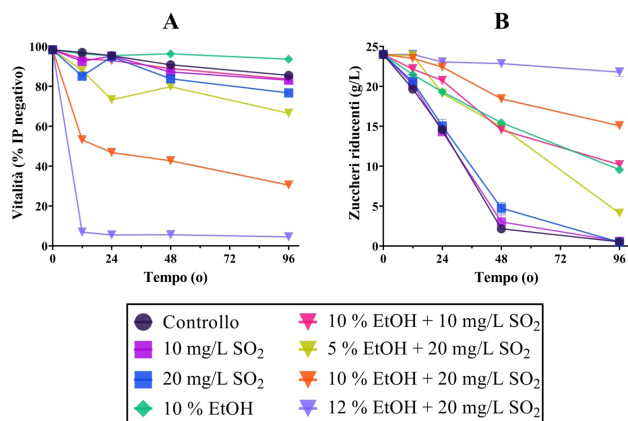


FIGURA 2. Influenza di ciascun trattamento sulla vitalità e sulla cinetica della fermentazione. Adattato da Cisilotto *et al.* (2021)¹.

per il consumo umano, non sembra ancora esistere. Pertanto, probabilmente continueremo a utilizzare l'SO₂ come conservante del vino per molto tempo. Tuttavia, nel caso dei vini base utilizzati per gli spumanti, che sono un prodotto intermedio, le dosi di SO₂ libera devono essere molto precise e personalizzate. Per questo dosaggio preciso, oltre alla concentrazione di SO₂ libera e al pH, devono essere considerati la concentrazione di etanolo, la temperatura di conservazione, la torbidità e la forza ionica di ciascun vino. La quantità di cellule di lievito inoculate per la presa di spuma degli spumanti gioca un ruolo importante nella qualità del prodotto; un eccesso di cellule al momento dell'inoculo può causare difetti sensoriali. Minore è la concentrazione di etanolo e la quantità di SO₂ libera nel vino base, migliore è l'adattamento dei lieviti e di conseguenza migliore la cinetica di fermentazione; l'eccesso di cellule all'inoculo e l'eccessiva

riduzione della percentuale di cellule vitali all'inizio del processo possono così essere evitate. Effettuare una fermentazione lineare e standardizzata può evitare una serie di complicazioni logistiche e spese inutili, soprattutto negli spumanti realizzati con il metodo tradizionale in cui il reinoculo del *pied-de-cuve* implica l'apertura delle bottiglie. Pertanto, concentrazioni equilibrate di SO₂ ed etanolo minimizzeranno non solo lo stress dei lieviti all'inizio della seconda fermentazione degli spumanti, ma anche lo "stress" dell'enologo incaricato di condurre questo processo. ■

Fonte: "Yeast stress and death caused by the synergistic effect of ethanol and SO₂ during the second fermentation of sparkling wines" (OENO One, 2021).

- 1 Cisilotto, B., Scariot, F. J., Vivian Schwarz, L., Mattos Rocha, R. K., Longaray Delamare, A. P., & Echeverrigaray, S. (2021). Yeast stress and death caused by the synergistic effect of ethanol and SO₂ during the second fermentation of sparkling wines. *OENO One*, 55(4), 49–69. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.4.4809>
- 2 Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry* (first edit). Wiley.
- 3 Alexandre, H. (2019). Yeasts and Sparkling Wine Production. In P. Romano, M. Ciani, & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 395–432). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_13
- 4 Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 455–479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>