



FOOD  
MICRO  
TEAM



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE  
SPIN-OFF APPROVATO

REGIONE  
TOSCANA



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**GESAAF**

Dipartimento di  
Gestione dei Sistemi Agrari,  
Alimentari e Forestali

# 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

**«Individuazione di un protocollo per la produzione della biomassa di lieviti»**

**Dr. Giacomo Buscioni e Dr.ssa. Silvia Mangani**

**FoodMicroTeam SRL**

Spinoff accademico dell'Università degli Studi di Firenze



## Azione 5.3 Messa a punto della produzione di lievito (FoodMicroTeam)

Questa attività ha richiesto due unità di personale di FoodMicroTeam:  
il **Dr. Giacomo Buscioni** per la preparazione degli inoculi e l'esecuzione delle prove con l'impianto pilota,  
la **Dr.ssa Silvia Mangani** per eseguire le varie analisi ed elaborarle.  
Entrambe le unità di personale si sono interfacciate con il **Dr. Damiano Barbato** e **Prof. Alessandro Parenti (GESAAF)**





# Allestimento prove in Impianto Pilota da 120L

## 1- Elementi nutritivi: qualità e quantità e dosaggio

- ZUCCHERO - Mosto Concentrato Rettificato in cristalli:
  - Glucosio e Fruttosio come unici zuccheri
  - Rapporto G/F ~ 1
- Dose di 1 g/L ad ora
- Indurre alla respirazione *S. cerevisiae* per massimizzare la crescita della biomassa

### ➤ AZOTO:

Preparato commerciale con Azoto Inorganico & Tiamina

2 Preparati commerciali: Azoto Inorganico & Tiamina +  
Preparato da scorze di lievito (N organico)

**Preparato commerciale:**

**scorze di lievito (N organico) + Ammonio e Tiamina**

➤ **Dose 1,5 g/L**



## 2- Ciclo Produzione: Ore e volume

- 8 ore per 100L di coltura (in 2 fasi: 30L+70L)
- 24 ore per 100L di coltura(in 2 fasi: 30L+70L)

## 3- Ceppi *S. cerevisiae*:

- 2 ceppi provenienti da aziende di areali differenti per considerare la naturale differenza metabolica

## 4- Acidificazione iniziale:

usata per ridurre la contaminazione batterica e fornire nutriente inorganico.

- Acido Ortofosforico diluito 1:4



## 5- Condizioni di crescita:

### ➤ Temperatura:

sono microrganismi mesofili con un *optimum* di temperatura compresa fra i 25 e i 35 °C

- La temperatura scelta è stata di 28°C.

### ➤ Ossigeno:

Sono fermentatori facoltativi. In condizioni di aerobiosi la resa cellulare è molto superiore rispetto a quella che si ha in condizioni fermentative.

- L'aria, sterilizzata con filtro 0,2 µm, è stata insufflata attraverso un micro ossigenatore Parsec



Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

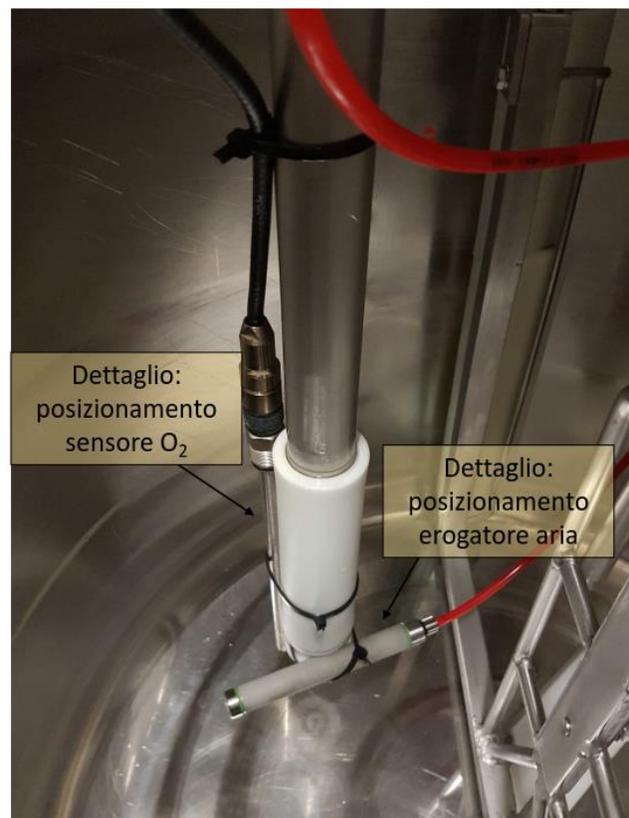


Ceppo	Durata prova (h)	Volume Coltura (iniziale-finale)	Fonte azotata	Concentrazione (g/L)	pH (iniziale-finale)	Tino inizio ciclo UFC/mL	Tino fine ciclo UFC/mL	Numero di generazioni finali
R6	24	30-100	Thiazote DAP	0,5 1	7,45-6	1,1x10 <sup>7</sup>	9,7x10 <sup>7</sup>	3,16
R6	24	30-100	Thiazote DAP NVS	0,5 1 1	7,43-5,65	1,2x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	3,22
R6	8	30-100	Thiazote NVS	0,5 0,4	5-3,27	1,0x10 <sup>7</sup>	7,5x10 <sup>7</sup>	2,85
R6	8	30-80	Thiazote	1	5-3,98	1,4x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	0,79
R6	8	30-80	NVS	0,4	5-4,54	1,2x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	1,28
FXII	8	30-100	Thiazote, NVS	0,5 0,4	5-3,33	1,5x10 <sup>7</sup>	6,0x10 <sup>7</sup>	1,98
R6	8	40-40	NVS	0,4	5-3,99	1,3x10 <sup>7</sup>	8,4x10 <sup>7</sup>	2,65
R6	8	40-40	NVS	1	5-4,1	1,4x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>8</sup>	2,87
FXII	8	30-100	NVS	1,5	5-3,27	1,1x10 <sup>7</sup>	7,3x10 <sup>7</sup>	2,59
FXII	8	30-110	NV	1,5	5-3,6	1,3x10 <sup>7</sup>	6,5x10 <sup>7</sup>	2,26
FXII	8	30-110	NV	1,5	5-3,5	1,5x10 <sup>7</sup>	6,2x10 <sup>7</sup>	2,04
FXII	8	30-110	NV	1,5	5-3,3	1,5x10 <sup>7</sup>	7,0x10 <sup>7</sup>	2,22



Pontassieve (FI), 16 marzo 2018

## Impianto Pilota 120 litri





# Protocollo produzione biomassa impianto pilota 120L

## 1) Fase sterile per la preparazione dell'inoculo

- PRIMO GIORNO: inoculo di una colonia in beuta da 100 mL contenente 50mL di YEPD (termostato 28°C per 24h).
- SECONDO GIORNO: trasferimento di 20 ml di coltura dalle beute da 100mL di coltura in 3 beute da 2L contenente 1L di YEPD a 28°C per 24h.
- TERZO GIORNO: inoculo (T0).

Pontassieve (FI), 16 marzo 2018



# Protocollo produzione biomassa impianto pilota 120L

## 2) Produzione della biomassa

**Durata:** 8h.

**Temperatura** ideale di crescita mantenuta durante tutta la produzione: 28 °C.

**Ossigeno** aggiunto tramite un micro dosatore con l'obiettivo di mantenere almeno il 50 % della saturazione totale del brodo di coltura per favorire un metabolismo respiratorio anziché fermentativo: 12,5 mg/L.

### 2a) Mezzo di coltura (start):

- immissione di 3 litri di coltura proveniente dalla fase sterile (partenza a circa 10- 15 milioni di cellule/mL).
- immissione di 27 litri di acqua trattata con UV a 60 L/h.
- aggiunta della fonte azotata Nutravit Lallemand (1,5 g/L).
- aggiunta di MCR solido (1 g/L).
- pH 5 corretto tramite acido ortofosforico 1:4.

### 2b) Mezzo di coltura (ogni ora):

- aggiunta di MCR solido con cadenza oraria (1 g/L per h).
- Monitoraggio pH, temperatura e ossigeno. Analisi microbiologiche tramite conte vitali in doppio attraverso la camera di Thoma. Analisi chimiche effettuate tramite HPLC.

### 2c) Mezzo di coltura (alla quarta ora):

- immissione di 70 litri di acqua trattata con UV a 60 L/h.
- aggiunta della fonte azotata Nutravit Lallemand (1,5 g/L).
- pH 5 corretto tramite acido ortofosforico 1:4.



# Protocollo produzione biomassa impianto pilota 120L

## 3) Raccolta

*Ottenimento della biomassa (circa 60-80 milioni di cellule/mL), raccolta e passaggio al separatore. La pasta deve avere un'umidità del 70%.*

*Centrifuga: verticale con dischi Bezzi 65589, giri/minuto 1400, portata brodo di coltura: 2 L/min.  
A fine ciclo (circa 100 litri di coltura) la pasta di lievito viene estratta manualmente dal tamburo interno e conservata in vasetti.*

## 4) Analisi di controllo da eseguire per accertarsi della qualità della biomassa

*Determinazione del numero di cellule per grammo di pasta di lievito, verifica della vitalità, verifica della specie e del ceppo, controllo microbiologico per quantificare microrganismi indesiderati (carica batterica totale e coliformi).  
Conservazione a + 4 °C.*

## 5) Sterilizzazione dell'impianto pilota

*Lavaggio e disinfezione effettuata con acido peracetico in concentrazione del 2%.*



Pontassieve (FI), 16 marzo 2018



## Ceppo Sc R6

ORA→	T0	1	2	3	4	4-T01	5	6	7	8
<b>Volume precoltura inoculata (L)</b>	3									
<b>Volume finale nel tino (L)</b>	30					100				100
<b>Aggiunte:</b>										
<b>Acqua (sterilizzata tramite UV) L</b>	27					70				
<b>NutraVit Start (Lallemand) (g/L)</b>	1,5					1,5				
<b>MCR solido (g/L)</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>Analisi:</b>										
<b>Cellule/mL</b>	1,0x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	9,6x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	5,3x10 <sup>7</sup>	7,2x10 <sup>7</sup>
<b>pH</b>	4,94	4,94	4,72	4,31	3,98	4,97	4,73	4,17	3,81	3,45
<b>Ossigeno (ppm)</b>	7660	6100	4690	3952	2800	6600	1350	630	450	150
<b>Temperatura (°C)</b>	17,3	25	28,7	27,3	27,5	20,4	25	28,1	28,2	28,3
<b>Glucosio (g/L)</b>	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,35	0,3	0,2	0,4
<b>Fruttosio (g/L)</b>	0,4	0,4	0,7	0,9	1	0,7	0,6	0,8	0,8	1,1
<b>Ammonio (g/L)</b>	0,1				0,078					
<b>Azoto aminoacidico (g/L)</b>	0,12				0,091	0,05				0,031
<b>Etanolo (%v/v)</b>	0,1	0,1	0,11	0,15	0,18	0,05	0,06	0,09	0,14	0,16
<b>Glicerina (g/L)</b>	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04
<b>Ac. Acetico (g/L)</b>	0	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,04	0,05	0,16





Pontassieve (FI), 16 marzo 2018



# Grazie per l'attenzione

FOOD  
MACRO  
TEAM



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE  
SPIN-OFF APPROVATO