

LAFFORT INFO N°143

Zymaflore KLIMA: alla ricerca della freschezza

Le tendenze ed i gusti cambiano e il mondo del vino non fa eccezione. Fino a poco tempo fa, la potenza e la ricchezza in struttura definivano e determinavano in gran parte la qualità dei vini. Oggi, al contrario, sono la morbidezza, l'equilibrio e soprattutto la freschezza ad attirare i consumatori ed a stimolare i vinificatori. Tuttavia, con il riscaldamento climatico globale, mantenere la freschezza diventa una vera sfida. La deriva verso l'alto dei valori di pH e alcool potenziale dei vini austriaci rappresentata nel grafico di figura 1 è molto rappresentativa di quanto sta accadendo nel mondo del vino. Bisogna dunque lavorare a diversi livelli per cercare di contenere e correggere questo andamento. Da parte nostra abbiamo cercato, per raggiungere questo obiettivo, strumenti biotecnologici, nello specifico selezionando lieviti fermentativi mirati ad un abbassamento del grado alcolico e ad una migliore preservazione o addirittura produzione di acidità fissa.

La ricerca genetica

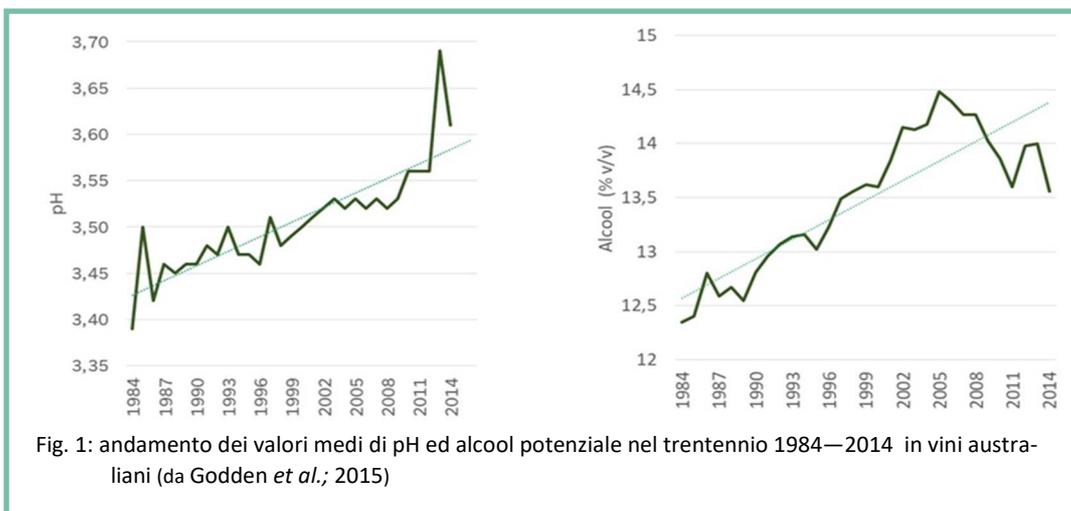
Nell'intento di assecondare le richieste dei consumatori e dei produttori di vino relative alla freschezza ed ad una - per quanto possibile - moderazione del grado alcolico, sono stati attivati ormai da tempo, lavori di genetica quantitativa fondamentale per individuare i geni correlati a questi due parametri e cercare di trovare individui caratterizzati da un metabolismo che evidenzia un basso rendimento in alcool ed una elevata preservazione se non addirittura produzione di acido malico durante la fermentazione.

L'obiettivo è quello di essere in grado di utilizzare i lieviti

come strumenti efficaci in ordine a:

- Preservare l'acidità ed il pH del prodotto;
- Contenere la produzione di alcool.

A questo punto appare opportuno procedere ad un piccolo approfondimento genetico. Una grossa difficoltà o comunque complicazione nella selezione di ceppi di lievito dotati di determinati caratteri è rappresentato dal fatto che molti di questi, quali la vigoria fermentativa, la tolleranza all'alcool, la produzione di acidità volatile, la produzione di aromi fermentativi, ed anche la preservazione dell'acidità e la resa in alcool, sono caratteri definiti di tipo quantitativo. Ciò significa che sono frutto di un determinismo genetico complesso, controllato da più geni, si parla di QTL (Quantitative Trait Loci) tratti di DNA associati ad uno specifico carattere quantitativo, che è dunque l'espressione della somma di più geni che possono trovarsi anche ad una certa distanza tra loro. Maggiore è il numero di geni coinvolti nella determinazione di uno stesso carattere fenotipico, minore è l'effetto di ognuno e maggiore la difficoltà a selezionare individui con una elevata espressione dello stesso.



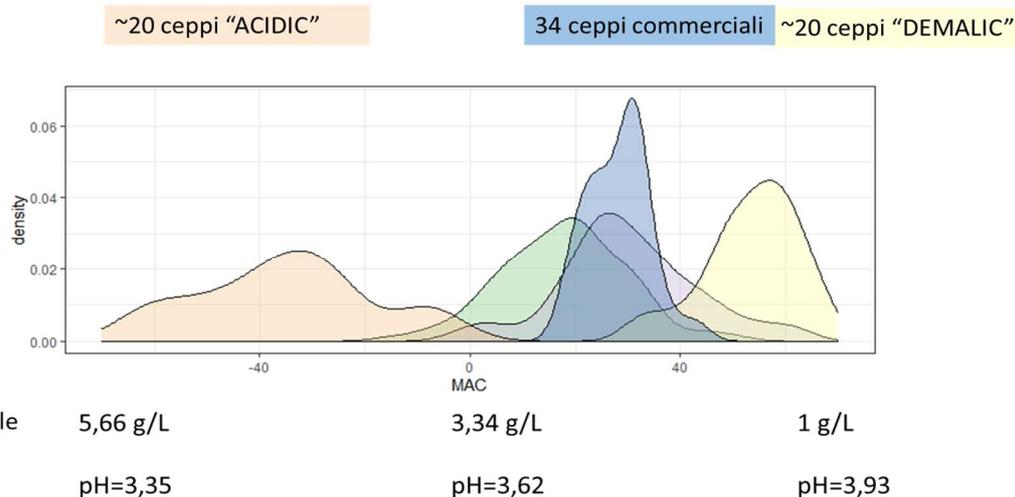


Fig. 2 - Selezione genetica preliminare alla caratterizzazione tecnologica dei ceppi ACIDIC e DEMALIC (C. Vion - Biolaffort)

Sono caratteri che tipicamente variano secondo una scala continua e volendo misurare uno di questi caratteri in una popolazione di individui per poi andarne a rappresentare la frequenza e l'intensità su un piano cartesiano, si ottiene una tipica distribuzione di tipo gaussiano.

In questo contesto, applicando tecniche di sequenziamento genetico e di correlazione con l'espressione fenotipica, intesa come l'insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali di un organismo, si cerca di comprendere il ruolo di ciascun tratto di genoma con le caratteristiche funzionali del ceppo di lievito.

Una volta che si conoscono i caratteri fenotipici e genotipici specifici di un ceppo mediante particolari studi statistici di correlazione è possibile identificare le regioni genetiche responsabili delle differenze fenotipiche. In questo caso si parla di genetica quantitativa e di mappatura QTL. Questi metodi permettono di prevedere, già dall'analisi del genotipo, quale sarà l'espressione fenotipica di un ceppo di lievito, ancor prima di dover ricorrere alla messa in opera di innumerevoli prove di fermentazione per riuscire ad isolare, in una popolazione naturale o frutto di ricombinazione per incrocio, gli individui dotati dei caratteri obiettivo della selezione.

Applicando queste tecniche ai due caratteri sui quali ci siamo interrogati (acidità e resa in alcool) si sono avviati diversi lavori.

Diversi ricercatori, sotto la guida di Philippe Marullo, hanno cercato di porre in evidenza le correlazioni esistenti tra produzione o consumo di acido malico, produzione di glicerolo e resa in alcool da parte di differenti ceppi di lievito. Alla luce delle specifiche correlazioni tra i caratteri di ceppi differenti è stato possibile procedere da un lato cercando di individuare i QTL implicati nel loro determinismo e dall'altro operando incroci tra cellule volti ad estremizzarne le differenze di espressione (Figura 2).

Non dimentichiamo che la mappatura dei QTL è caratterizzata da un elevatissimo grado di difficoltà e complessità.

Si deve sapere che il genoma di *S. cerevisiae* è costituito da poco più di 12.000.000 di basi, un singolo QTL può arrivare a 50.000 basi, un gene è generalmente composto da circa 2.000 basi e la mutazione di una singola base, in grado di fare la differenza, può essere ben paragonata alla classicissima ricerca dell'ago nel pagliaio. (CFR Fig. 3)

In questo ambito è stato anche definito il parametro MAC%, coefficiente che descrive l'impatto del lievito sul bilancio complessivo dell'acido malico nel corso delle trasformazioni fermentative.

Questo parametro altro non è che la percentuale di acido malico che viene consumato o prodotto durante la



Il genoma: 12 000 000 basi



il QTL: ~50 000 basi



il gene: ~2 000 basi



La mutazione: 1 base

Fig. 3: L'ago nel pagliaio

fermentazione alcolica.

$$\text{MAC \%} = \frac{[\text{Ac. malico}]_{\text{mosto}} - [\text{Ac. malico}]_{\text{vino}}}{[\text{Ac. malico}]_{\text{mosto}}} \times 100$$

Il MAC% è positivo quando a fine fermentazione si trova meno malico rispetto a quello contenuto nel mosto

Il MAC% è negativo quando a fine fermentazione si trova più malico rispetto a quello contenuto nel mosto

Il MAC% è pari a zero quando a fine fermentazione si trova la stessa quantità di malico rispetto al mosto

Come rappresentato in figura 2, il MAC% può assumere valori anche molto diversi mettendo in evidenza attitudini spiccatamente “malicanti” o “demalicanti” in ceppi di lieviti ottenuti per incrocio e successiva selezione divergente partendo da ceppi commerciali.

Infine sono stati individuati ed oggetto di brevetto i QTL che codificano per le due tipologie estreme di comportamento.

	QTL1	QTL2	QTL3	QTL4	QTL5	QTL6	QTL7	QTL8
Tipo DEMAL	A/A	T/T	A/A	C/C	A/A	T/T	C/C	G/G
Tipo MAL	C/C	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	A/A

Parallelamente si è lavorato sul fronte del rendimento in alcol. In questo caso, essendo più limitata la variabilità intraspecifica relativa allo specifico carattere, essendo questo il principale metabolismo per *Saccharomyces cerevisiae*, nel quale questi è estremamente specializzato, i margini di intervento sono forzatamente più limitati. In natura tra il ceppo a più alto rendimento e quello a più basso rendimento la differenza massima è di 0,5—0,8 % vol.

E comunque anche in questo caso sono stati individuati i QTL implicati nella codifica del rendimento in alcol.

	QTL1	QTL2	QTL3	QTL4	QTL5	QTL6	QTL7
LOW YIELD	C/C	C/C	A/A	G/G	T/T	C/C	T/T

Infine si è operato per combinare gli elementi genetici che presentano un effetto sul rendimento zuccheri>alcol e quelli attivi sul tenore in acido malico in un unico individuo.

Si è puntato cioè a combinare i 7 QTL conosciuti per ottenere un basso rendimento alcol/zuccheri convenzionalmente denominati LOW YIELD con gli 8 conosciuti per influire sulla modulazione dell’acido malico (DEMAL/MAL).

Al termine della realizzazione degli incroci si è ottenuto una serie di ceppi fra i quali è stato possibile selezionare un candidato dotato di caratteristiche di assoluto interesse, caratterizzato da una decisa azione acidificante e da un relativamente basso rendimento in alcol. E’ in grado di condurre la fermentazione alcolica in un range di temperature comprese tra 14 e 30 °C, ha un fabbisogno in azoto piuttosto elevato che ben si presta alla realizzazione

di vini rossi, rosati e bianchi, armoniosi ed equilibrati, con acidità viva e freschezza aromatica intensa, dotati di sensorialità eleganti nel rispetto dei vitigni e del terroir.

Risultati in cantina

Di seguito esponiamo i risultati di alcune vinificazioni condotte in scala reale di cantina su differenti vitigni a confronto con diversi ceppi di lievito.

Nella vendemmia 2022 una vinificazione a confronto è stata seguita in una cantina del bordolese su uve Merlot. Il mosto di partenza aveva una concentrazione zuccherina che avrebbe potuto esprimere un alcool potenziale di 14,3 % Vol, un pH di 3,50 ed un contenuto di acido malico di 1,1 g/L. Il pigiadiraspatto suddiviso in due aliquote omogenee e confrontabili è stato da un lato inoculato con Zymaflore F15 e dall’altro con Zymaflore Klima. La fermentazione è stata condotta ad una temperatura di 24 - 26 °C; identica la nutrizione nelle due vasche. I vini a fine fermentazione presentavano i seguenti dati analitici.

	F15	KLIMA
Alcool % vol	13,62	13,14
pH	3,48	3,41
Ac. Totale g/L	7,06	8,73
Ac Malico g/L	1,19	1,59
Glicerolo g/L	9,7	9,7
TL35	79	61

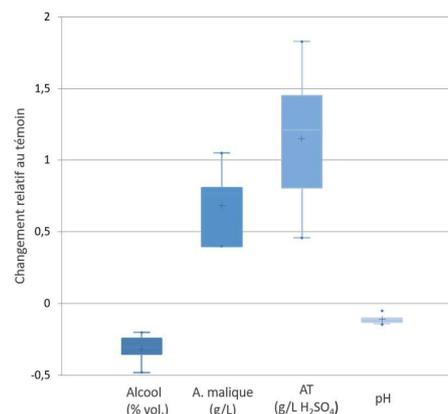
Dai valori sopra esposti si evincono chiaramente i caratteri fermentativi espressi da KLIMA che, in rapporto al testimone, ha espresso:

- Una diminuzione di etanolo di oltre 0,4 % vol
- Un aumento dall’acido malico di 0,4 g/L
- Un aumento di Ac. Totale di 1,6 g/L
- Un abbassamento del pH di quasi 0,1 punto.

Possiamo affermare che la maggiore presenza di acido L-malico, si traduce, nel caso di successiva fermentazione Malolattica, in una maggiore concentrazione di ac Lattico. Anzi una maggiore concentrazione di substrato ne

Dati medi ottenuti in oltre 20 vinificazioni registrate a confronto:

- diminuzione del grado alcool di 0,3—0,5 % vol, massimo consentito da variabilità intraspecifica
- Aumento dell’acido malico a fine FA tra 0,4 e 0,8 g/L
- Aumento del pH di 0,1 punto
- Aumento dell’acidità totale in media di 1,5 g/L



facilita l'avvio e lo svolgimento.

L'acido malico rilevato tuttavia non giustifica del tutto l'aumento di acidità totale che si registra, a questo concorrono sicuramente anche altri acidi organici fissi.

La TL 35 inferiore nel caso del Klima, fattore registrato normalmente, testimonia come una maggiore acidità migliori la resa in SO₂ libera a parità di SO₂ totale.

Sul glicerolo non si notano differenze, ma come ben sappiamo lo Zymaflore F15 è ceppo noto ai ricercatori ed ai tecnici del settore per la sua elevata produzione del menzionato composto.

Nella vendemmia 2023 una vinificazione a confronto è stata seguita in una cantina della Toscana su uve Sangiovese. Il mosto di partenza aveva una concentrazione zuccherina di circa 225 g/L, un pH di 3,52 ed un contenuto di acido malico di 1,9 g/L. Il pigiadiraspato suddiviso in due aliquote il più omogenee e confrontabili possibile è stato da un lato inoculato con un ceppo di lievito abitualmente utilizzato dalla cantina e dall'altro con Zymaflore Klima. La fermentazione è stata condotta ad una temperatura compresa tra 22 e 26 °C; identica la nutrizione nelle due vasche. I vini a fine fermentazione presentavano i seguenti dati analitici:

	Ceppo A	KLIMA
Alcool % vol	15,32	14,66
Zuccheri g/L	< 1	< 1
pH	3,62	3,44
Ac. Totale g/L	6,01	8,77
Ac Malico g/L	1,91	2,03
Glicerolo g/L	9,7	15,01
Ac. Volatile g/L	0,31	0,29

Ancora una volta i valori riscontrati esprimono chiaramente i caratteri fermentativi di Zymaflore KLIMA che, in rapporto al testimone, ha espresso:

- Una diminuzione di etanolo di oltre lo 0,7 % vol
- Un aumento dall'acido malico di 0,1 g/L
- Un aumento di Ac. Totale molto marcata, di 2,6 g/L
- Un abbassamento del pH di oltre 0,15 punti.
- Un aumento nella concentrazione di Glicerolo

ZYMAFLORE® KLIMA

Il primo ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* acidificante ed a basso rendimento in alcol

Caratteristiche principali:

- Fase di latenza corta
- Cinetica fermentativa: regolare
- Fabbisogno in azoto: elevato
- Acidità volatile prodotta: molto bassa
- Acidità totale: produzione di acido malico e di altri acidi organici
- Produzione elevata di Glicerolo
- Bilancio SO₂: neutro o basso
- Impatto sensoriale: freschezza
- Grazie alla maggiore acidità e all'impatto sul pH si ha una migliore resa della SO₂ aggiunta

In questo caso il minor rendimento in alcool sembra in buona parte aver favorito la produzione di Glicerolo.

L'acidità totale è spiccatamente maggiore nel caso del Klima e l'acidità volatile è sostanzialmente confrontabile.

Nel corso del 2024 si è condotta una prova utilizzando un mosto di Glera base Prosecco, conservato come tale a freddo. Il mosto di partenza aveva una concentrazione zuccherina di circa 160 g/L, un pH di 3,50 ed un contenuto di acido malico di 3,32 g/L ed una acidità totale di 4,44 g/L. Il mosto suddiviso in più aliquote omogenee e confrontabili è stato da un lato inoculato con Zymaflore VL2 e dall'altro con Zymaflore Klima. La fermentazione è stata condotta ad una temperatura di 22°C e la nutrizione è stata identica nelle due tesi. I vini a fine fermentazione presentavano i seguenti dati analitici.

	KLIMA	VL2
Alcool % vol	9,68	9,81
Zuccheri g/L	0,5	0,5
pH	3,45	3,51
Ac. Totale g/L	5,96	5,02
Ac Malico g/L	3,10	2,78
Ac. Volatile g/L	0,15	0,14

Anche in questo caso, seppur un po' meno marcatamente, i dati analitici riscontrati vanno nella direzione delle proprietà enologiche promesse dallo Zymaflore Klima: minor alcol e maggiore acidità.

Questi caratteri, seppur meno evidenti all'analisi, lo sono molto alla degustazione, alla quale si percepiscono chiaramente maggiori doti di freschezza e verticalità, che rendono i vini sempre riconoscibili.

Un ceppo di lievito dunque particolarmente indicato nella lavorazione di mosti derivanti da uve che hanno sofferto i calori dell'estate 2024.

