# Filiera corta produttori fra Arno e Sieve

## Produzione in cantina di lieviti *starter* autoctoni **VICASTART**

PROGETTO SOTTOMISURA 16.2 PSR 2014-2020 della Regione Toscana

**<< Isolamento e caratterizzazione dei lieviti autoctoni della cantina VICAS >>**

Dr.ssa Eleonora Mari
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali
Università degli Studi di Firenze

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

# Isolamento e caratterizzazione dei lieviti autoctoni della cantina VICAS

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

Allestimento presso VICAS di vinificazioni spontanee per l'isolamento di lieviti *Saccharomyces cerevisiae*

**ANALISI MICROBIOLOGICHE** → Isolamento e purificazione colonie di *S. cerevisiae*

Individuazione dei ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente diversi dagli starter usati normalmente dalla cantina

**ANALISI MOLECOLARI**

- Identificazione a livello di specie delle colonie isolate
- Caratterizzazione intraspecifica degli isolati di *S.cerevisiae*

Scelta dei ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate

**FERMENTAZIONI IN BEUTA**

- Vigore fermentativo
- Produzione $SO_2$
- Prodotti di fermentazione

**SAGGI IN PIASTRA**

- Fattore killer
- Produzione acido solfidrico

# Azione 2.1: Allestimento presso VICAS di vinificazioni spontanee per l'isolamento di lieviti *Saccharomyces cerevisiae*

## 8 fermentazioni spontanee allestite in due momenti diversi

**Inizio periodo vendemmia**
**12 Settembre 2016**

⇩

Varietà **Merlot**

**4 serbatoi:**
**2 da 10 HL**
**2 da 25 HL**

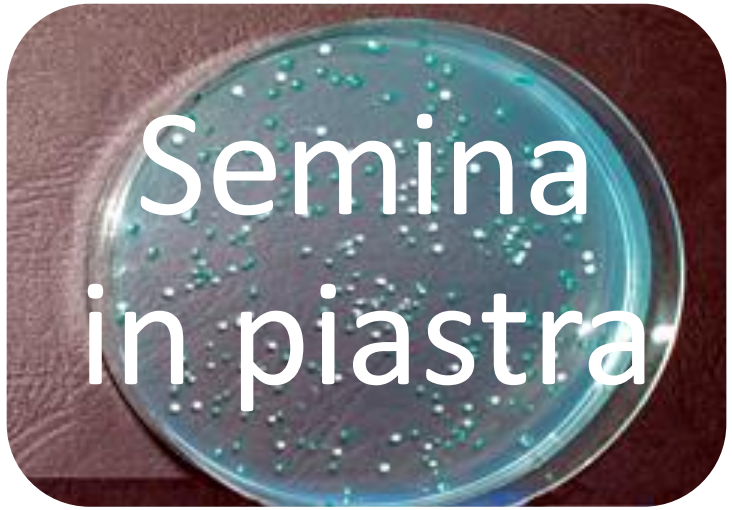
**In vendemmia**
**27 Settembre 2016**

⇩

**2 con varietà Canaiolo**
**2 con varietà Sangiovese**

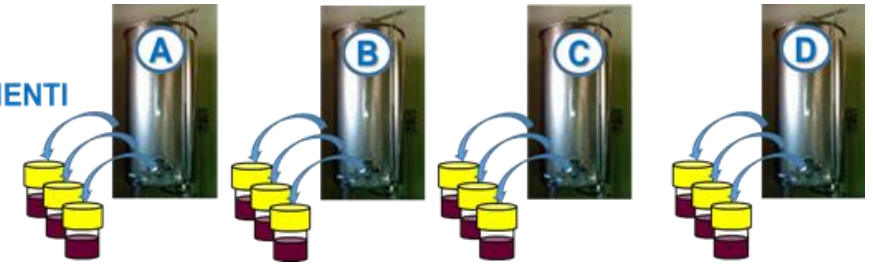
# Azione 2.2: Analisi microbiologiche dei mosti in fermentazione

Analisi microbiologiche → isolamento e purificazione colonie di *Saccharomyces cerevisiae*




- **Semina in piastra dei campioni di mosto/vino**

CAMPIONAMENTI




**LIEVITI**

**BATTERI LATTICI**

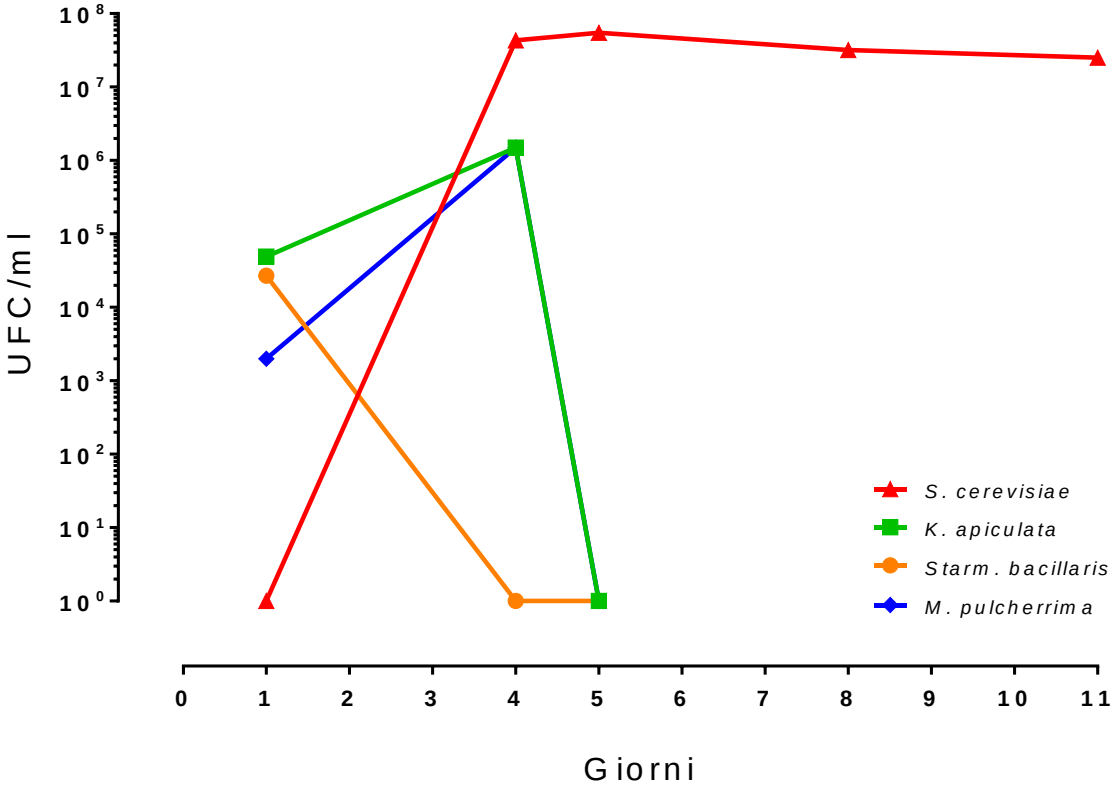
**BATTERI ACETICI**

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

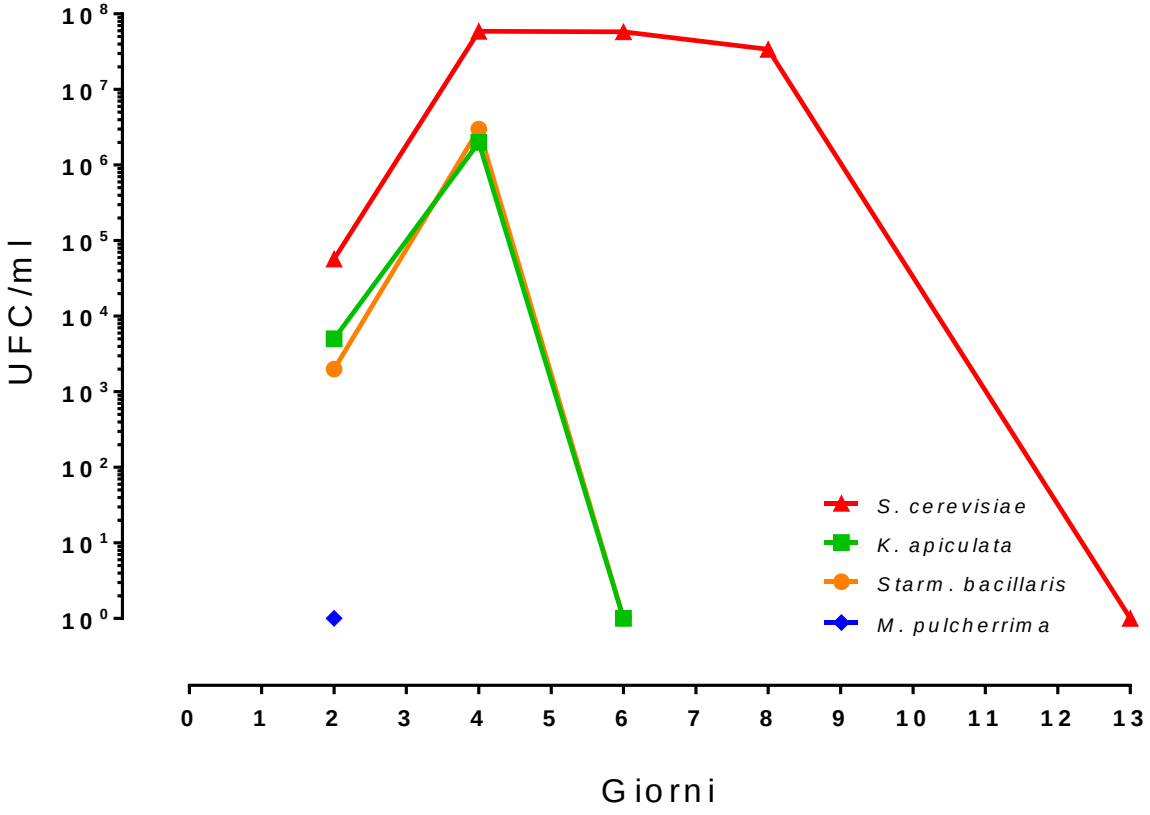
# Azione 2.2: Analisi microbiologiche dei mosti in fermentazione

## Andamento della popolazioni di lieviti (UFC/mL) presenti nel corso della fermentazione alcolica

**Batteri lattici**
**Batteri acetici** ➡ **Non rilevati o rilevati in concentrazioni trascurabili ( ≤ $10^2$)**




**Fermentazione spontanea B1**




**Fermentazione spontanea C2**

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

REGIONE TOSCANA

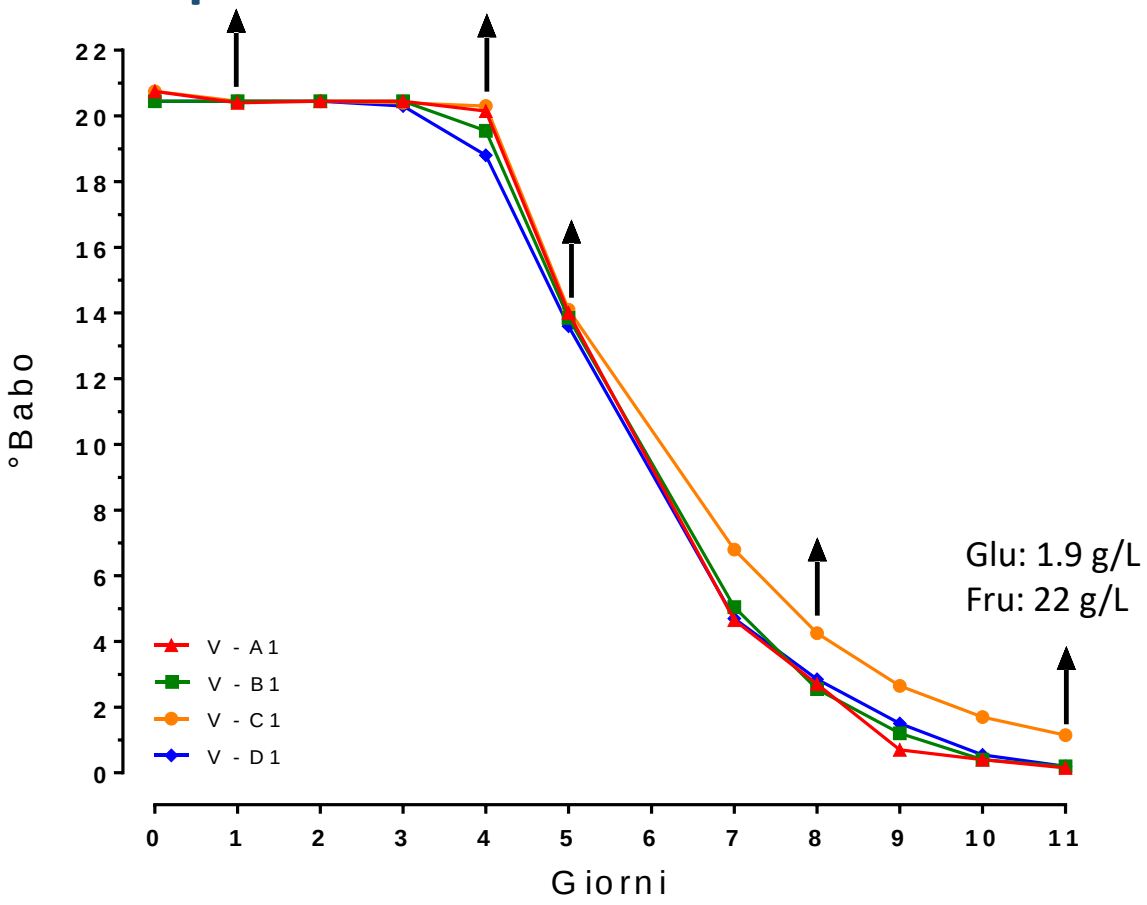
VITICOLTORI COLLINE ARNO SIEVE
VI.C.A.S PONTASSIEVE

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali

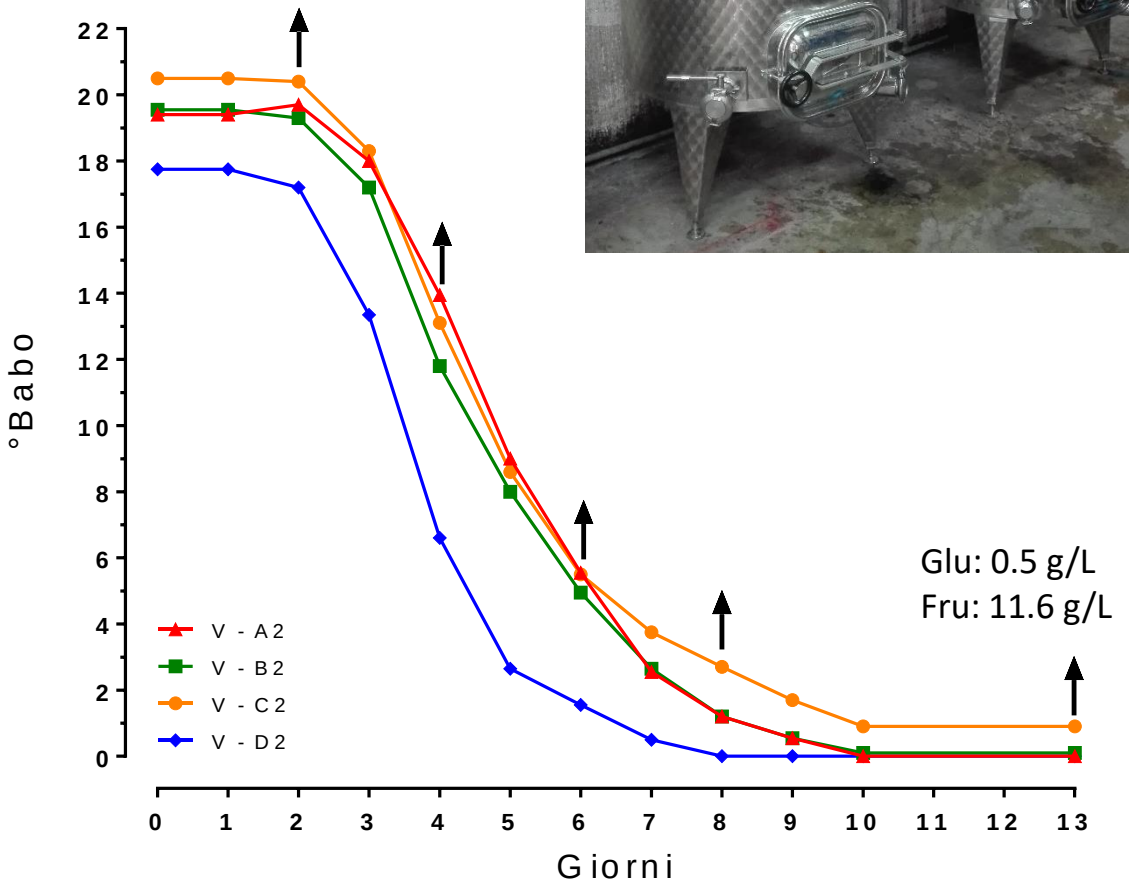
FOOD MICRO TEAM

# Azione 2.1: Allestimento presso VICAS di vinificazioni spontanee per l'isolamento di lieviti *Saccharomyces cerevisiae*




Fermentazioni spontanee allestite il **12 Settembre 2016**

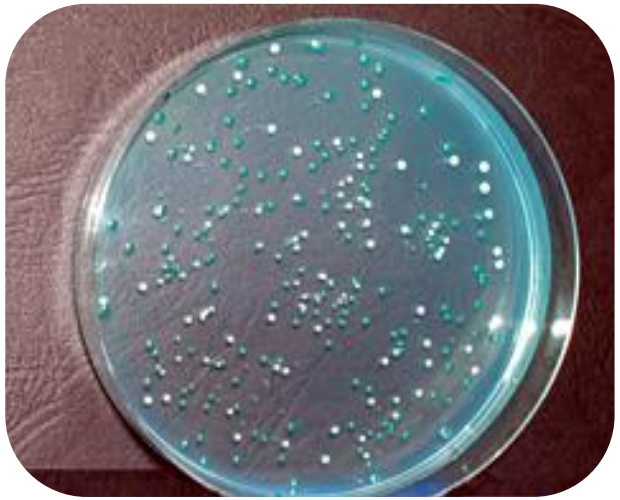
**Le frecce indicano i punti di prelievo dei campioni di mosto/vino per la ricerca dei lieviti *S. cerevisiae* autoctoni**

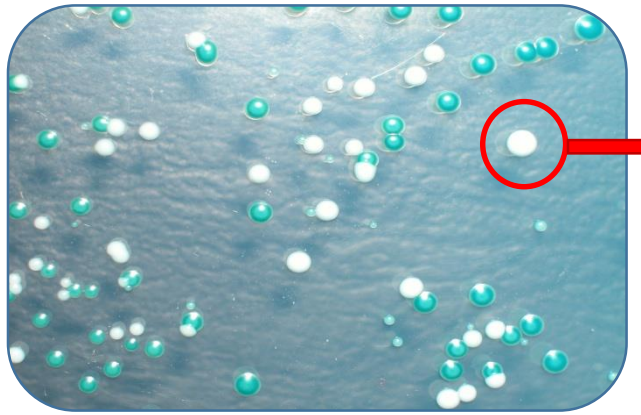



Fermentazioni spontanee allestite il **27 Settembre 2016**

# Azione 2.2: Analisi microbiologiche dei mosti in fermentazione

## Isolamento e purificazione colonie di *Saccharomyces cerevisiae*





## Strisci in piastra per ottenere colonie pure

**400 ISOLATI !!**

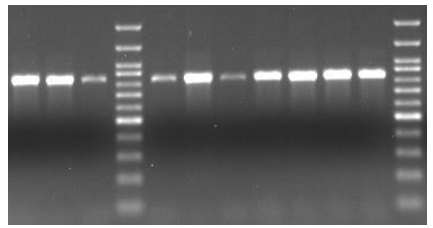
Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

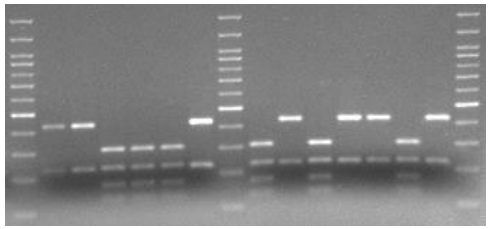
# Azione 3.1: Individuazione di ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente diversi dagli starter usati normalmente dalla cantina

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

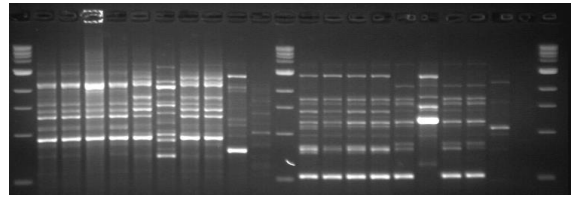
## FASI :

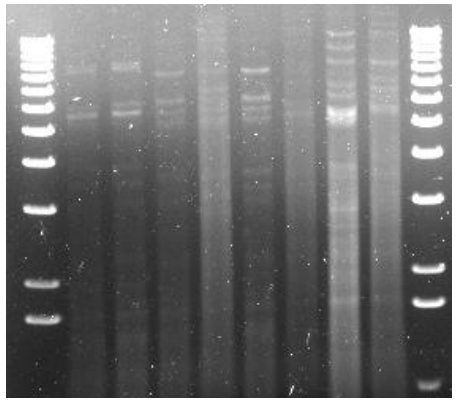
- Identificazione alla specie
  - Estrazione DNA
  - Amplificazione della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA
  - Digestione dell'amplicone ottenuto con enzimi di restrizione





- Caratterizzazione al ceppo
  - Amplificazione delle regioni interδ del DNA
  - Analisi dei profili di restrizione del DNA mitocondriale





**Profili genetici diversi = CEPPI DIVERSI**

REGIONE TOSCANA

VITICOLTORI COLLINE ARNO SIEVE
VI.C.A.S PONTASSIEVE

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali

FOOD MICRO TEAM

# Azione 3.1: Individuazione di ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente diversi dagli starter usati normalmente dalla cantina

## 12 CEPPI STARTER UTILIZZATI IN CANTINA

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| LALVIN | Icv okay<br>BM 45<br>BM 4X4 | ENARTIS | Red fruit<br>Top essence<br>Ferm AMR 01<br>Q citrus<br>Es 181 | LAFFORT | Zymaflore x 16<br>F 33 |
| AEB | fermol chardonnay | | | UVAFERM | bdx |

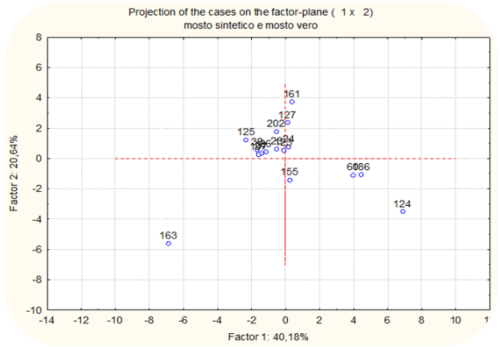
**400 ISOLATI ANALIZZATI**

**Trovati 18 ceppi di *S. cerevisiae* indigeni della cantina VICAS!!!**

# Azione 3.2: Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

- **Valutazione delle capacità fenotipiche e tecnologiche in micro-vinificazioni su mosto sintetico e d'uva**

- **Saggi in piastra per produzione acido solfidrico e fattore Killer**




- **Elaborazione statistica dei dati per scegliere 6 ceppi migliori**

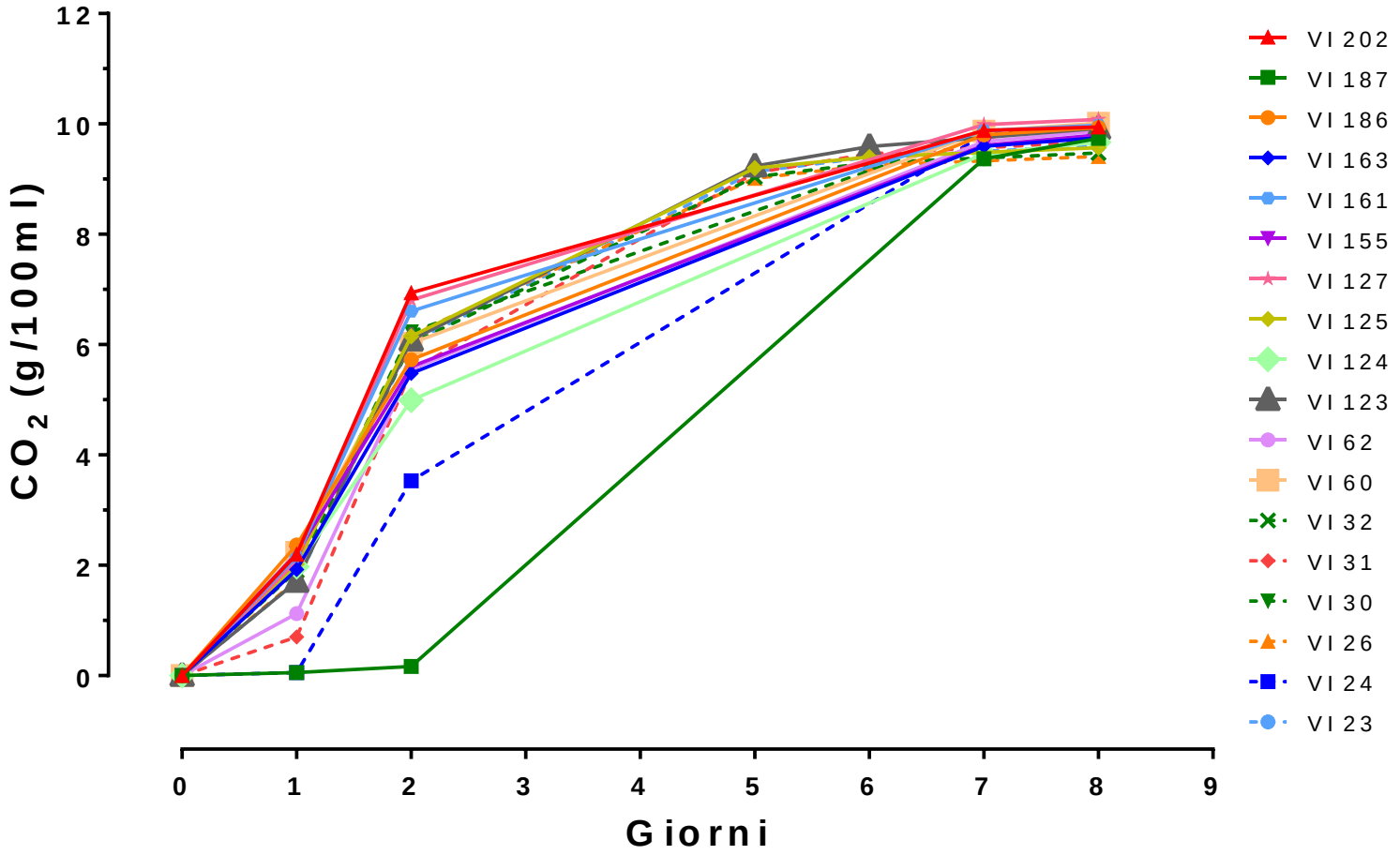
# Azione 3.2: Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate

## Composizione mosto

| | Mosto |
|---|---|
| Analisi chimico-fisiche | |
| pH | 3,37 |
| Acidità totale (g/l) | 4,43 |
| Acido malico enzimatico (g/l) | 1,50 |
| $SO_2$ libera (mg/l) | 0 |
| $SO_2$ combinata (mg/l) | 22 |
| Zuccheri (g/l) di cui: | 230 |
| Glucosio (g/l) | 121 |
| Fruttosio (g/l) | 109 |
| Azoto ammoniacale (mg/l) | 56 |
| Azoto aminoacidico (mg/l) | 117 |
| Analisi microbiologiche (conta su piastra) | |
| Lieviti (UFC/ml): | |
| *Kloeckera apiculata* | $1,1x10^4$ |
| *Starmerella bacillaris* | $3,5x10^3$ |
| Altri lieviti | $5,2x10^2$ |
| Batteri lattici (UFC/ml) | $2,0x10^3$ |
| Batteri acetici (UFC/ml) | $1,7x10^2$ |

- Capacità fermentativa
- Vigore fermentativo
- Produzione $SO_2$
- Prodotti di fermentazione: Etanolo, glicerina, acidi organici

## Andamento delle fermentazioni dei 18 ceppi indigeni in mosto d'uva



# Azione 3.2: Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

## Analisi chimiche (eseguite in doppio espresse come media) a fine fermentazione del Mosto d'uva

| Ceppo | Glucosio g/L | Fruttosio g/L | Acido lattico g/L | Glicerina g/L | Acido acetico g/L | Etanolo % | $SO_2$ mg/L |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 23 | 0,2 | 0,5 | 0,13 | 6,6 | 0,34 | 12,4 | 51 |
| 24 | 0,2 | 0,9 | 0,13 | 5,2 | 0,42 | 12,4 | 26 |
| 26 | 0,2 | 0,5 | 0,15 | 7,1 | 0,37 | 12,4 | 64 |
| 30 | 0,2 | 0,3 | 0,13 | 6,8 | 0,53 | 12,5 | 99 |
| 31 | 0,2 | 0,3 | 0,14 | 7,2 | 0,52 | 12,5 | 38 |
| 32 | 0,2 | 4,7 | 0,18 | 7,1 | 0,76 | 12,2 | 64 |
| 60 | 0,3 | 3,9 | 0,17 | 6,0 | 0,40 | 12,4 | 38 |
| 62 | 0,2 | 3,7 | 0,11 | 6,7 | 0,46 | 12,2 | 26 |
| 123 | 0,2 | 1,5 | 0,12 | 6,5 | 0,43 | 12,5 | 51 |
| 124 | 0,3 | 3,8 | 0,12 | 5,6 | 0,47 | 12,3 | 45 |
| 125 | 0,2 | 0,3 | 0,15 | 6,7 | 0,42 | 12,6 | 77 |
| 127 | 0,3 | 0,7 | 0,17 | 5,2 | 0,40 | 12,5 | 26 |
| 155 | 0,3 | 6,6 | 0,12 | 5,9 | 0,47 | 12,3 | 51 |
| 161 | 0,2 | 0,8 | 0,20 | 6,7 | 0,28 | 12,5 | 26 |
| 163 | 0,2 | 2,2 | 0,08 | 10,1 | 1,14 | 12,1 | 134 |
| 186 | 0,2 | 1,7 | 0,13 | 5,8 | 0,34 | 12,5 | 26 |
| 187 | 0,2 | 0,8 | 0,09 | 5,8 | 0,43 | 12,5 | 45 |
| 202 | 0,2 | 0,8 | 0,17 | 6,0 | 0,30 | 12,4 | 26 |

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

# Azione 3.2: Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

REGIONE TOSCANA

VITICOLTORI COLLINE ARNO SIEVE VI.C.A.S PONTASSIEVE

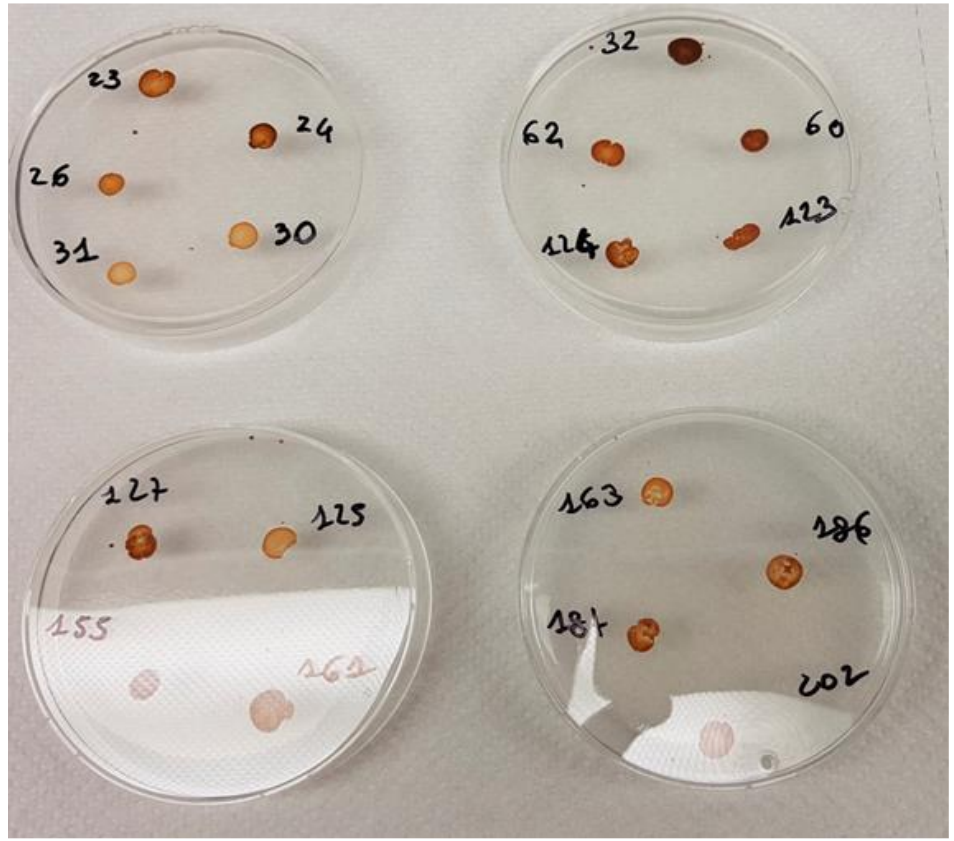
Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali

FOOD MICRO TEAM

## Saggio qualitativo in piastra per valutare la capacità dei ceppi a produrre acido solfidrico ($H_2S$)

| | $H_2S$ |
|---|---|
| VI 23 | + + |
| VI 24 | + + |
| VI 26 | + + |
| VI 30 | + |
| VI 31 | + |
| VI 32 | + + + |
| VI 60 | + + |
| VI 62 | + + |
| VI 123 | + + |
| VI 124 | + + |
| VI 125 | + |
| VI 127 | + + |
| VI 155 | + + |
| VI 161 | + + |
| VI 163 | + + |
| VI 186 | + + |
| VI 187 | + + |
| VI 202 | + + |



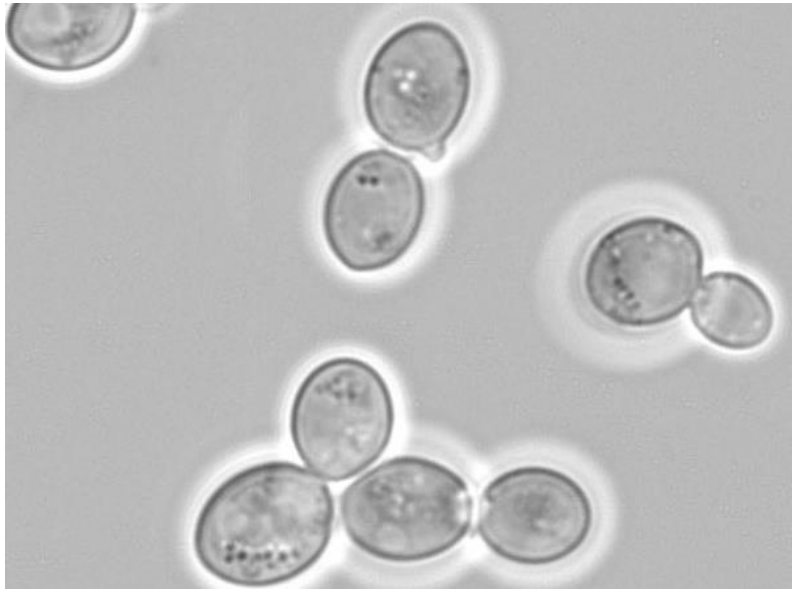
# Azione 3.2: Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

| Ceppo *S. cerevisiae* | Capacità fermentativa Zuccheri totali residui | Produzione Acido acetico | Produzione $SO_2$ | Vigore fermentativo | Produzione $H_2S$ | Origine varietale del ceppo di lievito |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VI 23 | ● | ● | ● | ● | ● | Merlot |
| VI 24 | ● | ● | ● | ● | | |
| VI 26 | ● | ● | ● | ● | ● | Merlot |
| VI 30 | ● | ● | | | | |
| VI 31 | ● | ● | | | | |
| VI 32 | ● | | | | | |
| VI 60 | ● | | | | | |
| VI 62 | ● | | | | | |
| VI 123 | ● | ● | ● | ● | ● | Sangiovese |
| VI 124 | ● | | | | | |
| VI 125 | ● | ● | ● | | | |
| VI 127 | ● | ● | ● | ● | ● | Sangiovese |
| VI 155 | ● | | | | | |
| VI 161 | ● | ● | ● | ● | ● | Sangiovese |
| VI 163 | ● | ● | | | | |
| VI 186 | ● | ● | ● | ● | ● | Canaiolo |
| VI 187 | ● | ● | ● | ● | | |
| VI 202 | ● | ● | ● | ● | ● | Sangiovese |

Legenda:
- Zuccheri totali residui a fine fermentazione ● zuccheri residui < 2 g/l,
-Acido acetico a fine fermentazione ● non produttore < 0,5 g/l
-Anidride solforosa a fine fermentazione ● non produttore <50 mg/l,
-Ridotto vigore fermentativo $CO_2$ prodotto a 48 h dall'inoculo ● buon vigore fermentativo > 6 g/100 ml,
-Acido solfidrico ● non produttore, ● basso produttore, ● alto produttore

# Sono stati selezionati 6 ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni di cantina

# VI23, VI123, VI127, VI161, VI186, VI202



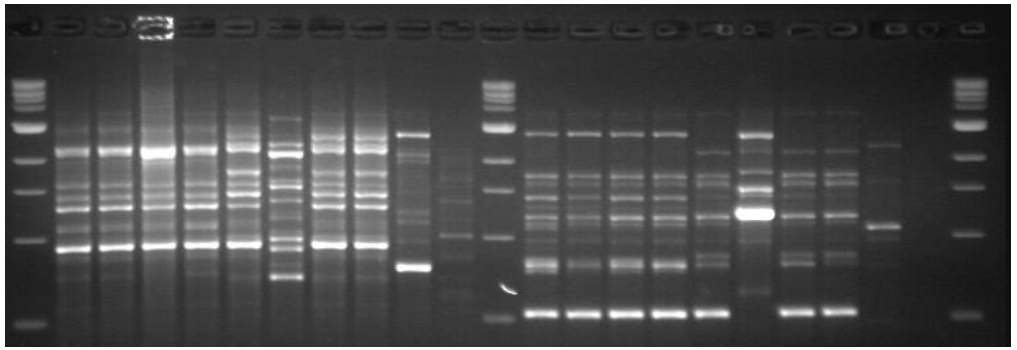
REGIONE TOSCANA

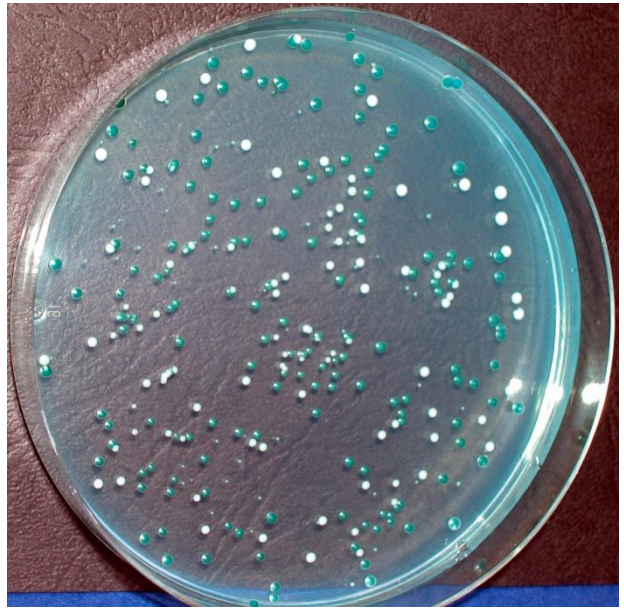
VITICOLTORI COLLINE ARNO SIEVE
VI.C.A.S PONTASSIEVE

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali

FOOD MICRO TEAM



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
GESAAF
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE