



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

«Messa a punto dell'impianto per la produzione di lieviti autoctoni in cantina»

Dr. Damiano Barbato e Dott.ssa Giulia Angeloni
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali
Università degli Studi di Firenze

Villa Montepaldi, San Casciano Val Di Pesa (FI), 5 luglio 2018



Messa a punto della produzione di lievito

- Prove di crescita: impianto Pilota 120 litri
- Obiettivo: ottenere un protocollo di produzione della biomassa trasferibile a un prototipo utilizzabile in cantina



Villa Montepaldi, San Casciano Val Di
Pesa (FI), 5 luglio 2018





Elementi nutritivi

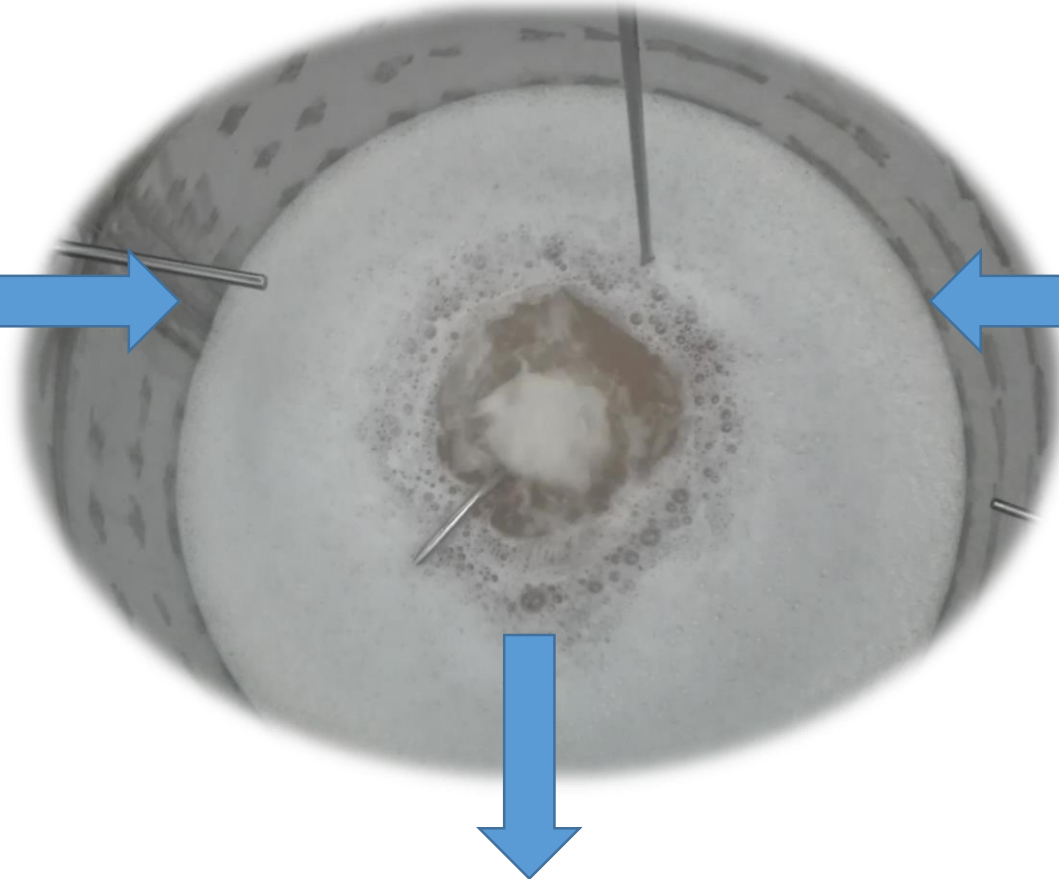
Preparato commerciale:

- N ammoniacale
- N aminoacidico
- Vitamine

Aggiunta unica al momento dell'inizio dei due cicli (dosaggio iniziale 1,5 gr/l)

MCR solido:
Zucchero d'uva cristallino di origine naturale.
Rapporto G/F ~ 1

Dosaggio continuo di 1 g/L ad ora per favorire la respirazione cellulare



- **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.
- **pH:** acidificazione iniziale usata per ridurre la contaminazione batterica e fornire nutriente inorganico con acido ortofosforico diluito 1:4.
- **Tempo:** ciclo di produzione di 24 h e 450 L di volume finale.



Protocollo di produzione lieviti autoctoni in cantina

FASE 1: Riempimento

- Riempimento automatizzato serbatoio con 90 litri di acqua della linea dell'acquedotto sterilizzata tramite lampada UV posizionata sulla linea in ingresso del serbatoio;
- Aggiunta manuale di composti azotati (Nutravit Lallemand 1,5 gr/l);
- Regolazione pH (5) con acido ortofosforico 1:4;
- Aggiunta manuale di 10 litri di coltura di lievito (protocollo cellule inoculo).

Totale litri coltura: 100. Durata: 20 minuti.

FASE 2: Start ciclo 1

- Dosaggio MCR automatico (1g/litro per ora)
- Agitazione mediante insufflazione di aria sterilizzata attraverso filtro 0,2 micron.
- Controllo Temperatura (se necessario scaldare o raffreddare in modo di mantenere una temperatura costante di circa 28°C)
- Monitoraggio attraverso specifiche sonde all'interno del serbatoio di pH, Temperatura (°C), Ossigeno disciolto (ppm/l).

Totale litri coltura: 100. Durata ciclo: 240 minuti.

FASE 3 Riempimento 2

- Riempimento automatizzato serbatoio con 350 litri di acqua della linea dell'acquedotto sterilizzata tramite lampada UV posizionata sulla linea in ingresso del serbatoio;

CHIAMATA OPERATORE:

- Aggiunta manuale di composti azotati (Nutravit Lallemand 1,5 gr/l);
- Regolazione pH (5) con acido ortofosforico 1:4;

Totale litri coltura: 450. Durata: 60 minuti.

FASE 4: Start ciclo 2

- Dosaggio MCR automatico (1g/litro per ora)
- Agitazione mediante insufflazione di aria sterilizzata attraverso filtro 0,2 micron.
- Controllo Temperatura (se necessario scaldare o raffreddare in modo di mantenere una temperatura costante di circa 28°C)
- Monitoraggio attraverso specifiche sonde all'interno del serbatoio di pH, Temperatura (°C), Ossigeno disciolto (ppm/l).

Totale litri coltura: 450. Durata ciclo: 900 minuti.

FASE 5: Raccolta

Separazione della biomassa dal brodo di coltura. Il passaggio alla centrifuga è garantito da una pompa dotata di inverter che immette attraverso una linea di tubazione il brodo di coltura all'interno della centrifuga ad una velocità costante di 6 l/min. A fine ciclo (circa 450 litri di coltura) la crema di lievito ottenuta viene estratta manualmente dal tamburo interno alla centrifuga e conservata in vasetti a 4°C.

Operazioni successive: determinazione del numero di cellule per grammo di pasta di lievito, verifica della vitalità, controllo microbiologico per la presenza di batteri totali e coliformi, determinazione dell'umidità.

Conservazione a +4 °C.

Durata operazione: 100 minuti.

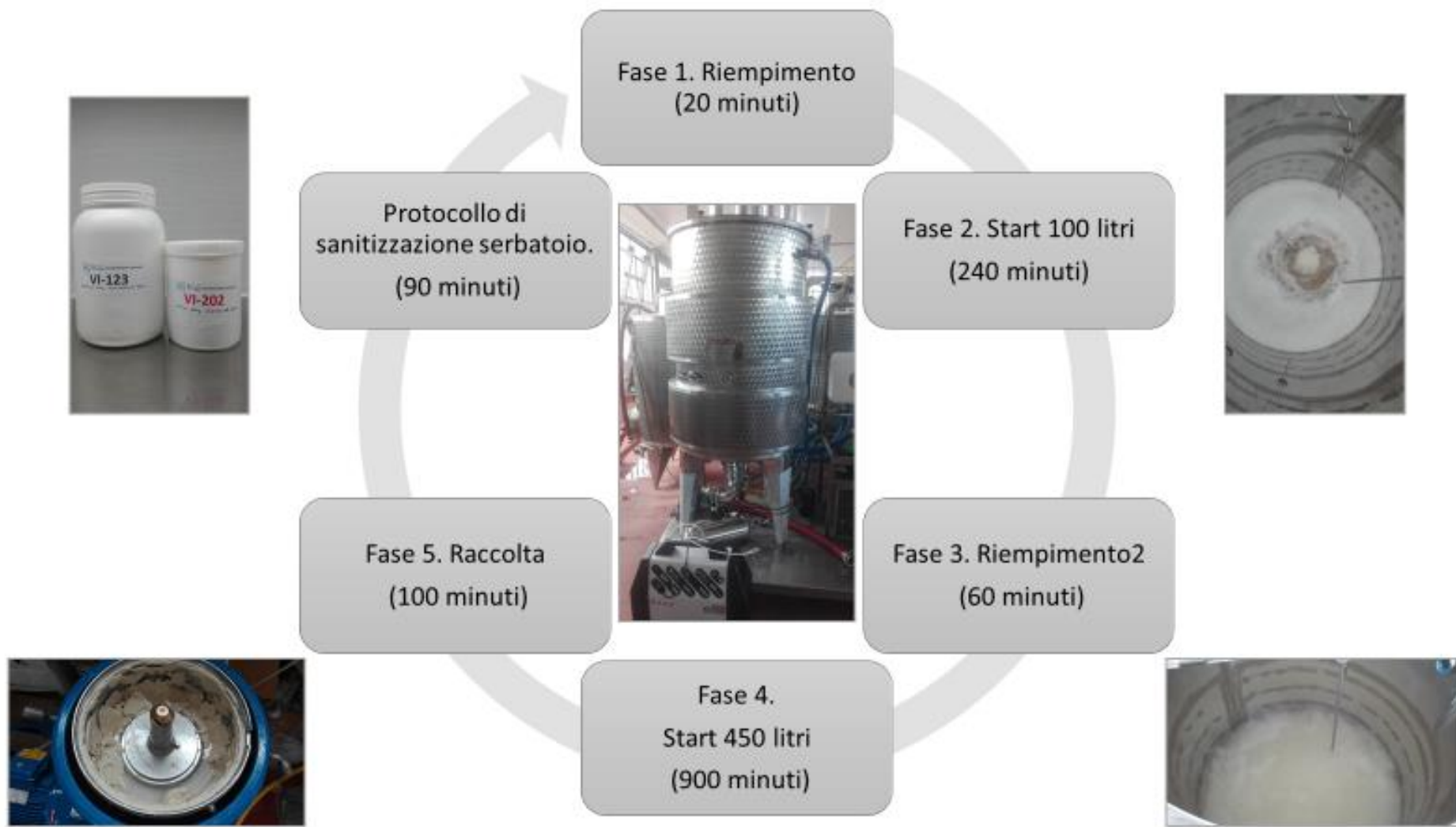
FASE 6: Protocollo sanitizzazione impianto

- 1) **START ciclo** → risciacquo automatizzato tramite acqua calda sterilizzata attraverso irraggiamento UV (3min.) effettuato dall'impianto di cui è dotato il fermentatore.
- 2) **END ciclo** → a termine del ciclo di produzione trattamento del fermentatore con acqua sterilizzata fredda attraverso irraggiamento UV, per risciacquo della linea con utilizzo per risciacquo della linea di scarico del serbatoio, tubazione pompa e centrifuga (5 minuti/ con circa 40 lt di acqua). Sanitizzazione: chiusura della linea di uscita manuale del serbatoio, inizio del riempimento del serbatoio per sanitizzazione con circa 450 lt di acqua. Aggiunta di acido peracetico per una concentrazione del 2 %. Tempo di sanitizzazione: 20 minuti. Svuotamento del serbatoio. Risciacquo ripetuto per tre volte con acqua calda sterilizzata attraverso irraggiamento UV (3min.).
- 3) **CENTRIFUGA** → (manuale) risciacquo delle componenti del separatore, immersione dei dischi del separatore in una soluzione contenente il 2 % di acido peracetico.



Schema riassuntivo del protocollo di produzione di lieviti autoctoni nella vendemmia 2017

Villa Montepaldi, San Casciano Val Di
Pesa (FI), 5 luglio 2018





Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

- I. Dosaggio dei nutrienti
- II. Valutazione di sistemi di aerazione della coltura
- III. Valutazione sui sistemi di raffreddamento
- IV. Valutazione del dimensionamento della pompa di mandata verso il separatore verticale.
- V. Valutazione di immissione di nuovi punti di prelievo
- VI. Messa a punto del ciclo di pulizia dell'impianto





Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

I. Dosaggio dei nutrienti

- Ridimensionamento del dosatore per aumento della seconda fase del ciclo da 8 a 15 ore di tempo.
- Scarico alternato (evitare stazionamento prolungato della polvere nella coclea di scarico).
- Aerazione mediante aria sterile (2 atm.) dello scarico del dosatore in continuo per veicolare il vapore in uscita dal fermentatore (evitare problematiche di scioglimento dello zucchero causato dal vapore all'interno del dosatore).



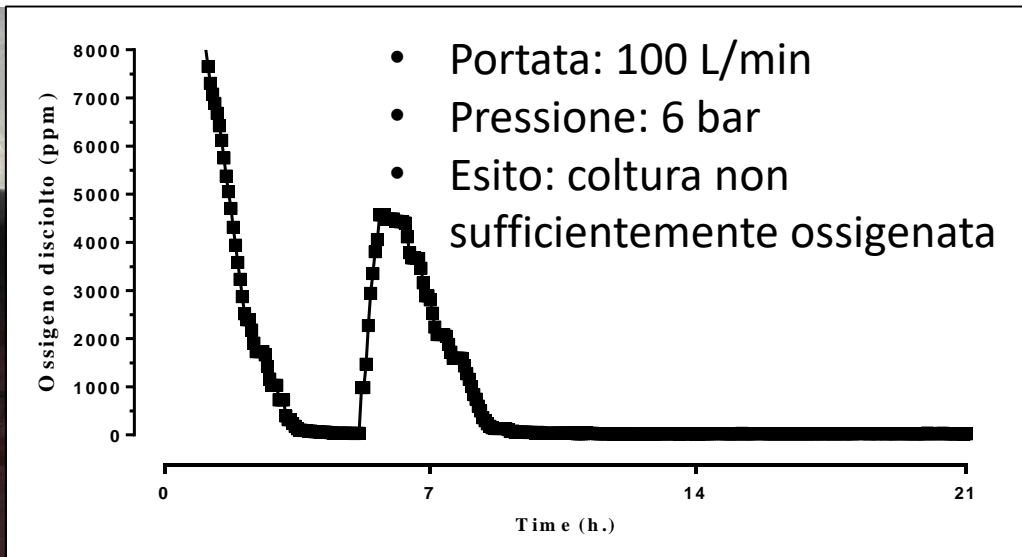


Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

II. Valutazione dei sistemi di aerazione della coltura



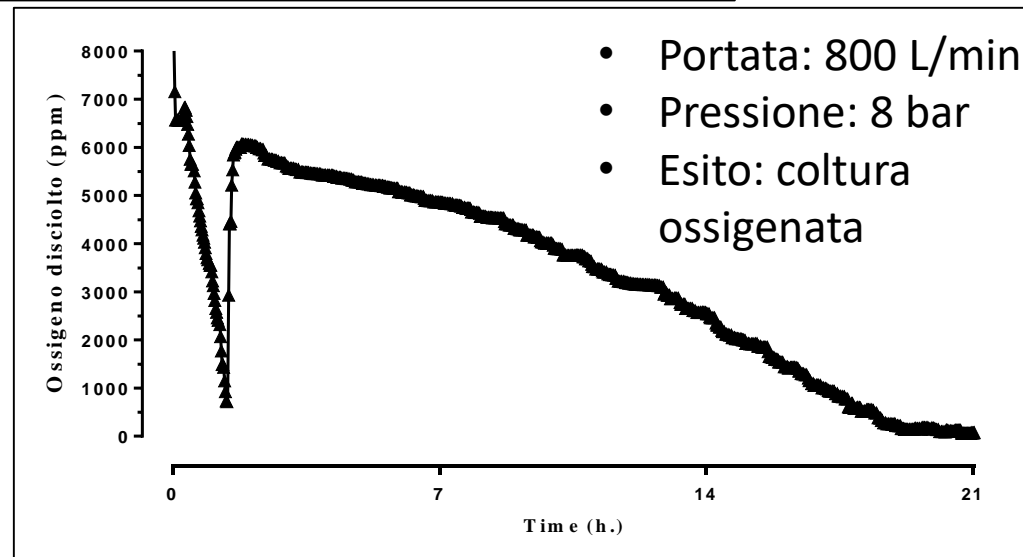
Villa Montepaldi, San Casciano Val Di
Pesa (FI), 5 luglio 2018



Funzionalità dell'aerazione:
- Ossigenazione

-Azione meccanica di omogeneizzazione

- Dispersione del calore





Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

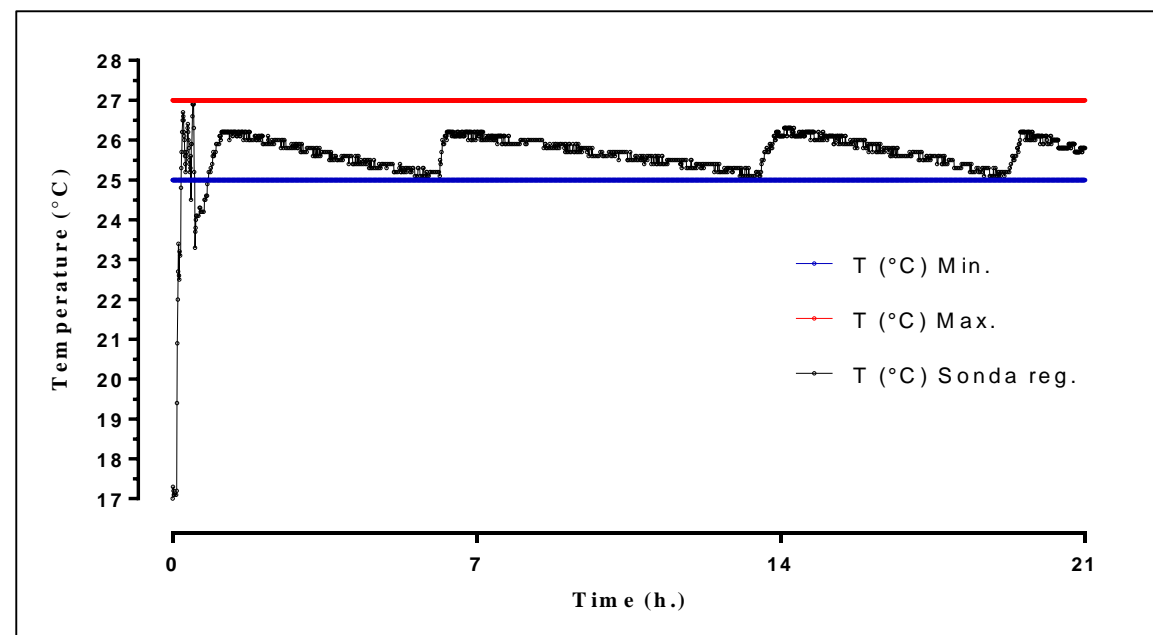
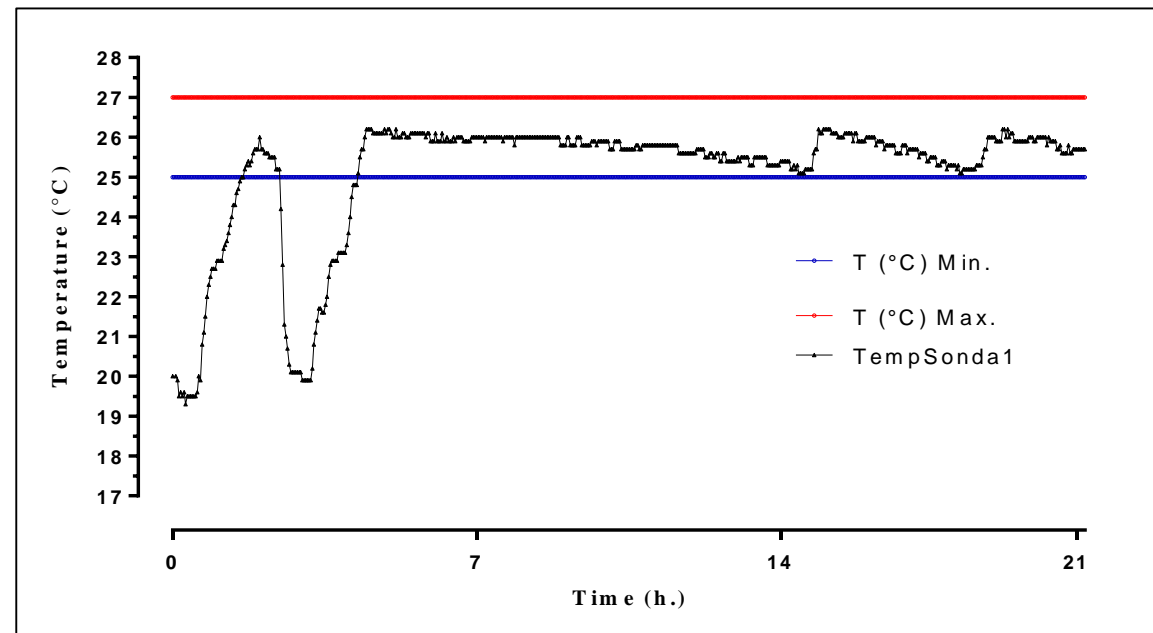
III. Valutazione sui sistemi di raffreddamento

ELIMINAZIONE DEL GRUPPO FRIGO

In entrambi i cicli di produzione:

- *Temperatura massima impostata 27 °C, temperatura minima impostata 25 °C.*
- *Utilizzata per 5 volte la fascia riscaldante.*
- *Mai stato utilizzato il raffreddamento.*

- Contenimento costi dell'impianto (ca. 10%)
- Raffreddamento biomassa garantito dal flusso continuo di aria per agitazione e ossigenazione (ulteriore vantaggio dell'utilizzo di agitazione mediante aria sterile è il minore rischio di contaminazione per la facilità di sanificazione rispetto all'uso di agitazione meccanica)





Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

IV. Valutazione del dimensionamento della pompa di mandata verso il separatore verticale.

- Portata del liquido di coltura in ingresso verso il separatore verticale in funzione del suo *optimum* di separazione (perdita < 2% a 360 L/h per un totale di 75 minuti per uno scarico completo del serbatoio).



V. Valutazione di immissione di nuovi punti di prelievo

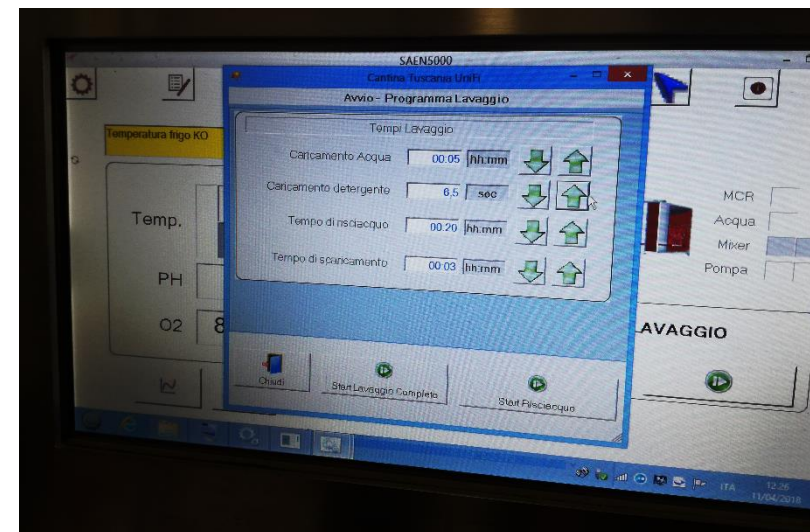
- Aggiunto un ulteriore rubinetto in modo da rendere possibile il prelievo della coltura di lieviti quando raggiunge la fase di 100 L



Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

VI. Messa a punto del ciclo di pulizia dell'impianto

- Completamente automatizzato



Composto da:

- Pompa centrifuga con funzionalità automatizzata di pescaggio del liquido sanificante
- Sistema di ricircolo durante il ciclo di lavaggio
- Scarico della soluzione a fine ciclo
- Ciclo di risciacquo utilizzando sempre acqua sanificata in ingresso attraverso il dispositivo UV.
- Sensore pH indicativo della corretta funzionalità dell'impianto di lavaggio.



Ottimizzazione del prototipo per la produzione di lieviti *starter* in cantina

Protocollo per l'igienizzazione dell'impianto

1. Riempimento del fermentatore con acqua trattata attraverso irraggiamento UV (40 L di acqua, **pH 7**)
2. Sanitizzazione: aggiunta automatizzata di acido peracetico per una concentrazione del 2 % (**pH 2,5**). Tempo di sanitizzazione: 30 minuti, con lavaggio in continuo. Svuotamento del serbatoio.
3. Risciacquo effettuato tramite riempimento automatizzato con circa 40 L di acqua sterilizzata tramite UV. Tempo di risciacquo: 30 minuti, con lavaggio in continuo (**pH 7**). Svuotamento del serbatoio.



Analisi microbiologiche acque di lavaggio: (fine ciclo)

Acqua sanitizzata UV risciacquo (L)	Concentrazione sanitizzante (%)	Totale microrganismi (UFC/L)	Totale lieviti (UFC/mL)	Totale coliformi (UFC/mL)
30	1	600	19	150
30	2	432	<10	<2
40	2	250	<10	<2



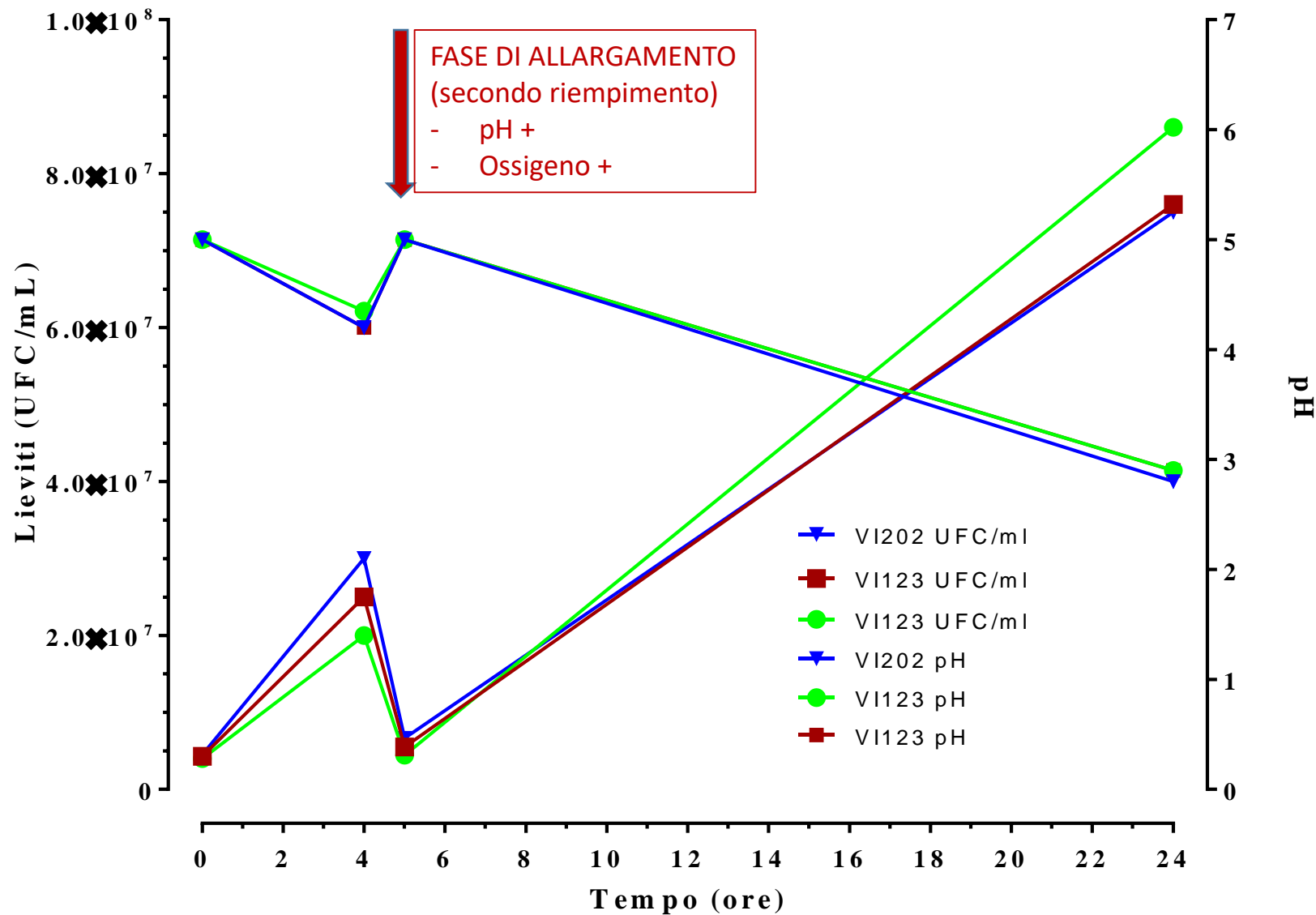
Villa Montepaldi, San Casciano Val Di
Pesa (FI), 5 luglio 2018



Produzione dei lieviti autoctoni per la vendemmia 2017

- Realizzate le produzioni di due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* autoctoni VI-123 e VI-202
- Produzione nel periodo precedente alla vendemmia (fine Agosto)
- Crema di lievito conservata a +4°C e pronta per l'inoculo di mosti della vendemmia 2017





Curva di crescita di *Saccharomyces cerevisiae* VI202 e VI123 (due produzioni) e andamento del pH durante la produzione di crema di lievito effettuata in cantina a settembre 2017.



Caratteristiche fisiche e microbiologiche della pasta di lievito vendemmia 2017, controllo microbiologico effettuato a 40 giorni dalla produzione in conservazione a +4°C.

Ceppo S.c.	VI202	VI123	VI123
Produzione (data)	5/9/2017	6/9/2017	7/9/2017
Durata prova (h)	24	24	24
Concentrazione finale lieviti nel brodo di coltura (cell/mL)	$7,5 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$
Pasta di lievito ottenuta (g/ciclo)	2000	2200	2000
Concentrazione pasta di lievito (cell/g)	$1,0 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$
Umidità pasta di lievito (%)	80	78	80
Carica batterica totale (cell/g)	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Coliformi totali (cell/g)	<10	<10	<10
Controllo shelf life (40 giorni +4°C)			
Mortalità cellule pasta di lievito (%)	5	5	5
Carica batterica totale (cell/g)	$2,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
Coliformi totali (cell/g)	<10	<10	<10





Villa Montepaldi, San Casciano Val Di
Pesa (FI), 5 luglio 2018



Grazie per l'attenzione

