

# PROGETTO SOTTOMISURA 16.2

## PSR 2014-2020 della Regione Toscana

### Annualità 2015

#### SOMMARIO DEL PROGETTO

Titolo progetto PIF di riferimento

Filiera corta produttori fra Arno e Sieve

Titolo e acronimo progetto sottomisura 16.2

Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni

Filiera/Settore di riferimento prevalente: Filiera corta

Priorità e Focus area prevalente: Priorità: 3 Focus: 3a

Forma di aggregazione del partenariato: ATS

Denominazione del soggetto responsabile del progetto di cooperazione: VICAS

**Obiettivi:**

Attualmente le aziende vitivinicole utilizzano, per la gestione delle fermentazioni alcoliche, lieviti starter commerciali con un impegno economico non trascurabile. L'impiego di starter, infatti, rende la gestione dei processi fermentativi più semplice prevenendo arresti indesiderati che spesso si verificano con le vinificazioni spontanee, quando non adeguatamente gestite e se la qualità dell'uva non è ottimale. E' anche vero però che l'utilizzo di questi preparati, selezionati spesso in realtà produttive distanti (Francia, Australia, Stati Uniti), riduce la biodiversità microbica e quindi anche le diversità tra un vino e l'altro a scapito della tipicità e del così detto *terroir* sul quale le produzioni vitivinicole toscane giocano molto in termini di promozione dei loro prodotti. Pertanto, lo scopo della presente misura 16.2 è quello di rendere la cantina in grado di prodursi in autonomia il proprio starter per condurre la fermentazione alcolica partendo da ceppi di lievito autoctoni selezionati per le caratteristiche enologiche desiderate. Per raggiungere questo scopo dovranno essere allestite una serie di vinificazioni spontanee nella cantina VICAS al fine di ottenere un numero significativo di ceppi autoctoni (indigeni, tipici della cantina) e ricorrenti (presenti in vinificazioni diverse, preferibilmente anche di annate diverse), tra questi dovranno poi essere selezionati quelli con le caratteristiche genetiche (analisi molecolari sul DNA totale e/o mitocondriale, elaborazione statistica per individuare i ceppi diversi tra loro e diversi dai ceppi commerciali) e enologiche desiderate (fermentazioni su mosto sintetico in beuta, scelta dei ceppi migliori mediante analisi statistica dei risultati di analisi chimiche e microbiologiche; microvinificazioni su mosto, scelta dei ceppi migliori mediante analisi statistica dei risultati di analisi chimiche, microbiologiche e organolettiche con panel addestrato). Dopodiché dovrà essere messo a punto un processo prototipale per la produzione dello starter direttamente in cantina in modo da ottenere una biomassa che sia non solo nelle quantità che dipendono dagli ettolitri di mosto da inoculare, ma che abbia anche le caratteristiche fisiologiche adeguate per garantire una fermentazione alcolica nei tempi e nei modi desiderati. La messa a punto del processo consisterà da un lato nella realizzazione di un impianto (costituito da un fermentatore, una serie di sensori da definire per tenere sotto controllo la coltura massiva delle cellule, una centrifuga per la raccolta della biomassa) dall'altro nella definizione di un protocollo di per la produzione della biomassa (definizione delle integrazioni da fare al mosto su cui coltivare il lievito, eventuale sanitizzazione del mosto, temperatura e tempi di coltura per il raggiungimento delle concentrazioni cellulari desiderate e della velocità di crescita adeguata, valutazione dello stato fisiologico delle cellule sulla base dei parametri prima descritti, elaborazioni statistiche dei dati ottenuti per valutare le differenze tra ceppi diversi e tra condizioni di crescita diversi per lo stesso ceppo, individuazione dei punti critici ed eventuali correzioni al processo).

**Azioni:**

Azione 1: "Gestione della rete di cooperazione e finanziaria"

Azione 2: "Materiali di partenza e logistica"

Azione 3: "Isolamento, identificazione e caratterizzazione dei lieviti"

Azione 4: "Selezione dei lieviti per l'impiego come starter"

Azione 5: "Messa a punto di un impianto per la produzione di lievito starter autoctono in cantina e del relativo processo prototipale di produzione"

Azione 6: "Fermentazione industriale del vino utilizzando lo starter autoctono prodotto in cantina"

Azione 7: "Divulgazione".

**Risultati e ricadute economiche e ambientali:**

Con questo progetto la cantina otterrebbe un vantaggio economico immediato (riduzione dei costi per l'acquisto di preparati starter) e allo stesso tempo avrebbe l'opportunità di diversificare il proprio prodotto ricercando la qualità e la tipicità desiderate. L'uso di lieviti selezionati ma autoctoni è un compromesso tra tradizione e conoscenza che si rende necessario per gestire in modo controllato la fermentazione alcolica riducendo i rischi di arresti del processo fermentativo senza però rinunciare alla tipicità dei prodotti finiti. Inoltre, la selezione di lieviti autoctoni dotati di particolari proprietà può rispondere anche a nuove esigenze dettate dalle caratteristiche dello specifico habitat in cui vanno ad operare. Un esempio di ciò sono i cambiamenti climatici registrati negli ultimi anni in Toscana che sono responsabili di un titolo alcolometrico potenziale delle uve più elevato che in passato (> 14% vol.). Questo aspetto rende necessario che i lieviti starter impiegati nella produzione di vino presentino un elevato potere alcoligeno.

Infine, rendere la cantina autosufficiente nella produzione dello starter è perfettamente in linea con l'idea di filiera corta, con tutti i vantaggi per l'ambiente che questo significa.

Da quanto detto risulta chiaro come le ricadute di questo progetto interessino prevalentemente il settore primario della produzione agricola.

Costo complessivo del progetto sottomisura 16.2: 335.000 Euro

Contributo richiesto (valore assoluto) sottomisura 16.2: 301.500 Euro

**TITOLO DEL PIF**

Filiera corta produttori fra Arno e Sieve

**ACRONIMO DEL PROGETTO SOTTOMISURA 16.2**

VICASart

**TITOLO DEL PROGETTO SOTTOMISURA 16.2**

Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni

**FILIERA / SETTORE DI RIFERIMENTO PREVALENTE**

- Olivo-oleicola
- Cerealicola e/o proteoleaginose
- Altre colture industriali (incluse colture da fibra, aromatiche-officinali)
- Bovina (carne e derivati e/o prodotti lattiero caseari)
- Ovi-caprina (carne e derivati e/o prodotti lattiero caseari)
- Apistica
- Altre filiere zootecniche (bufalina, suinicola, avinicola, equina, ecc.)
- Ortofrutticola, castanicola e piccoli frutti e funghi
- Vitivinicola
- Florovivaistica
- Foresta-legno ed energia
- Filiera corta/multifiliera

**PRIORITA' E FOCUS AREA DI RIFERIMENTO PREVALENTE**

- |                          |  |  |   |
|--------------------------|--|--|---|
| 2                        | 3  | 4  | 5   |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| a                        | a b  | a b c  | a c d e   |

**FORMA DI AGGREGAZIONE DEL PARTENARIATO SOTTOMISURA 16.2**

- ATI/ATS  ACCORDO DI COOPERAZIONE

Allegato:

- Accordo di cooperazione o ATI/ATS
- Impegno a sottoscrivere un accordo di cooperazione o un' ATI/ ATS

## SEZIONE I - ANAGRAFICA

### 1. Informazioni generali del soggetto responsabile del partenariato del progetto relativo alla sottomisura 16.2

*(può essere un soggetto diverso dal capofila del PIF)*

Denominazione dell'impresa responsabile del progetto	VI.C.A.S. - Viticoltori Colline Arno e Sieve
Persona fisica referente del progetto	Sauro Lucherelli
Via e numero	Via Tifariti, 12
Città - Provincia	Pontassieve (FI)
C.A.P.	50035
Telefono	39.055.8314020
Fax	+39.055.8367363
Indirizzo E-mail	<a href="mailto:info@vicas.it">info@vicas.it</a>
Indirizzo PEC	<a href="mailto:cantinasocialevi.c.a.s.soc.coop.a@cgn.legalmail.it">cantinasocialevi.c.a.s.soc.coop.a@cgn.legalmail.it</a>
C.F. e P. I.V.A.	P.IVA 01368820484

## 2. Informazioni sui partner di progetto

### 2.1 Tipo, natura e ruolo dei soggetti partecipanti al progetto

identificativo n.	Denominazione del partner	Codice PIF	Impresa agricola	Impresa di trasformazione di prodotti agricoli, agroalimentari e/o forestali	soggetti di diritto pubblico operanti nella produzione e trasferimento di ricerca, sviluppo e innovazione tecnologica, divulgazione	soggetti di diritto privato operanti nella produzione e trasferimento di ricerca, sviluppo e innovazione tecnologica, divulgazione	Impresa di seconda lavorazione	Operatori commerciali	Impresa meccanica	Impresa di servizi	Soggetto pubblico	Ruolo nel progetto
1	VI.C.A.S.	A1.1	X	x								Capofila
2	GESAAF Università di Firenze	A8.1			X							Gestione e ottimizzazione del processo di produzione dei lieviti starter dal punto di vista microbiologico ed impiantistico. Caratterizzazione chimica e sensoriale dei prodotti.
3	FoodMicroTeam Srl (FOODMICROTEAM)	A9.1								X		Trasferimento tecnologico per il miglioramento qualitativo e quantitativo delle produzioni agroalimentari.

### 2.2 Localizzazione fisica degli investimenti materiali

Non sono previsti investimenti materiale

### 3. Attività dei soggetti partecipanti

#### 3.1 Breve presentazione del soggetto responsabile

*Riportare la descrizione già presente nel formulario del PIF ed eventuali elementi aggiuntivi significativi per la sottomisura 16.2 (max 1 pagina)*

Cantina Sociale VI.C.A.S.

**TERRITORIO:** Il territorio che ha come sede la cantina si allunga idealmente, quasi per intero, sul percorso della statale Tosco-romagnola. Partendo dalla sede di Pontassieve, infatti, si dirama in direzione del mugello incontrando dapprima Rufina, antico e florido centro agricolo dominato dalla cinquecentesca villa di Poggio Reale, poi Londa e Dicomano, confluenze del fiume Comano con il fiume Sieve; in direzione del Casentino invece troviamo Pelago, Rignano, Reggello, Incisa ed infine, verso Firenze, Fiesole e Bagno a Ripoli: ognuno con una storia d'arte, di artigianato, di cultura, affascinante e originale. E' la storia di una terra vocata all'agricoltura e dell'arte, come a dire esperienze dell'uomo che diversamente ma intensamente mettono in gioco il suo ingegno e la sua tradizione.

**BREVE STORIA:** Nel 1964 viene fondata la Cooperativa, nel 1981 iniziano i lavori per la realizzazione della Cantina, nel 1984 viene fatta la prima vendemmia. Attualmente i circa 260 soci, piccoli e medi viticoltori, con una superficie vitata di circa 500 ettari impegnano con le loro uve la potenzialità produttive dell'azienda.

La capacità della Cantina è di 40.000 hl di vino, le attrezzature sono moderne e ad alta tecnologia, i serbatoi di acciaio inox, e permettono di ottenere, nel rispetto dei principi tradizionali di vinificazione, vini con caratteristiche evolute, adatti al mercato di oggi.

**VINIFICAZIONE:** Il mosto delle uve bianche ottenuto con una spremitura soffice viene collocato in serbatoi di acciaio inox controllando che la temperatura di fermentazione rimanga di 15-20 gradi. Le uve rosse destinate alla produzione del vino rosato vengono diraspate e, dopo una limitata sosta del mosto con le bucce per ottenere colore, profumo e caratteristiche di gusto, vengono pressate dolcemente ed il mosto ottenuto viene posto a fermentare seguendo lo stesso processo del mosto di uve bianche. Il vino Chianti viene prodotto secondo la migliore pratica enologica tradizionale, rimane in appositi recipienti in acciaio inox dove la fermentazione avviene a temperatura controllata per preservare tutti i profumi e gli aromi.

Il territorio che sta intorno alla Rufina, come pure quello dei Colli fiorentini, è da sempre luogo di elezione per vini straordinari. La particolarità del microclima, l'esposizione a solatio delle vigne, la natura stessa del terreno esaltano al qualità delle uve che tradizionalmente entrano nella composizione dei vini toscani.

**PRODUZIONE:** Dalla Cantina della nostra Cooperativa escono il Chianti

D.O.C.G. "PONTEMEDICEO" ricco di stoffa e personalità, il Chianti Rufina D.O.C.G.

"MONTULICO" un vino davvero unico, che dal Sangiovese e dal Canaiolo ottiene fragranza e corpo inimitabili; "BELLOSGUARDO" I.G.T. Toscana invecchiato 2 anni in barriques;

"BIANCOREALE" I.G.T. Toscana prodotto con uve Chardonnay e Pinot; Grappa prodotta con vinacce di Chianti Rufina; Vin Santo D.O.C. invecchiato 3 anni in caratello; infine i classici Bianco, Rosso e Rosato ad indicazione geografica tipica toscana ed il vino Novello,.

**VENDITA:** Vendita di vino esclusivamente di nostra produzione sfuso ed imbottigliato all'ingrosso ed al dettaglio, presso il centro vendita "Non Solo Vino", dove si possono trovare anche prodotti tipici della filiera corta agro-alimentare conferiti dai nostri Soci agricoltori, allevatori e artigiani del territorio.

### **3.2 Breve presentazione del/i soggetto/i scientifico/i partecipante/i**

*Elencare solo le attività e i lavori attinenti alla tematica innovativa proposta  
(max 1 pagina per partner)*

#### **GESAAF – UNIFI (Prof. Lisa Granchi e Prof. Alessandro Parenti)**

Il dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF) dell'Università degli Studi di Firenze, istituito con delibera congiunta Senato Accademico - Consiglio di Amministrazione del 17/05/2012, comprende attualmente 4 sezioni. Al presente progetto partecipano le due seguenti sezioni:

- 1- Sezione di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche
- 2- Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi

Nella "Sezione di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche", opera un gruppo di ricerca, coordinato dal Prof. M. Vincenzini e dalla Prof.ssa Lisa Granchi, che ha consolidata esperienza nello studio della eco-fisiologia, biochimica e biodiversità fenotipica e genotipica di microrganismi di interesse per il settore enologico. In particolare, da circa 20 anni, grazie alle molteplici convenzioni con prestigiose aziende vitivinicole presenti in Toscana e sul territorio nazionale, svolge attività di ricerca finalizzata allo studio della biodiversità dei lieviti indigeni nel processo di vinificazione mediante tecniche di caratterizzazione genomica e metabolomica. La sezione ha numerosi laboratori di base ed altamente specializzati per analisi chimiche, fisiche e biomolecolari per condurre ricerche di microbiologia di base e applicata.

L'attività di ricerca riguarda principalmente i seguenti settori:

- Innovazione di prodotto e di processo nelle produzioni di alimenti e bevande
- Ecologia microbica nei processi di produzione degli alimenti e bevande
- Selezione di microrganismi per l'impiego nel settore alimentare

Attualmente la Prof. Granchi è partner come responsabile scientifico del progetto "Sistemi innovativi per una tracciabilità molecolare integrata del Brunello di Montalcino" Regione Toscana PRAF 2012-2015: (periodo di svolgimento del progetto: 2014-2016).

Nella "Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi" opera un gruppo di ricerca coordinato dal prof. Alessandro Parenti che da anni è coinvolto in studi di Meccanica agraria. Le tematiche di ricerca della Meccanica agraria riguardano:

- le macchine e gli impianti per il comparto agricolo e forestale e per l'agroindustria, in relazione ai loro aspetti progettuali, costruttivi, funzionali, ambientali, energetici e di sicurezza ed ergonomia;
- le macchine e gli impianti per l'utilizzazione delle biomasse e per il recupero dei reflui agricoli e agro-industriali;
- l'automazione e il controllo dei processi agro-industriali;
- le tecniche per il progetto e la gestione del parco macchine aziendale;
- l'analisi energetica e ambientale dei biosistemi e i processi agroindustriali (LCA);
- l'utilizzazione di fonti energetiche rinnovabili e non rinnovabili e del risparmio energetico.

Tutti questi settori trovano tradizionalmente supporto e base fondamentale nelle conoscenze e nelle applicazioni derivanti dalle ricerche proprie della matematica, della fisica e dell'informatica.

A questi settori tradizionali se ne sono via via aggiunti altri, quali l'elettronica applicata all'agricoltura, l'informatica nelle sue diverse applicazioni, le scienze ingegneristiche applicate alla tutela dell'ambiente e del territorio, l'impiego di fonti energetiche alternative, il trattamento dei reflui ed altri ancora.

La Sezione di Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi è dotata di strutture finalizzate alle attività di ricerca quali officina meccanica, officina di idronomia e costruzioni, laboratori specializzati.

### **FoodMicroTeam S.r.l. (FOODMICROTEAM)**

FOODMICROTEAM è uno Spin Off accademico dell'Università degli Studi di Firenze (proponente prof. Massimo Vincenzini) che afferisce al dipartimento GESAAF (Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali). FOODMICROTEAM è una start up innovativa che fornisce assistenza tecnico scientifica per il controllo e la gestione delle fermentazioni alimentari, in particolare quelle vinarie. I soci lavoratori della società sono esperti, come dimostrano il loro curricula universitari e le pubblicazioni scientifiche di cui sono coautori, nella identificazione, caratterizzazione a livello di ceppo e selezione tecnologica di lieviti e batteri lattici autoctoni di cantina da impiegare in enologia. Hanno esperienza nella gestione di fermentatori per la produzione di biomassa e il loro impiego in cantina allo scopo di condurre la fermentazione alcolica.

### **3.3 Breve presentazione degli altri soggetti partecipanti**

*Descrivere l'esperienza maturata nel settore oggetto della proposta innovativa (max 1 pagina per partner)*

## **SEZIONE II - PROPOSTA DI PROGETTO**

### **4. Relazione introduttiva sullo stato dell'arte della ricerca e bibliografia relativa alla tematica oggetto dell'innovazione proposta**

#### **4.1 Stato dell'arte della ricerca che supporta l'innovazione proposta per il settore: fornire un quadro complessivo ed esaustivo (max 2 pagine)**

Negli ultimi anni, nel settore enologico, è stato registrato un incremento della richiesta di vini tipici come espressione di determinati territori vitivinicoli. Alla tipicità di un vino concorrono non solo le caratteristiche varietali dell'uva, ma anche la componente microbiologica ed in particolare i lieviti responsabili della fermentazione alcolica che, producendo metaboliti in quantità e rapporti relativi ceppo-specifici, influenzano le caratteristiche chimiche e organolettiche del vino finito. La diffusa pratica di inoculare il mosto con i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* attualmente in commercio (preparati starter), pur assicurando la

buona conduzione del processo fermentativo, non contribuisce alla diversificazione e valorizzazione del profilo sensoriale del prodotto finito dato che, spesso, tali ceppi sono isolati da ecosistemi differenti da quello in cui devono operare. Pertanto, per esaltare le peculiarità di un determinato vino, è stato recentemente proposto l'impiego di ceppi di lievito selezionati nella specifica area di produzione indicati come "lieviti autoctoni". A tale proposito, l'Accademia Italiana della Vite e del Vino definisce "ceppo vinario autoctono" un "ceppo selvaggio isolato in una cantina specifica nella quale è dominante, persistente nell'arco di una vendemmia e ricorrente per più annate" e che "utilizzato nella stessa cantina di isolamento è in grado di conferire al vino caratteristiche peculiari rispondenti alla tipologia del prodotto programmato" (Rivista internet di Viticoltura ed Enologia: [www.infowine.com](http://www.infowine.com); Prof. FARRIS G. A., 2010). In effetti, le molteplici indagini condotte sulla ecologia delle popolazioni di *S. cerevisiae* nelle fermentazioni vinarie spontanee, mediante tecniche molecolari in grado di effettuare una differenziazione a livello di ceppo, hanno evidenziato che, nonostante all'inizio della fermentazione si riscontri una elevata diversità di ceppi di *S. cerevisiae*, soltanto pochi, da uno a tre, dominano il processo fermentativo, svolgendo così un ruolo rilevante nel determinare le caratteristiche finali del vino. Alcuni di questi ceppi persistono anche in fermentazioni condotte in una stessa cantina in anni successivi per cui sono definiti "ricorrenti". Inoltre, è stato evidenziato che i ceppi di *S. cerevisiae* isolati da vinificazioni di una stessa cantina presentano una similarità tra loro maggiore rispetto a ceppi provenienti da altre cantine e che, soprattutto, sono molto diversi dai ceppi commerciali utilizzati come colture starter, indicando l'esistenza di una certa correlazione tra ceppo/i e cantina. Da un punto di vista ecologico si può supporre che nel tempo, nelle fermentazioni vinarie spontanee condotte in determinate cantine, alcuni ceppi di *S. cerevisiae*, in seguito ad una sorta di pressione selettiva, si adattino meglio di altri ad operare in un mosto le cui caratteristiche sono determinate, non solo dalla varietà dell'uva e dal *terroir*, ma anche dallo stile di vinificazione e dall'ambiente di cantina. A tale proposito, recenti indagini, condotte in cantine diverse dove è stata abbandonata la pratica dell'inoculo di lieviti commerciali per passare all'impiego di lieviti autoctoni, è stato evidenziato che l'insediamento di ceppi indigeni ha richiesto archi di tempo che andavano da due a cinque anni, a seconda dei casi. Pertanto, il presente progetto finalizzato alla produzione in cantina di ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni per la conduzione della fermentazione alcolica dovrà prevedere almeno due anni per l'isolamento e la caratterizzazione degli isolati per la selezione del ceppo/i più idonei.

#### **4.2 Illustrazione degli aspetti innovativi della proposta rispetto alla situazione attuale del settore (deve essere chiara la ricaduta sul settore di riferimento) (max 2 pagine)**

Attualmente le aziende vitivinicole utilizzano, per la gestione delle fermentazioni alcoliche, lieviti starter commerciali con un impegno economico non trascurabile. L'impiego di starter, infatti, rende la gestione dei processi fermentativi più semplice prevenendo arresti indesiderati che spesso si verificano con le vinificazioni spontanee, quando non adeguatamente gestite e se la qualità dell'uva non è ottimale. E' anche vero però che l'utilizzo di questi preparati, selezionati spesso in realtà produttive distanti (Francia, Australia, Stati Uniti), riduce la biodiversità microbica e quindi anche la diversità tra un vino e l'altro a scapito della tipicità e del così detto *terroir* sul quale le produzioni vitivinicole toscane giocano molto in termini di promozione dei loro prodotti.

Pertanto, l'idea di fondo del presente progetto è quella di mettere a punto un sistema che consenta alla cantina di sfruttare, a costi contenuti, i vantaggi dell'impiego di starter senza però dover rinunciare ad una gestione sicura ed alla tipicità del prodotto finito. Per realizzare ciò il presente progetto intende rendere la cantina autosufficiente, almeno per la produzione di vino di qualità superiore (DOCG), in termini di reperimento dello starter mediante:

1. la selezione di ceppi autoctoni con le caratteristiche enologiche desiderate;
2. la messa a punto un sistema composto da un fermentatore (per coltivare i ceppi selezionati) ed un sistema di raccolta delle cellule da inoculare direttamente in mosto.

In questo modo la cantina avrebbe un vantaggio economico immediato (riduzione dei costi per l'acquisto di preparati starter) e allo stesso tempo avrebbe l'opportunità di diversificare il proprio prodotto ricercando la qualità e la tipicità desiderate.

Da evidenziare il carattere innovativo della proposta in quanto solitamente gli starter non vengono prodotti in cantina, pertanto questo rappresenterebbe il primo tentativo in tal senso. E' importante anche sottolineare il fatto che una innovazione di processo di questo tipo rientra pienamente nell'ottica della filiera corta.

## 5. Descrizione della proposta progettuale

### 5.1 Illustrazione del/degli obiettivo/i del progetto: specifici, misurabili, coerenti con priorità e focus area (max 1 pagina)

Questo progetto intende promuovere il trasferimento di conoscenze e soprattutto l'innovazione nel settore vitivinicolo (Priorità di investimento 1) focalizzandosi non solo sulla realizzazione di un impianto innovativo per la produzione di starter direttamente in cantina, ma anche sul trasferimento delle conoscenze necessarie alla sua gestione (Focus area 1b). La prospettiva è quella di migliorare la produzione di vino di qualità nel rispetto della tipicità Toscana con possibili ricadute economiche favorevoli per la cantina e per i produttori primari.

Entrando nel dettaglio, il progetto ha lo scopo di rendere la cantina in grado di prodursi in autonomia il proprio starter di lievito *Saccharomyces cerevisiae* per condurre la fermentazione alcolica partendo da ceppi autoctoni selezionati per le caratteristiche enologiche desiderate.

Il progetto prevede quindi i seguenti step intermedi:

- a) Isolamento di lieviti da vinificazioni spontanee condotte in cantina di mosti ottenuti da uve provenienti dai diversi vigneti di Vi.C.A.S.
- b) Identificazione e caratterizzazione a livello di ceppo degli isolati di lievito appartenenti alla specie *S. cerevisiae*.
- c) Individuazione, nel corso dei due anni di indagine, dei ceppi di *S. cerevisiae* dominanti e/o ricorrenti
- d) Valutazione delle proprietà enologiche dei ceppi di *S. cerevisiae* dominanti mediante microvinificazioni.
- e) Realizzazione e messa a punto di un impianto (fermentatore, sistema di separazione, sensoristica di monitoraggio e controllo ed interfaccia utente) per la produzione del lievito autoctono direttamente in cantina.
- f) Valutazione delle proprietà enologiche del ceppo/i di *S. cerevisiae* selezionati mediante fermentazioni condotte nella cantina aziendale.

I ceppi scelti saranno conservati, fino a quando richiesto dalla cantina, presso la bio-banca di FoodMicroTeam (FoodMicroBank) in modo da mantenerli puri, vitali e disponibili per la sola cantina richiedente, ogni volta che sia necessario avviare una nuova produzione di starter.

### 5.2 Descrizione della coerenza fra gli obiettivi del progetto sottomisura 16.2 e i fabbisogni individuali nel PSR 2014-2020 e nella Smart Specialisation, indicazione del contributo alle priorità trasversali del PSR (vedi criterio I C) del par. 5 del bando PIF) (max 1 pagina)

Il presente progetto rientra prevalentemente nell'area prioritaria "Innovazione nel comparto dei prodotti alimentari per migliorare la qualità dei prodotti e per aumentare l'efficacia e l'efficienza dei processi produttivi", sostenendo un processo di trasferimento tecnologico e divulgazione secondo quanto evidenziato nelle così dette "azioni di sostegno". In merito alla "azione di sostegno" indicata, è importante sottolineare che i risultati del progetto sono pubblici e non di utilizzo esclusivo, l'azione divulgativa non si limita alla sola presentazione dei risultati del

progetto, ma è intesa come una costante presenza e interazione con il territorio. Per questo motivi sono previsti concreti incontri con i produttori per definire i parametri della maturità tecnologica e fenolica dell'uva da conferire alla cantina sociale, delle condizioni ottimali di conferimento perché la cantina Vi.C.A.S possa ottenere, nel rispetto dei principi tradizionali di vinificazione, vini dalle caratteristiche volute. Tenendo conto che Vi.CA.S è costituita da oltre 250 soci viticoltori della zona e che vinifica e commercializza in un'ampia zona del territorio della provincia di Firenze, la ricaduta territoriale è evidente. La cantina sociale infatti costituisce un caposaldo dell'economia agricola del territorio e un punto di riferimento per le piccole realtà che gestisce e valorizza.

In questo contesto il progetto contribuisce al modello toscano dello sviluppo sostenibile, anche attraverso l'utilizzo di tecnologie ICT che facilitino la comunicazione in tempo reale dello svolgimento e dei risultati del progetto (questo aspetto è dettagliato nel par. 9 Divulgazione). In un'ottica ambientale (area prioritaria: Agricoltura sostenibile), una finalità del progetto è anche quella di tutelare la biodiversità microbiologica dei vini e delle cantine del territorio affinché i ceppi autoctoni naturalmente presenti non finiscano per essere completamente sostituiti da ceppi commerciali introdotti prevalentemente da aziende estere. Negli ultimi anni, infatti, è stato evidenziato come l'uso di colture starter, solitamente selezionate in pochi paesi stranieri, abbia ridotto la biodiversità naturale dei lieviti di cantina concorrendo ad uniformare l'aroma e il gusto del vino e quindi compromettendo la possibilità di diversificare il prodotto finito sul mercato. Considerando che nel settore enologico italiano, attualmente, sia i produttori che i consumatori manifestano una crescente attenzione verso i vini di qualità che siano espressione di un determinato territorio e, quindi, riconoscibili sul mercato, appare fondamentale promuovere delle strategie per la valorizzazione delle produzioni locali. Pertanto, se da un lato produrre il vino impiegando le fermentazioni spontanee come veniva fatto in passato nel Chianti e in Toscana espone i produttori a rischi, dall'altro l'impiego di starter commerciali appiattisce le differenze tra i vini. L'uso di lieviti selezionati ma autoctoni è un compromesso tra tradizione e conoscenza che si rende necessario per gestire in modo controllato la fermentazione alcolica riducendo i rischi di arresti o di rallentamenti del processo fermentativo senza però rinunciare alla tipicità dei prodotti finiti. Inoltre, la selezione di lieviti autoctoni dotati di particolari proprietà può rispondere anche a nuove esigenze dettate dalle caratteristiche dello specifico habitat in cui vanno ad operare. Un esempio di ciò sono i cambiamenti climatici registrati negli ultimi anni in Toscana che sono responsabili di un titolo alcolometrico potenziale delle uve più elevato che in passato (> 14% vol.). Questo aspetto rende necessario che i lieviti starter impiegati nella produzione di vino presentino un elevato potere alcoligeno.

Da quanto detto risulta chiaro come le ricadute di questo progetto interessino prevalentemente il settore primario della produzione agricola.

### **5.3 Azioni progettuali**

*Descrizione consequenziale delle azioni progettuali. Per ogni azione deve essere inoltre indicato il soggetto attuatore (max 8 pagine)*

Qui di seguito si riportano le singole azioni progettuali, il soggetto attuatore e la tipologia di intervento.

Il progetto si sviluppa mediante la realizzazione nel biennio di attività di 7 distinte azioni, i cui obiettivi sono di seguito descritti:

Azione 1: "Gestione della rete di cooperazione e finanziaria"

Azione 2: "Materiali di partenza e logistica"

Azione 3: "Isolamento, identificazione e caratterizzazione dei lieviti"

Azione 4: "Selezione dei lieviti"

Azione 5: "Preparazione dei lieviti"

Azione 6: "Fermentazione industriale del vino"

Azione 7: "Divulgazione".

A sua volta ogni azione principale è suddivisa in azioni specifiche (A):

#### **AZIONE 1**

##### **GESTIONE DELLA RETE DI COOPERAZIONE E FINANZIARIA**

*A 1.1. costituzione della rete di cooperazione da parte del partner (VI.C.A.S.,d)*

Per la realizzazione del progetto tutti i soggetti stipuleranno un accordo di cooperazione per il periodo di svolgimento del progetto. (VI.C.A.S.,d)

*A 1.2: costituzione della rete di cooperazione da parte del partner (FOOD MICRO TEAM,d)*

*A 1.3: costituzione della rete di cooperazione da parte del partner (GESAAF,d)*

*A 1.4 attività di coordinamento; il soggetto preposto per il coordinamento è il soggetto VI.C.A.S.(VI.C.A.S.,d).*

*A 1.5: gestione del progetto e dell'attività finanziaria del soggetto FOOD MICRO TEAM (FOODMICROTEAM,d)*

*Premessa:* nella successiva programmazione del progetto bisognerà considerare che le unità di personale reclutate dal GESAAF, nonostante saranno scelte con le competenze e la formazione adeguate, saranno sottoposte a circa 3 settimane di training prima di poter operare nel progetto in modo da limitare il più possibile errori e incomprensioni.

#### **ATTIVITA' SVOLTE per Azione 1 nel I e II anno.**

Sono stati svolti incontri periodici frontali, telefonici e/o telematici (prevalentemente mail) tra la Cantina VICAS, FoodMicroTeam (Dr. Giacomo Buscioni, Dr.ssa Silvia Mangani) e il GESAAF (Prof.ssa Lisa Granchi, Prof. Alessandro Parenti e i vari borsisti e assegnisti che hanno partecipato al progetto).

Cantina VICAS, FoodMicroTeam (Dr. Giacomo Buscioni) e il GESAAF (Prof.ssa Lisa Granchi) hanno partecipato attivamente alla costituzione dell'ATS e alla predisposizione del materiale per la presentazione della domanda di aiuto.

Per FoodMicroTeam la gestione del progetto e dell'attività finanziaria è stata gestita dal Dr. Giacomo Buscioni.

Inoltre, tutti i partner sono stati adeguatamente assistiti per le seguenti attività:

- Consulenza per la costituzione dell'ATS;
- Consulenza per il rispetto di quanto previsto nel progetto e nel bando;
- Consulenza per l'attuazione del progetto;
- Coordinamento per il mantenimento dei rapporti tra i partner per l'esecuzione delle azioni di progetto;

- Assistenza e controllo delle relazioni previste per lo stato avanzamento del progetto,
- Consulenza per il rispetto della tempistica del progetto, per la gestione delle riunioni periodiche tra i partecipanti e degli eventi informativi;
- Predisposizione delle richieste di proroga e di adattamenti tecnici;
- Consulenza tecnica e finanziaria per la redazione delle domande di aiuto e di accertamento per saldo.

## *AZIONE 2 MATERIALI DI PARTENZA E LOGISTICA*

### *A 2.1 Prelievo dei mosti in fermentazione non inoculati da starter commerciali. VICAS*

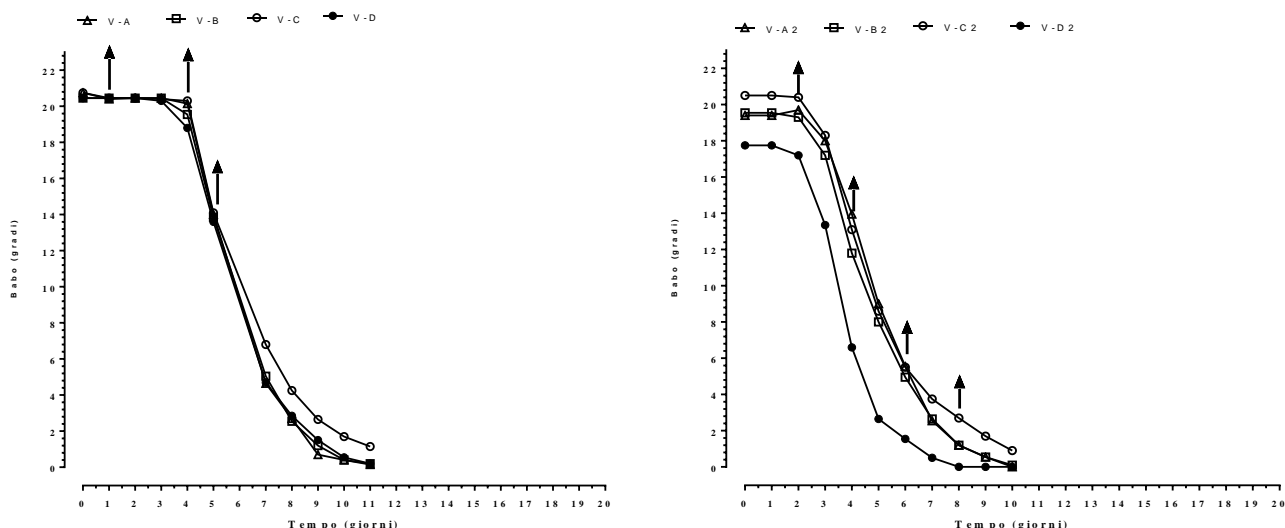
Fermentazioni naturali saranno allestite prima dell'avvio della attività di cantina vera e propria in modo da evitare il più possibile la contaminazione da starter commerciali normalmente utilizzati dall'azienda. Più in dettaglio, con l'assistenza di personale del GESAAF, saranno allestite 4 vinificazioni su merlot (2 da 20 hl e 2 da 25 hl) e 4 su sangiovese (2 da 20 hl e 2 da 25 hl). I tini di fermentazione saranno posizionati nella "barricaia" per limitare le contaminazioni da parte dei lieviti starter commerciali che solitamente l'Azienda VICAS impiega per condurre le vinificazioni commerciali. Le fermentazioni alcoliche saranno seguite da operatori della VICAS per quanto riguarda tutte le operazioni di cantina (allestimento, rimontaggi, ecc.), il prelievo dei campioni da analizzare chimicamente e microbiologicamente (tutti i campioni prelevati dovranno essere conservati in appositi contenitori, in particolare quelli per le analisi microbiologiche dovranno essere mantenuti in sterilità, dovranno essere conservati a temperatura di 4°C e debitamente siglati in modo da sapere ora, giorno e tino da cui provengono), la misura della temperatura e del grado Babo. I prelievi saranno eseguiti con frequenza e durata che dipenderanno dall'andamento della fermentazione (almeno 5 punti in doppio per ciascuna fermentazione). Personale del GESAAF si recherà a prendere i campioni prelevati di volta in volta per portarli in laboratorio (le analisi microbiologiche saranno eseguite dal GESAAF, le analisi chimiche da un laboratorio esterno).

## **ATTIVITA' SVOLTE per A 2.1 nel I anno**

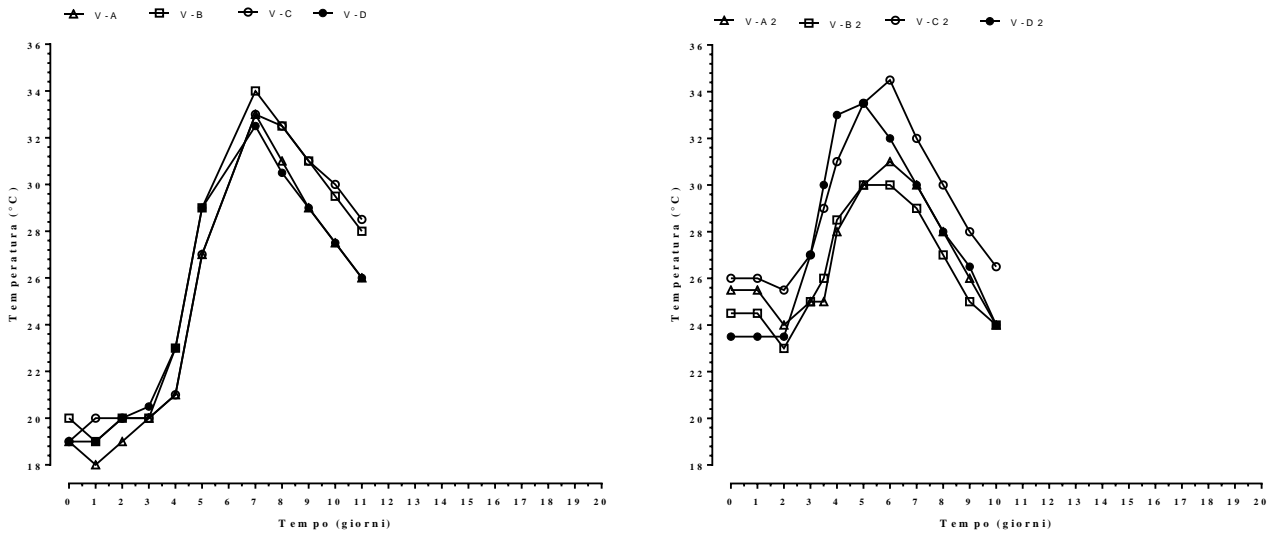
Nel I anno di attività, **fermentazioni spontanee** sono state allestite il 12 e il 27 Settembre, prima dell'avvio della attività di cantina vera e propria in occasione della vendemmia 2016. Questa precauzione è stata presa per evitare il più possibile la contaminazione da *starter* commerciali normalmente utilizzati dalla cantina. Più in dettaglio sono state allestite in totale 8 vinificazioni (V-A, V-B, V-C, V-D) di cui 4 con Merlot, 2 con Sangiovese e 2 con Canaiolo. Il progetto nella stesura iniziale prevedeva 4 vinificazioni con uva Sangiovese invece di 2 e non prevedeva l'impiego di uve Canaiolo. Questa variazione è stata necessaria per esigenze di cantina. Per l'allestimento delle fermentazioni sono stati noleggiati dalla VICAS 4 serbatoi al fine di ridurre al minimo la contaminazione dei lieviti presenti nell'ambiente di cantina e di dimensioni adeguate (due da 25 HL e due da 50 HL). Personale della VICAS è stato opportunamente istruito per effettuare una corretta gestione delle fermentazioni (mediante rimontaggi/follature giornalieri e monitoraggio di temperatura e gradazione zuccherina) e per effettuare in modo corretto i campionamenti di mosto/vino durante le quattro fermentazioni. In particolare, per le operazioni di rimontaggio, in un primo momento è stato impiegato un follatore per ciascun serbatoio in modo da evitare contaminazione crociata tra le diverse vinificazioni, ma non essendo risultato efficace ai fini della rottura del cappello, è stato sostituito con una pompa che è stata noleggiata dalla VICAS ed è stata dedicata esclusivamente per le necessità del progetto.

Chiaramente la pompa e le tubazioni sono state adeguatamente pulite prima di passare all'operazione di rimontaggio di ogni tino per evitare contaminazioni.

L'attività è stata condotta come previsto con i risultati attesi (Figure 1 e 2). In figura 3 sono riportati i 4 serbatoi (2 da 25 HL e 2 da 10 HL) noleggiati dalla VICAS ed impiegati nel I anno per la conduzione delle fermentazioni spontanee e nel II anno per la conduzione della fermentazione malolattica



**Figura 1:** Cinetica di degradazione degli zuccheri nelle 4 vinificazioni.



**Figura 2:** Andamento delle temperature nelle 4 vinificazioni.



**Figura 3.** Serbatoi impiegati per condurre le fermentazioni spontanee **nel I anno** e per la conduzione della fermentazione malolattica **il II anno**

Durante il I anno (vendemmia 2016) il personale della VICAS ha anche provveduto a congelare 200 L di mosto fiore Sangiovese, suddiviso in bag in box da 10 L, da utilizzare per le successive prove sperimentali. Il mosto è stato conservato in un congelatore presso la cantina VICAS fino al momento dell'utilizzo.

**ATTIVITA' SVOLTE per A 2.1 nel II anno**

Nel secondo anno (vendemmia 2017 – **fermentazione industriale**) non è stato possibile ripetere esattamente nello stesso modo l'attività a causa della siccità che ha impedito la

disponibilità di uve di qualità adeguata alla sperimentazione, come è possibile osservare nelle Figure 4 e 5.



**Figura 4.** Stato sanitario delle uve nel II anno (vendemmia 2017).



**Figura 5.** Stato sanitario delle uve nel II anno (vendemmia 2017).

Nel II anno, quindi, il personale della VICAS ha svolto le opportune operazioni di sanitizzazione dei vasi vinari (da 25 e 100 HL) necessari per l'allestimento delle fermentazioni condotte in cantina mediante inoculo dei ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni selezionati nel I anno del progetto; ha provveduto alla corretta gestione di tali fermentazioni mediante rimontaggi ed aggiunte di nutrienti per i lieviti; ed ha prelevato i campioni per le analisi chimiche e microbiologiche. Al termine della fermentazione alcolica, lo stesso personale ha effettuato, coadiuvato dal personale del GESAAF e di FoodMicroTeam, le operazioni di travaso in damigiane dei vini ottenuti nei serbatoi da 10 e 25 HL opportunamente sanitizzati; ha eseguito i campionamenti per il monitoraggio della fermentazione malolattica e, una volta completata, ha provveduto alla stabilizzazione del vino in cella frigorifera a 4°C. Successivamente, è stato effettuato l'imbottigliamento dei vini sperimentali ottenuti (ca 100 bottiglie).

Inoltre, il personale della VICAS è stato opportunamente formato per il corretto uso del fermentatore e della centrifuga messi a punto nei due anni di progetto per la produzione della biomassa dei lieviti autoctoni selezionati. Pertanto, al fine di istruire il personale della VICAS, diverse prove di produzione di lieviti sono state condotte presso la cantina dal personale del GESAAF e di FoodMicroTeam evidenziando le necessarie operazioni da effettuare sia durante il processo di produzione dei lieviti sia per la successiva separazione della biomassa tramite la centrifuga.

### *A 2.2 Analisi microbiologica dei mosti in fermentazione. GESAAF*

Campioni di mosto/vino saranno prelevati in vari punti delle 8 fermentazioni in modo da eseguire un monitoraggio chimico e microbiologico di queste (ogni fermentazione sarà campionata almeno in 5 punti e le analisi condotte in doppio per un totale di almeno 80 analisi chimiche per ciascuna tipologia secondo quanto riportato in A2.3 e 80 analisi microbiologiche). Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, dopo opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica, i campioni saranno seminati su piastre contenenti un mezzo selettivo e differenziale per i lieviti (WL agar con inibitori per muffe). I campioni saranno anche seminati su mezzi selettivi per batteri lattici (MRS agar in anaerobiosi), lieviti non-*Saccharomyces* (AL agar), muffe (WL agar senza inibitori), batteri acetici (LF Agar) allo scopo di controllare il corretto svolgimento delle fermentazioni. Tutte le piastre saranno incubate in termostato per 3-7 giorni a 30°C e le colonie sviluppate saranno poi contate. Le colonie con la caratteristica forma corrispondente al genere *Saccharomyces* (bianche, umbonate, cremose) saranno purificate mediante strisci successivi sullo stesso mezzo. Le piastre saranno incubate per 3-5 giorni a 30°C. Una volta ottenute le colonie purificate ed eseguiti esami al microscopio ottico, queste saranno fatte crescere su un apposito mezzo di coltura liquido (YM o YEPD). Al raggiungimento della fase stazionaria precoce (valutata mediante analisi spettrofotometrica della torbidità) le cellule saranno centrifugate, lavate con soluzione fisiologica e risospese in un mezzo (YM o YEPD) contenente glicerolo al 50%. Le cellule saranno poi conservate a -80°C. Si prevede di conservare almeno 50 colonie per ciascuna delle fermentazioni allestite per un totale di 400 isolati.

Sarà allestito un database dove verrà riportato il nome dell'isolato, la data del campione da cui è stato prelevato, i risultati delle analisi chimiche del mosto/vino da cui proveniva. L'attività suddetta sarà svolta da una unità di personale del GESAAF. Ogni due settimane questa unità di personale dovrà relazionare (mediante report e/o presentazioni orali) al responsabile della ricerca prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF - Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche) e al prof. Alessandro Parenti (GESAAF - Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi) gli aggiornamenti riguardo lo svolgimento dei lavori. La presente attività sarà ripetuta in modo identico anche nella vendemmia 2017 per incrementare la quantità di lieviti autoctoni e tra questi individuare quelli ricorrenti.

#### **ATTIVITA' SVOLTE per A 2.2 nel I anno**

Durante il primo anno di attività sono state eseguite le analisi microbiologiche delle 8 fermentazioni spontanee (A2.1 I anno) per ottenere un numero significativo di isolati da conservare in glicerina a -80°C. I risultati delle analisi microbiologiche delle 8 fermentazioni campionate in 5 momenti diversi ciascun a sono riportate nelle tabelle 1 e 2. L'attività è stata condotta come previsto ottenendo i risultati attesi. L'attività è stata realizzata dalla Dr.ssa Eleonora Mari (Borsista GESAAF).

**Tabella 1:** risultati delle analisi microbiologiche nel corso delle varie fermentazioni.  
**Vasca A1 (Merlot)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>S. c. UFC/mL</b>	<b>K.a. UFC/mL</b>	<b>C.z. UFC/mL</b>	<b>Altri lieviti UFC/mL</b>	<b>Batteri acetici</b>	<b>Batteri lattici</b>
13/09	1	<10 <sup>3</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
16/09	4	1,3 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>	5,0 x 10 <sup>5</sup>	n.r.	300	n.r.
17/09	5	5,9 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
20/09	8	5,0 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
23/09	11	1,8 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

**Vasca B1 (Merlot)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>S. c. UFC/mL</b>	<b>K.a. UFC/mL</b>	<b>C.z. UFC/mL</b>	<b>M.p. UFC/mL</b>	<b>Batteri acetici</b>	<b>Batteri lattici</b>
13/09	1	<10 <sup>3</sup>	4,9 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	n.r.	n.r.
16/09	4	4,3 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>	60	n.r.
17/09	5	5,5 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
20/09	8	3,2 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
23/09	11	2,5 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

**Vasca C1 (Merlot)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>S. c. UFC/mL</b>	<b>K.a. UFC/mL</b>	<b>C.z. UFC/mL</b>	<b>Altri lieviti UFC/mL</b>	<b>Batteri acetici</b>	<b>Batteri lattici</b>
13/09	1	<10 <sup>3</sup>	2,2 x 10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
16/09	4	4,0 x 10 <sup>6</sup>	5,5 x 10 <sup>5</sup>	7,5 x 10 <sup>5</sup>	n.r.	150	n.r.
17/09	5	3,0 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
20/09	8	2,9 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
23/09	11	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

**Vasca D1 (Merlot)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>S. c. UFC/mL</b>	<b>K.a. UFC/mL</b>	<b>C.z. UFC/mL</b>	<b>Altri lieviti UFC/mL</b>	<b>Batteri acetici</b>	<b>Batteri lattici</b>
13/09	1	<10 <sup>3</sup>	9,0 x 10 <sup>2</sup>	9,1 x10 <sup>3</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
16/09	4	3,9x10 <sup>7</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	<10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>	330	n.r.
17/09	5	5,7x10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
20/09	8	3,5x10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
23/09		1,3x10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

n.r. = non rilevato (<10 UFC/mL), *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*, *K.a.* = *Kloeckera apiculata*, *C.z.* = *Candida zemplinina*, *M.p.* = *Metschnikowia pulcherrima* N.B. specie di lievito presunte in base alla morfologia ed al colore della colonia su terreno WL ed in base all'osservazione al microscopio ottico.

**Tabella 2:** risultati delle analisi microbiologiche nel corso delle varie fermentazioni**Vasca A2 (Canaiole)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b><i>S. c</i> UFC/mL</b>	<b><i>K.a</i> UFC/mL</b>	<b><i>C.z.</i> UFC/mL</b>	<b><i>Altri lieviti</i> UFC/mL</b>	<b><i>Batteri acetici</i></b>	<b><i>Batteri lattici</i></b>
29/09	2	n.r.	1,5 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup>	8,0 x10 <sup>4</sup>	n.r.	n.r.
01/10	4	9,2 x 10 <sup>7</sup>	9,0 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	8,0 x10 <sup>4</sup>	300	n.r.
03/10	6	8,9 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
05/10	8	6,1 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
10/10	13	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

**Vasca B2 (Canaiole)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b><i>S. c</i> UFC/mL</b>	<b><i>K.a</i> UFC/mL</b>	<b><i>C.z.</i> UFC/mL</b>	<b><i>Altri lieviti</i> UFC/mL</b>	<b><i>Batteri acetici</i></b>	<b><i>Batteri lattici</i></b>
29/09	2	n.r.	3,8 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
01/10	4	7,9 x 10 <sup>7</sup>	5,0 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x10 <sup>6</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
03/10	6	7,3 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
05/10	8	6,4 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
10/10	13	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	8

**Vasca C2 (Sangiovese)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b><i>S. c</i> UFC/mL</b>	<b><i>K.a</i> UFC/mL</b>	<b><i>C.z.</i> UFC/mL</b>	<b><i>Altri lieviti</i> UFC/mL</b>	<b><i>Batteri acetici</i></b>	<b><i>Batteri lattici</i></b>
29/09	2	5,7 x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x10 <sup>3</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
01/10	4	5,9 x 10 <sup>7</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	n.r.	n.r.	n.r.
03/10	6	5,8 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
05/10	8	3,4 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
10/10	13	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

**Vasca D2 (Sangiovese)**

<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b><i>S. c</i> UFC/mL</b>	<b><i>K.a</i> UFC/mL</b>	<b><i>C.z.</i> UFC/mL</b>	<b><i>Altri lieviti</i> UFC/mL</b>	<b><i>Batteri acetici</i></b>	<b><i>Batteri lattici</i></b>
29/09	2		2,6 x 10 <sup>6</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
01/10	4	6,9 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
03/10	6	5,1 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
05/10	8	3,0 x 10 <sup>7</sup>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
10/10	13	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

n.r. = non rilevato, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*, *K.a.* = *Kloeckera apiculata*, *C.z.* = *Candida zemplinina*.

N.B. specie di lievito presunte in base alla morfologia ed al colore della colonia su terreno WL ed in base all'osservazione al microscopio ottico.

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 2.2 nel II anno**

Nel II anno (vendemmia 2017) non è stato possibile allestire le fermentazioni spontanee previste dal progetto a causa della siccità che ha impedito la disponibilità di uve di qualità ed in quantità adeguate alla sperimentazione. Pertanto, nel II anno per ottenere altri lieviti autoctoni da confrontare con quelli saggiati nel I anno di sperimentazione, sono stati scelti, tra gli isolati conservati in glicerina, altri lieviti sfruttando le informazioni riportate nel database riguardo il momento di campionamento. Gli isolati scelti provenivano tutti da campioni di vino prelevati a fine fermentazione. Come nel primo anno, l'attività è stata condotta dalla **Dr.ssa Eleonora Mari** (Borsista GESAAF).

### *A 2.3 Analisi chimica dei mosti in fermentazione. GESAAF*

Un laboratorio esterno eseguirà le analisi chimiche dei mosti in fermentazione e dei vini per individuare il momento più adeguato per eseguire gli isolamenti dei lieviti (almeno a inizio, metà e fine fermentazione alcolica). Ogni fermentazione sarà campionata almeno in 5 punti e le analisi condotte in doppio per un totale di circa 80 analisi chimiche. I dati ottenuti saranno elaborati dal GESAAF e utilizzati per descrivere le cinetiche fermentative. I principali parametri studiati saranno la densità del mosto, il contenuto zuccherino differenziato in glucosio e fruttosio, il titolo alcolometrico volumico svolto, il contenuto di acidi organici, alcoli superiori, solforosa e aromi. I dati chimici e le loro elaborazioni saranno inseriti nel database dei lieviti allestito in occasione dell'attività 2.2 ad opera di una unità di personale del GESAAF. Ogni due settimane questa unità di personale dovrà relazionare (mediante report e/o presentazioni orali) al responsabile della ricerca prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF - Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche) gli aggiornamenti riguardo lo svolgimento dei lavori.

Le attività 2.1, 2.2, 2.3 saranno ripetute anche in vendemmia 2017 per incrementare la quantità di lieviti autoctoni e tra questi individuare quelli ricorrenti. Pertanto il numero delle analisi deve essere raddoppiato: 160 analisi chimiche (zuccheri, acidi organici, etanolo, anidride solforosa, acidità volatile, pH) 160 analisi microbiologiche (lieviti, batteri lattici, batteri acetici).

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 2.3 nel I anno**

Presso il laboratorio di Analytical srl sono state eseguite le analisi chimiche dei mosti in fermentazione nei serbatoi da 25 e 10 HL (tabelle 3 e 4) e dei vini (tabelle 5 e 6) per individuare il momento più adeguato per eseguire gli isolamenti dei lieviti (a inizio, metà e fine fermentazione alcolica). I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente e utilizzati per descrivere le cinetiche fermentative. Dopodiché sono stati inseriti i risultati ottenuti nel database dei lieviti allestito in occasione dell'attività 2.2 (I anno). L'attività è stata condotta come previsto con i risultati attesi. L'attività è stata realizzata dalla **Dr.ssa Eleonora Mari** (Borsista GESAAF)

Le attività 2.1 e 2.3 sono state ripetute il II anno di attività, mentre non è stato possibile ripetere la 2.2 nello stesso modo.

**Tabella 3:** Analisi chimiche del mosto utilizzato per le 4 fermentazioni (A1, B1, C1 e D1) allestite il 12 Settembre 2016 nei serbatoi da 10 e 25 HL.

Campione	Azoto- $\alpha$ -aminoacidico (mg/L)	Azoto ammoniacale (mg/L)	pH	Acidità totale (g/L)	Solforosa totale (mg/L)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)
<b>A1</b>	72	49	3,64	4,70	26	118	116
<b>B1</b>	62	47	3,57	4,4	19	118	116
<b>C1</b>	68	51	3,59	4,5	19	118	116
<b>D1</b>	68	49	3,52	4,7	38	116	114

**Tabella 4:** Analisi chimiche del mosto utilizzato per le 4 fermentazioni (A1, B1, C1 e D1) allestite il 27 Settembre 2016 nei serbatoi da 10 e 25 HL..

Campione	Azoto- $\alpha$ -aminoacidico (mg/L)	Azoto ammoniacale (mg/L)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Ac. acetico (g/L)
<b>A2</b>	47	65	107	114	1,2	0,2	nd
<b>B2</b>	46	63	105	110	0,35	1,4	nd
<b>C2</b>	38	38	106	110	nd	nd	nd
<b>D2</b>	88	55	102	99,5	0,20	1,0	0,05

**Tabella 5:** Risultati delle analisi chimiche nel corso delle varie fermentazioni.

Vasca A1						
Data	Tempo (giorni)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo v/v (%)	Glicerina (g/L)	Ac.acet (g/L)
13/09	1	118	116	n.r	n.r.	n.r.
16/09	4	103	109	1,0	1,5	0,09
17/09	5	53	83	5,1	5,5	0,15
20/09	8	3,5	27	11,2	8,5	0,20
23/09	11	0,1	8,1	12,7	9,3	0,27
Vasca B1						
Data	Tempo (giorni)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo v/v (%)	Glicerina (g/L)	Ac.acet (g/L)
13/09	1	118	116	n.r	n.r.	n.r.
16/09	4	94	104	1,5	2,2	0,08
17/09	5	48	80	5,4	5,8	0,15
20/09	8	3,7	32	11,2	8,6	0,17
23/09	11	0,2	10,5	12,4	10,5	0,26
Vasca C1						
Data	Tempo (giorni)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo v/v (%)	Glicerina (g/L)	Ac.acet (g/L)
13/09	1	118	116	n.r	n.r.	n.r.
16/09	4	113	113	0,3	0,5	n.r.
17/09	5	63	89	4,0	4,6	0,13
20/09	8	9,8	44	10,3	8,0	0,21
23/09	11	1,9	22	12,3	9,1	0,27
Vasca D1						
Data	Tempo (giorni)	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo v/v (%)	Glicerina (g/L)	Ac.acet (g/L)
13/09	1	116	114	n.r	n.r.	n.r.
16/09	4	89	102	2,0	2,8	0,10
17/09	5	47	79	5,6	5,9	0,12
20/09	8	4,4	32,5	11,1	8,6	0,20

**Tabella 6:** risultati delle analisi chimiche nel corso delle varie fermentazioni.

<b>Vasca A2 (Canaiolo)</b>						
<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>Glucosio (g/L)</b>	<b>Fruttosio (g/L)</b>	<b>Etanolo v/v (%)</b>	<b>Glicerina (g/L)</b>	<b>Ac. acetico (g/L)</b>
29/09	2	107	114	1,2	0,2	nr
01/10	4	60	88	4,4	5,8	0,16
03/10	6	12	45	9,8	8,5	0,23
05/10	8	1,6	17,6	11,6	9,6	0,28
10/10	13	nr	0,8	12,7	9,8	0,30
<b>Vasca B2 (Canaiolo)</b>						
<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>Glucosio (g/L)</b>	<b>Fruttosio (g/L)</b>	<b>Etanolo v/v (%)</b>	<b>Glicerina (g/L)</b>	<b>Ac. acetico (g/L)</b>
29/09	2	105	110	0,35	1,4	nr
01/10	4	51	75	5,4	6,7	0,16
03/10	6	11	39	10,0	9,1	0,24
05/10	8	1,4	15,2	11,7	9,9	0,26
10/10	13	nr	0,4	12,9	10,4	0,27
<b>Vasca C2 (Sangiovese)</b>						
<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>Glucosio (g/L)</b>	<b>Fruttosio (g/L)</b>	<b>Etanolo v/v (%)</b>	<b>Glicerina (g/L)</b>	<b>Ac. acetico (g/L)</b>
29/09	2	106	110	nr	nr	nr
01/10	4	54	84	5,3	6,0	0,22
03/10	6	15	50	9,5	8,1	0,29
05/10	8	4,9	30	11	8,9	0,35
10/10	13	0,5	11,6	12,7	9,0	0,31
<b>Vasca D2 (Sangiovese)</b>						
<b>Data</b>	<b>Tempo (giorni)</b>	<b>Glucosio (g/L)</b>	<b>Fruttosio (g/L)</b>	<b>Etanolo v/v (%)</b>	<b>Glicerina (g/L)</b>	<b>Ac. acetico (g/L)</b>
29/09	2	102	99,5	0,20	1,0	0,05
01/10	4	20	46	7,9	7,3	0,16
03/10	6	0,7	11,9	11,0	8,4	0,18
05/10	8	nr	1,7	11,5	8,8	0,18
10/10	13	nr	0,1	11,8	8,8	0,19

n.r. = non rilevabile

**AZIONE 3 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI LIEVITI****A 3.1 Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo (analisi microbiologiche e biomolecolari). GESAAF**

Le 400 colonie con la caratteristica forma umbonata corrispondente al genere *Saccharomyces* saranno riprese dalla glicerina effettuando strisci successivi su mezzo YM o YEPD. Una volta sviluppate le colonie (3-5 giorni a 30°) queste saranno analizzate mediante metodiche molecolari per arrivare ad individuarne la specie di appartenenza. Le colonie di lievito identificate come *S. cerevisiae* saranno caratterizzate a livello di ceppo mediante adeguate metodiche molecolari al fine di individuare un numero significativo di ceppi geneticamente diversi tra loro e diversi anche dai ceppi starter normalmente utilizzati dall'azienda. I ceppi autoctoni così individuati saranno conservati in glicerina a -80°C fino al momento del loro impiego e fino a quando l'azienda proponente desidera che vengano conservati (FoodMicroBank - servizio realizzato da FoodMicroTeam Srl). Più in dettaglio, il metodo impiegato per identificare a livello di specie gli isolati di lievito sarà quello di estrarre il DNA e di amplificare la regione ITS del rDNA utilizzando primer specie-specifici (metodo: PCR end point). L'amplicone ottenuto per ciascun isolato sarà digerito con enzimi di restrizione e fatto correre su un gel di agarosio contenente Bromuro di Etidio (intercalante del DNA che rende visibile quest'ultimo quando colpito da raggi UV). Al termine della corsa elettroforetica il gel illuminato con una lampada UV sarà fotografato con l'apposita telecamera e l'immagine acquisita da un software dedicato di immagini (da acquistare). I profili di restrizione ottenuti saranno confrontati con quelli del ceppo tipo di *Saccharomyces cerevisiae*, con la letteratura scientifica e con il database del GESAAF. Gli isolati che mostreranno il profilo atteso per *S. cerevisiae* potranno essere considerati appartenenti a questa specie. A questo punto gli isolati identificati come appartenenti alla specie *S. cerevisiae* saranno caratterizzati a livello di ceppo utilizzando due metodiche molecolari per essere certi di distinguere in modo sufficientemente preciso gli isolati a livello di ceppo: amplificazione delle regioni interdelta del DNA e analisi di restrizione del DNA mitocondriale. La prima è una tecnica che richiede, una volta ottenute le cellule, circa 2 giorni lavorativi per 20 isolati, la seconda invece per gli stessi isolati circa 7-10 giorni lavorativi ed è molto più laboriosa. In entrambe le metodiche il DNA viene estratto e quantificato. Nel caso della prima metodica il DNA viene amplificato con appositi primer utilizzando la PCR end point. Nel secondo caso invece il DNA mitocondriale viene direttamente digerito con enzimi di restrizione (in questo caso visto che non avviene l'amplificazione del DNA servono relativamente grandi quantità di cellule e quindi tempo per ottenerle). Una volta ottenuto l'amplicone nel primo caso o il DNA mitocondriale digerito nel secondo, sarà eseguita l'elettroforesi sul gel per ottenere i profili da confrontare con un software dedicato che sarà acquistato in occasione del progetto. Tale software consente di elaborare i profili genetici acquisiti come immagini mediante l'analisi dei cluster ed arrivare così ad individuare i ceppi autoctoni della cantina. L'analisi dei cluster infatti è una elaborazione statistica che consente di raggruppare i profili molecolari dei vari isolati in gruppi in base alla somiglianza genetica. E' ipotizzabile che isolati con profili molto simili siano lo stesso ceppo, il programma consente di calcolare una percentuale di somiglianza da utilizzare per capire se due isolati sono lo stesso ceppo oppure no. L'elaborazione statistica di tutti i profili ottenuti combinando le due tecniche fornirà un certo numero di ceppi. Questi ceppi saranno messi a confronto con i profili dei ceppi starter del commercio normalmente utilizzati dalla cantina per individuare quelli veramente autoctoni cioè tipici della cantina (indigeni). Le analisi molecolari sopra descritte e la loro elaborazione sarà condotta da una unità di personale del GESAAF che provvederà ad aggiornare il database dell'attività 2.2 anche con i profili genetici. Ogni due settimane questa

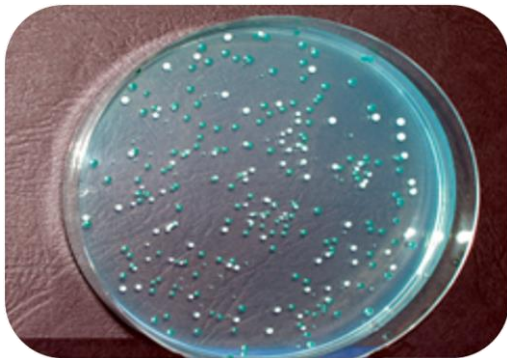
unità di personale dovrà relazionare (mediante report e/o presentazioni orali) al responsabile della ricerca prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF - Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche) gli aggiornamenti riguardo lo svolgimento dei lavori.

Infine, i ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* geneticamente diversi, dominanti e preferibilmente anche ricorrenti nelle varie fermentazioni analizzate saranno saggiati per le loro capacità enologiche sulla base delle quali saranno scelti quelli da impiegare come starter nelle microvinificazioni.

Indicativamente sarebbe auspicabile individuare circa 20 ceppi geneticamente differenti. La presente attività sarà ripetuta anche in vendemmia 2017 per incrementare la quantità di lieviti autoctoni e tra questi individuare quelli ricorrenti.

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 3.1 - I anno**

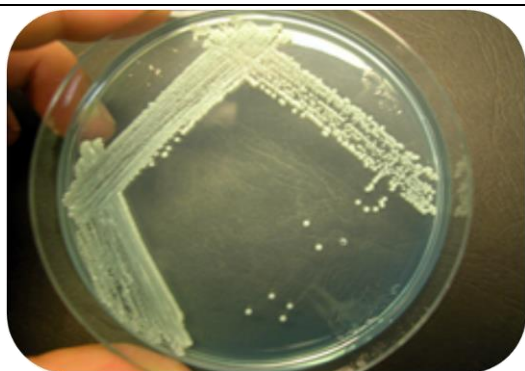
Le attività previste in questa azione sono state svolte dalla **Dr.ssa Eleonora Mari**. Circa un migliaio di isolati prelevati da piastre in cui era stato seminato il mosto in fermentazione sono state prelevate e conservate a -80°C in un mezzo di coltura contenente glicerolo al 50%. E' stata poi effettuata la purificazione di circa 400 colonie (50 colonie prelevate per ciascuna delle 8 fermentazioni spontanee) che mostravano colore e forma caratteristici del genere *Saccharomyces* (bianche, umbonate, cremose in figura 6).



**Figura 6.** Piastra contenente il mezzo WL sul quale è stato seminato un campione opportunamente diluito di mosto/vino; le colonie bianche, umbonate, cremose sono quelle caratteristiche del genere *Saccharomyces*.

Una volta ottenute le colonie purificate sono state coltivate in condizioni ottimali e messe in un mezzo di coltura contenente glicerolo al 50% per essere conservate a -80°C.

I 400 isolati corrispondenti al genere *Saccharomyces* sono stati quindi ripresi dalla glicerina effettuando strisci successivi su mezzo YEPD (Figura 7).



**Figura 7.** Piastra contenente il mezzo YEPD sul quale è stato strisciato un isolato del genere *Saccharomyces*.

Una volta sviluppate le colonie (3-5 giorni a 30°C), queste sono state analizzate mediante le metodiche molecolari previste per arrivare ad individuarne la specie di appartenenza. Le colonie di lievito identificate come *S. cerevisiae* sono state caratterizzate a livello di ceppo mediante adeguate metodiche molecolari al fine di individuare un numero significativo di ceppi geneticamente diversi tra loro e diversi anche dai ceppi starter commerciali normalmente utilizzati dall'azienda (ceppi commerciali saggiati: Icv okay, BM 45, BM 4X4 della LALVIN; Red fruit, Top essence, Ferm AMR 01, Q citrus, Es 181 della ENARTIS; Zymaflore x 16, F 33 della LAFFORT; bdx della UVAFERM). I ceppi indigeni così individuati sono stati conservati in glicerina a -80°C. In tabella 7 sono riportati il numero e le percentuali di isolamento dei ceppi indigeni geneticamente diversi trovati nelle diverse vinificazioni reali.

Oltre ad isolare lieviti dalle fermentazioni spontanee condotte in cantina, sono state anche allestite microvinificazioni in laboratorio al fine di isolare altri ceppi di *S. cerevisiae* in condizioni controllate di temperatura. I risultati delle analisi molecolari sui lieviti riscontrati nelle microvinificazioni di laboratorio sono riportate in tabella 8.

I ceppi indigeni della cantina VICAS individuati e che sono stati in seguito sottoposti alla caratterizzazione fenotipica e tecnologica sono riportati in tabella 9 dove sono indicati il codice, le fermentazioni da cui sono stati isolati e lo stadio fermentativo in cui queste fermentazioni si trovavano in termini di etanolo e zuccheri. L'attività è stata condotta come previsto con i risultati attesi.

Allegato fermentazioni spontanee per isolare lieviti autoctoni al sito:

<http://vicastart.it/risultati-del-primo-anno/>

**Tabella 7:** Numero di ceppi di *S. cerevisiae* indigeni geneticamente diversi riscontrati nelle varie vinificazioni condotte in cantina.

Fermentazioni reali condotte in cantina	Ceppi indigeni geneticamente diversi	% di isolamento
A1	6	45% indigeni, 55% starter commerciali
B1	2	30% indigeni, 70% starter commerciali
C1	2	30% indigeni, 70% starter commerciali
D1	0	100% starter commerciali
A2	0	100% starter commerciali
B2	3	30% indigeni, 70% starter commerciali
C2	1	10% indigeni, 90% starter commerciali
D2	4	25% indigeni, 75% starter commerciali

**Tabella 8:** Numero di ceppi di *S. cerevisiae* indigeni geneticamente diversi riscontrati nelle varie microvinificazioni condotte in laboratorio.

Fermentazioni in laboratorio dei mosti di partenza	Ceppi indigeni geneticamente diversi	% di isolamento
A1	2	10% indigeni, 90% starter commerciali
B1	0	100% starter commerciali
C1	0	100% starter commerciali
D1	0	100% starter commerciali

**Tabella 9:** Ceppi di *S. cerevisiae* indigeni che saranno utilizzati nelle successive prove e tempo fermentativo in cui sono stati riscontrati come dominanti.

Codice ceppi	Fermentazione e data	Tempo fermentativo (giorni)	Etanolo (% v/v)	Zuccheri g/L
VI 23	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 24	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 26	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 30	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 31	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 32	A1 del 17/09	5	5,1	136
VI 60	Fermentazione di laboratorio A1			
VI 62	Fermentazione di laboratorio A1			
VI 123	D2 del 01/10	4	7,9	66
VI 124	D2 del 01/10	4	7,9	66
VI 125	D2 del 01/10	5	7,9	66
VI 127	D2 del 01/10	5	7,9	66
VI 155	B1 del 17/09	5	5,4	128
VI 161	C1 del 17/09	5	4,0	152
VI 163	C1 del 17/09	5	4,0	152
	B1 del 17/09	5	5,4	128
VI 186	B2 del 01/10	4	5,4	126
VI 187	B2 del 01/10	4	5,4	126
VI 202	C2 del 01/10	4	5,3	138
	B2 del 01/10	4	5,4	126

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 3.1 II anno**

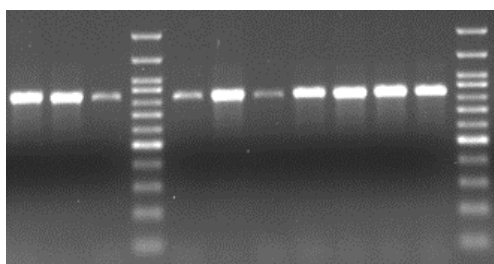
Le attività previste in questa azione sono state svolte come nel I anno, dalla Dr.ssa **Eleonora Mari**. In particolare, è stata effettuata la purificazione mediante striscio su YEPD di circa 200 isolati (25 colonie prelevate per ciascuna delle 8 fermentazioni spontanee) conservati in glicerina dalla vendemmia 2016 che mostravano colore e forma caratteristici del genere *Saccharomyces* (bianche, umbonate, cremose). Una volta sviluppate le colonie (3-5 giorni a 30°C), queste sono state analizzate mediante le stesse metodiche molecolari utilizzate nel I anno per arrivare ad individuarne la specie di appartenenza. Le colonie di lievito identificate come *S. cerevisiae* sono state caratterizzate a livello di ceppo mediante adeguate metodiche

molecolari al fine di individuare un numero significativo di ceppi geneticamente diversi tra loro e diversi anche dai ceppi starter normalmente utilizzati dall'azienda. In tabella 10 sono riportati il numero e le percentuali di isolamento dei ceppi indigeni geneticamente diversi trovati nelle diverse vinificazioni reali. Pertanto, ai 18 ceppi, isolati nel I anno di attività, ne sono stati aggiunti altri 4.

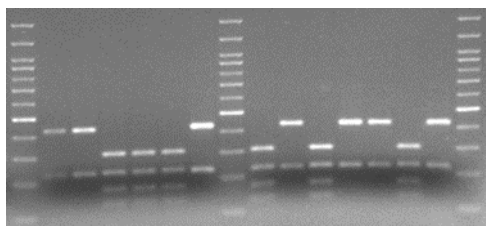
Nelle figure 8-11 sono riportati a titolo di esempio le foto di alcuni gel utilizzati per far correre i frammenti di DNA con vari scopi (identificazione della specie e a livello di ceppo di *S. cerevisiae*).

**Tabella 10:** Ceppi di *S. cerevisiae* indigeni riscontrati dallo screening effettuato il secondo anno di 200 isolati provenienti dalle 8 vinificazioni reali

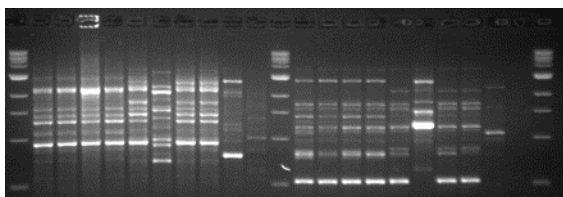
Fermentazioni reali condotte in cantina	Numero di isolati saggiati	Ceppi indigeni geneticamente diversi a quelli già selezionati o agli starter	% di isolamento
A1	20	0	50% autoctoni già selezionati 50% starter commerciali
B1	30	1	3% autoctoni 27% autoctoni già selezionati 70% starter commerciali
C1	25	0	30% autoctoni già selezionati 70% starter commerciali
D1	25	0	100% starter commerciali
A2	30	0	100% starter commerciali
B2	20	1	5% autoctoni 10% autoctoni già selezionati 85% starter commerciali
C2	30	1	3% autoctoni 97% starter commerciali
D2	20	1	5% autoctoni 30% autoctoni già selezionati 65% starter commerciali



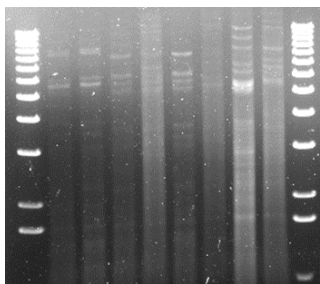
**Figura 8:** Esempio di gel utilizzato per evidenziare l'amplicone della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA (conferma del genere di appartenenza)



**Figura 9:** Esempio di gel utilizzato per evidenziare la digestione con enzimi di restrizione dell'amplicone della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA (identificazione alla specie)



**Figura 10:** Esempio di gel utilizzato per evidenziare i frammenti di DNA ottenuti amplificando le regioni interdelta del DNA totale (caratterizzazione a livello di ceppo)



**Figura 11:** Esempio di gel utilizzato per evidenziare i frammenti di DNA ottenuti digerendo con enzimi di restrizione il DNA mitocondriale (caratterizzazione a livello di ceppo)

### *A 3.2 Prove per la caratterizzazione fenotipica e tecnologica dei ceppi individuati (analisi chimiche, microbiologiche e biomolecolari) GESAAF*

Le prove a cui saranno sottoposti i ceppi autoctoni individuati serviranno ad indagare sulle loro capacità tecnologiche (vigore fermentativo, potere alcoligeno, resistenza alla solforosa, ecc.) e di qualità (prodotti del metabolismo microbico: principali quali etanolo, glicerina, acidi organici, ecc.; secondari quali alcoli superiori, composti volatili, ecc...). Le prove di caratterizzazione tecnologica e di qualità saranno svolte nei laboratori del GESAAF su un mezzo sintetico che simula la composizione chimica del mosto d'uva in modo da poter confrontare in modo più efficace le capacità dei diversi ceppi presi in esame, prescindendo dalla variabilità del mosto adoperato. Più in dettaglio, per ciascuno dei ceppi selezionati (circa 20) saranno preparate delle beute (2 per ogni ceppo quindi indicativamente 40 beute) contenenti il mosto sintetico e allestite con una valvola di Muller. L'andamento della fermentazione (della durata indicativa di 7-10 giorni a 25°C) sarà monitorato come perdita di CO<sub>2</sub> pesando giornalmente le beute. Giornalmente per ciascuna beuta saranno anche eseguiti prelievi per quantificare i lieviti (GESAAF) e per quantificare zuccheri degradati, acido acetico, etanolo, glicerina, alcoli superiori, composti volatili, ecc. (laboratorio esterno). Le analisi dovranno essere eseguite in doppio per ciascuna beuta. Tutti i dati saranno elaborati statisticamente per due scopi: (1) valutare le differenze statisticamente significative tra un ceppo e l'altro per quanto riguarda i prodotti del metabolismo microbico (Analisi della varianza, T-test), (2) fittare i dati alla funzione di Gompertz per stimare durata della fase lag, velocità di crescita e rendimento di ciascun ceppo. Per essere certi che a portare in fondo le varie fermentazioni siano stati effettivamente i ceppi inoculati, saranno eseguite le analisi molecolari descritte precedentemente.

Infine, tutti i dati ottenuti saranno inseriti nel database sopra menzionato (ad ogni ceppo quindi corrisponderà la sua origine, il suo profilo genetico, il suo comportamento metabolico). L'attività prevista richiederà una unità di personale del GESAAF. Ogni due settimane questa unità di personale dovrà relazionare (mediante report e/o presentazioni orali) al responsabile

della ricerca prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF - Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche) e prof. Alessandro Parenti (GESAAF - Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi) gli aggiornamenti riguardo lo svolgimento dei lavori. Questa attività dovrebbe consentire di individuare un numero adeguato di ceppi (da 5 a 10) significativamente diversi tra loro per caratteristiche metaboliche (alcoli superiori, composti aromatici, ecc.), con prestazioni enologiche interessanti in termini di vigore fermentativo, potere alcoligeno, resistenza alla solforosa, ecc. ed anche con buone rese in termini di biomassa (elevato rendimento di crescita).

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 3.2 nel I anno**

Grazie all'attività della **Dr.ssa Eleonora Mari**, i ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* geneticamente diversi e dominanti nelle varie fermentazioni analizzate sono stati saggiati per le loro capacità enologiche. Le prove a cui sono stati sottoposti i ceppi indigeni sono state finalizzate alla valutazione delle loro capacità tecnologiche quali vigore fermentativo, potere alcoligeno, resistenza/produzione di solforosa, carattere Killer. Per quanto riguarda invece le caratteristiche di qualità sono stati presi in esame: prodotti del metabolismo microbico principali e secondari (etanolo, glicerina, acidi organici, alcoli superiori, composti volatili, ecc...).

Le prove di caratterizzazione tecnologica e di qualità sono state svolte su un mezzo sintetico che simula la composizione chimica del mosto d'uva in modo da poter confrontare efficacemente le capacità dei diversi ceppi presi in esame, prescindendo dalla variabilità del mosto adoperato. Più in dettaglio, per ciascuno dei 18 ceppi selezionati sono state preparate delle beute (2 per ogni ceppo quindi 36 beute) contenenti il mosto sintetico e allestite con una valvola di Müller. L'andamento della fermentazione ( $T=28^{\circ}\text{C}$ ) è stato monitorato come perdita di  $\text{CO}_2$  pesando giornalmente le beute (Figura 12). Giornalmente per ciascuna beuta sono stati anche eseguiti prelievi per quantificare i lieviti (GESAAF) e per quantificare zuccheri degradati, acido acetico, etanolo, glicerina, alcoli superiori, composti volatili, ecc...(laboratorio esterno: Analytical). In tabella 11 sono riportati i dati delle analisi al termine della fermentazione.

Anche se non previsto dal progetto, le stesse prove sono state condotte su mosto vero per confermare i risultati ottenuti con il mosto sintetico. Le analisi sono state eseguite in doppio per ciascuna beuta.

Tutti i dati sono stati elaborati statisticamente per due scopi:

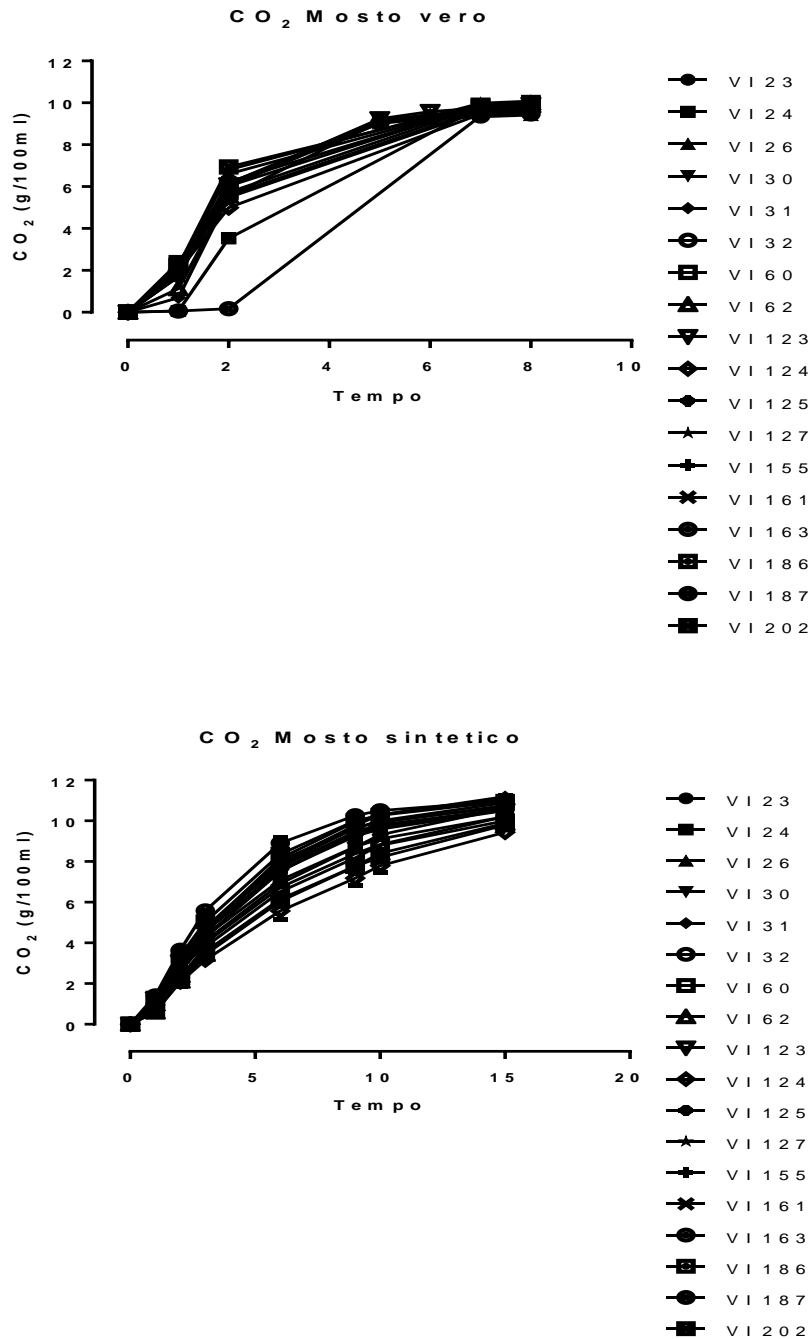
- (1) valutare le differenze statisticamente significative tra un ceppo e l'altro per quanto riguarda i prodotti del metabolismo microbico,
- (2) fittare i dati alla funzione di Gompertz per stimare durata della fase lag, velocità di crescita e rendimento di ciascun ceppo.

Tutti i dati ottenuti sono stati poi inseriti nel database sopra menzionato (ad ogni ceppo quindi corrisponde la sua origine, il suo profilo genetico, il suo comportamento metabolico).

Per essere certi che a portare in fondo le varie fermentazioni siano stati effettivamente i ceppi inoculati, sono state eseguite le analisi molecolari descritte precedentemente. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i ceppi inoculati erano effettivamente quelli che avevano portato a termine la fermentazione alcolica.

Infine, tutti i dati ottenuti sono stati elaborati mediante analisi delle componenti principali (Figura 13) per la scelta dei 6 ceppi da testare nelle microvinificazioni. Alla fine i ceppi scelti sono stati i seguenti: VI23, VI123, VI127, VI161, VI187, VI202.

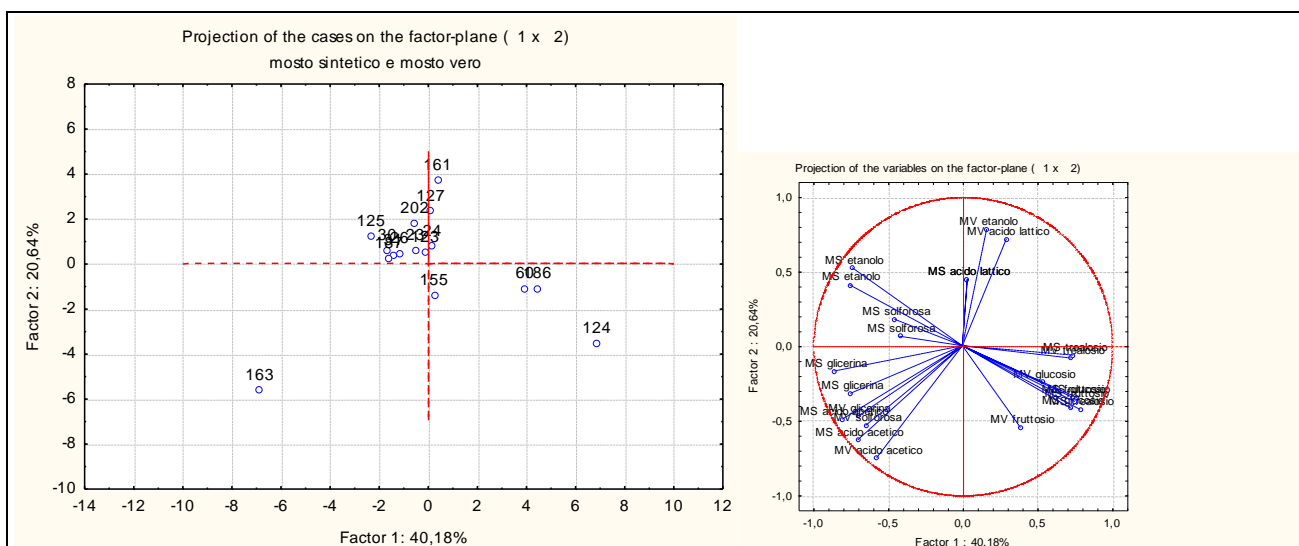
Questa attività ha dunque consentito di individuare 6 ceppi di *S. cerevisiae* significativamente diversi tra loro per caratteristiche metaboliche, con prestazioni enologiche interessanti in termini di vigore fermentativo, potere alcoligeno, resistenza alla solforosa, ecc. ed anche con buone rese in termini di biomassa (elevato rendimento e velocità di crescita).



**Figura 12:** Andamento delle fermentazioni di ciascun ceppo come perdita percentuale di anidride carbonica nel mosto vero e nel mosto sintetico.

**Tabella 11:** Analisi chimiche dei substrati e prodotti principali del metabolismo microbico al termine della fermentazione alcolica dei ceppi saggiati il primo anno.

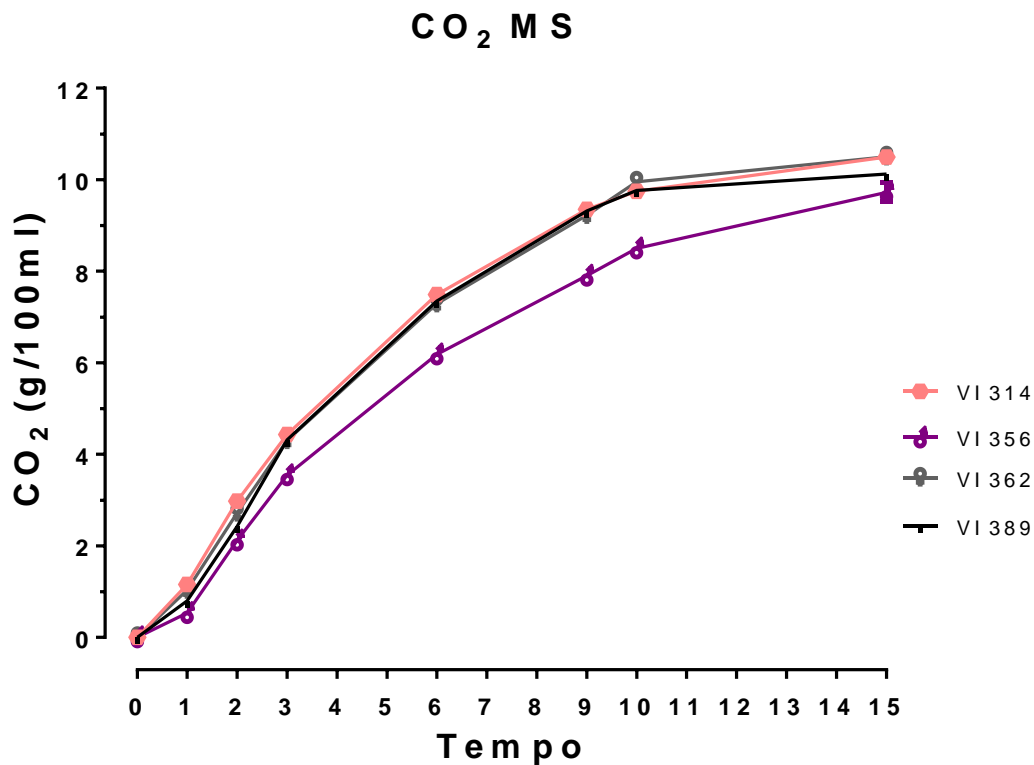
Ceppo	Glucosio g/L	Fruttosio g/L	Acido lattico g/L	Glicerina g/L	Acido acetico g/L	Etanolo %	SO <sub>2</sub> mg/L
23	0,2	0,5	0,13	6,6	0,34	12,4	51
24	0,2	0,9	0,13	5,2	0,42	12,4	26
26	0,2	0,5	0,15	7,1	0,37	12,4	64
30	0,2	0,3	0,13	6,8	0,53	12,5	99
31	0,2	0,3	0,14	7,2	0,52	12,5	38
32	0,2	4,7	0,18	7,1	0,76	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



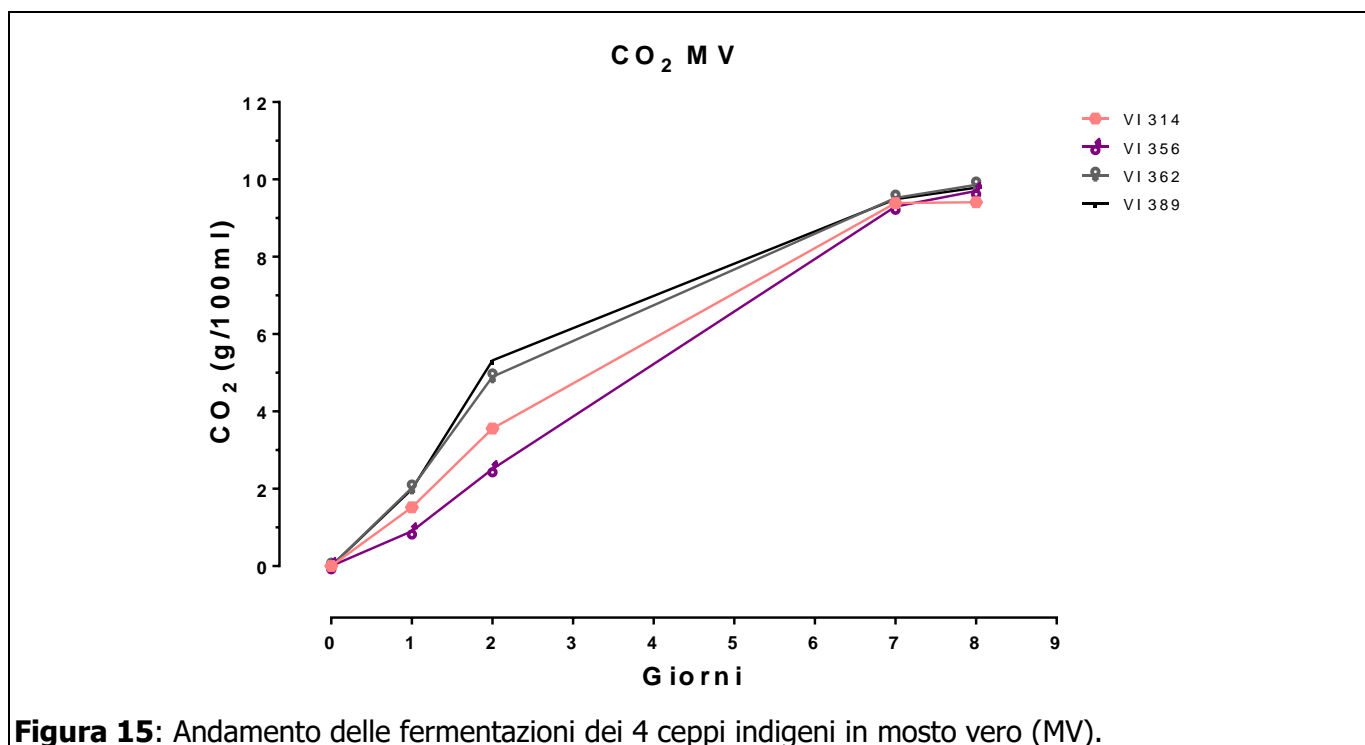
**Figura 13:** Analisi delle componenti principali condotta su tutti i dati della caratterizzazione fenotipica e tecnologica ottenuti dalle fermentazioni nel mosto sintetico e nel mosto vero.

**ATTIVITA' SVOLTE per A 3.2 nel II anno**

Grazie all'attività della **Dr.ssa Eleonora Mari**, anche i 4 ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* geneticamente diversi (VI 314, VI 356, VI 362, VI 389) individuati il secondo anno di attività sono stati caratterizzati con lo stesso sistema dei 18 ceppi del primo anno. Nelle figure 14 e 15 è mostrato l'andamento delle fermentazioni dei 4 ceppi autoctoni saggiate in mosto sintetico e in mosto vero, mentre in tabella 12 è riportata la CO<sub>2</sub> prodotta a 48 ore (vigore fermentativo). I risultati delle analisi chimiche condotte a fine fermentazione sono riportate nelle tabelle 13 e 14. Tre dei ceppi testati per la capacità a produrre acido solfidrico sono risultati medi produttori mentre solo uno (VI 356) è risultato basso produttore. Invece, per quanto riguarda il fattore Killer, tutti e 4 gli isolati saggiate sono risultati neutri alla tossina (né sensibili né produttori).



**Figura 14:** Andamento delle fermentazioni dei 4 ceppi indigeni in mosto sintetico (MS).



**Figura 15:** Andamento delle fermentazioni dei 4 ceppi indigeni in mosto vero (MV).

**Tabella 12:** Vigore fermentativo in mosto sintetico e mosto vero (valori espressi come media di analisi in doppio)

	<b>CO<sub>2</sub> Mosto Sintetico</b> (g/100mL 48h)	<b>CO<sub>2</sub> Mosto vero</b> (g/100mL 48h)
<b>VI 314</b>	3.35	3.56
<b>VI 356</b>	2.98	2.51
<b>VI 362</b>	2.12	4.89
<b>VI 389</b>	2.72	5.32

**Tabella 13:** Analisi chimiche (valori espressi come media di analisi in doppio) a fine fermentazione su mosto sintetico.

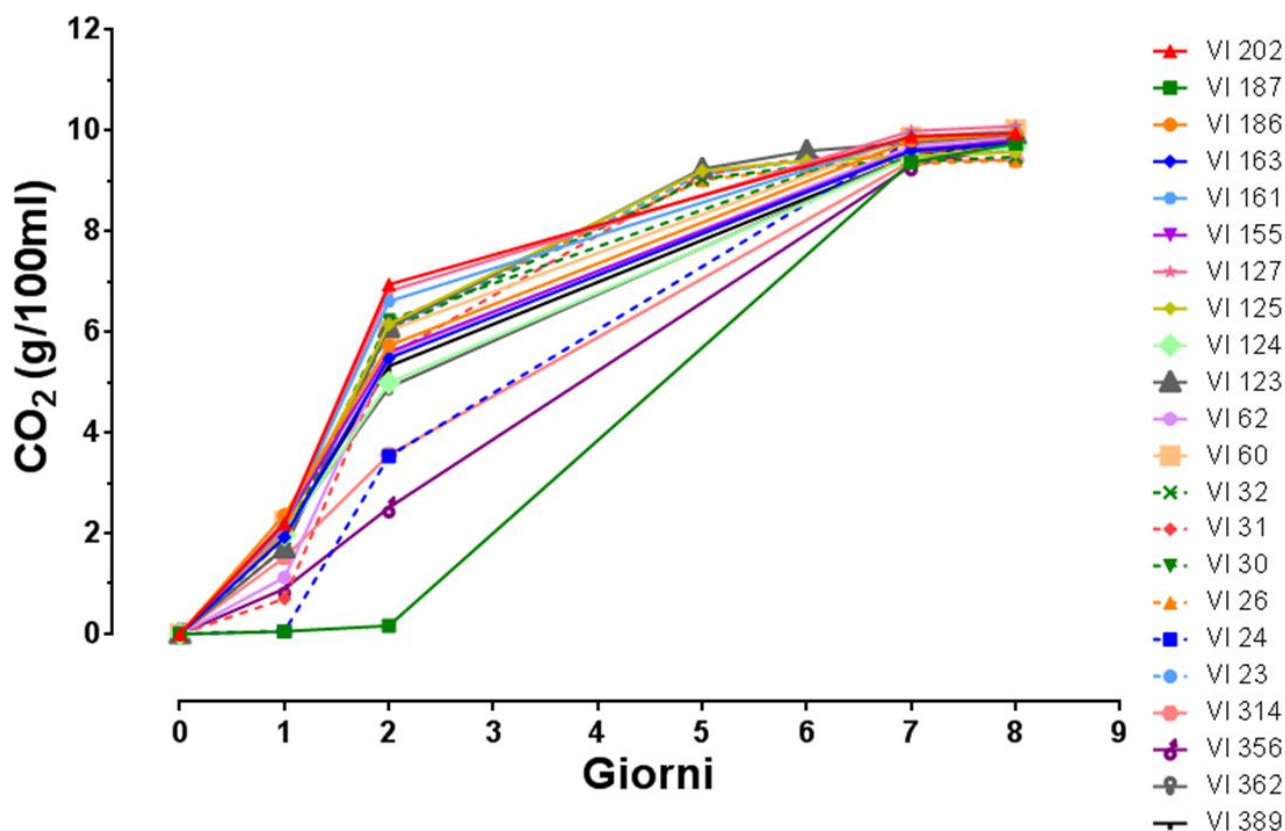
<b>Ceppo</b>	<b>Glucosio g/L</b>	<b>Fruttosio g/L</b>	<b>Acido lattico g/L</b>	<b>Glicerina g/L</b>	<b>Acido acetico g/L</b>	<b>Etanolo % v/v</b>	<b>Solforosa mg/L</b>
<b>314</b>	0,2	6,4	0,0	3,3	0,8	8,8	20,5
<b>356</b>	0,1	5,0	0,0	4,5	0,7	7,9	30,0
<b>362</b>	0,3	4,4	0,0	5,1	0,9	9,0	25,0
<b>389</b>	0,2	1,6	0,0	4,8	0,8	8,6	45,5

**Tabella 14:** Analisi chimiche (valori espressi come media di analisi in doppio) a fine fermentazione su mosto vero.

<b>Ceppo</b>	<b>Glucosio g/L</b>	<b>Fruttosio g/L</b>	<b>Acido lattico g/L</b>	<b>Glicerina g/L</b>	<b>Acido acetico g/L</b>	<b>Etanolo %</b>	<b>SO<sub>2</sub> mg/L</b>
<b>314</b>	0,2	1,5	0,12	5,5	0,45	12,1	35
<b>356</b>	0,3	2,9	0,15	6,5	0,43	12,2	53
<b>362</b>	0,2	2,3	0,16	5,7	0,53	12,5	44
<b>389</b>	0,2	1,6	0,13	6,2	0,48	12,4	69

Infine, tutti i dati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei 18 ceppi autoctoni della cantina identificati nel corso del I anno di attività (Figura 16). Dal confronto è emerso che i 4 ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni hanno mostrato caratteristiche metaboliche e prestazioni enologiche (vigore fermentativo, potere alcoligeno, resistenza alla solforosa e rendimento di crescita) inferiori rispetto ai ceppi individuati l'anno precedente.

Nella tabella 15 sono stati messi a confronto tutti i 22 ceppi di *S. cerevisiae* saggiati per le diverse proprietà tecnologiche e di qualità e dai risultati ottenuti, nessuno dei ceppi saggiati nel II anno di attività si è dimostrato adeguato, pertanto sono stati scartati e i risultati analitici per questi ceppi, riguardanti le caratteristiche tecnologiche e fenotipiche, non sono stati inseriti nell'analisi delle componenti principali.



**Figura 16:** Andamenti fermentativi su mosto vero dei 4 ceppi (VI-314, VI-356, VI-362, VI-389) isolati nel II anno messi a confronto con quelli isolati e caratterizzati nel I anno di attività

**Tabella 15.** Confronto tra i vari ceppi di *S. cerevisiae* del primo e del secondo anno per le varie capacità tecnologiche.

Ceppo <i>S. cerevisiae</i>	Capacità fermentativa Zuccheri totali residui	Produzione Acido acetico	Produzione SO <sub>2</sub>	Vigore fermentativo	Produzione H <sub>2</sub> S	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
VI 314	●	●	●	●	●	
VI 356	●					
VI 362	●					
VI 389	●	●	●			

## 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,
- Vigore fermentativo CO<sub>2</sub> prodotto a 48 h dall'inoculo ● buon vigore fermentativo > 6 g/100 ml,
- Acido solfidrico ● non produttore, ● basso produttore, ● alto produttore

**AZIONE 4 SELEZIONE DEI LIEVITI**

*A 4.1 Microvinificazioni utilizzando i ceppi ritenuti migliori dalla selezione (analisi chimiche, microbiologiche, biomolecolari e sensoriali) GESAAF*

I ceppi scelti sulla base delle fermentazioni su mosto sintetico descritte al punto 2.2 saranno utilizzati come starter in microvinificazioni utilizzando mosto conservato congelato e fermentatori. I ceppi scelti (si prevede 5) saranno prelevati dalla glicerina mediante striscio su mezzo solido, le colonie ottenute saranno inoculate su un mezzo sintetico. Dopo almeno 3 rinnovi, ciascun ceppo sarà coltivato su un apposito mezzo sintetico (prove preliminari saranno necessarie non solo per definirne la composizione, ma anche per stabilire i parametri di crescita quali temperatura e ossigeno) fino al raggiungimento della fase stazionaria precoce che solitamente viene raggiunta in tre giorni (monitoraggio mediante analisi spettrofotometrica della torbidità e conteggio al microscopio mediante camera di Thoma per stimare il numero di cellule vive e morte). Le cellule poi saranno centrifugate, lavate in soluzione fisiologica e conservate a 4°C fino al loro utilizzo. L'operazione sarà ripetuta per ogni ceppo (probabilmente

per 5-10 ceppi diversi) il numero di volte che sarà necessario al raggiungimento della quantità di cellule vitali necessaria a inoculare le microvinificazioni tenendo conto che la concentrazione del lievito dovrà essere almeno di  $10^6$  cellule vitali/ml di mosto. Una volta preparati gli inoculi saranno allestite le microvinificazioni (in doppio per ogni ceppo). Le fermentazioni saranno monitorate giornalmente attraverso analisi chimiche, microbiologiche e biomolecolari con gli stessi metodi e finalità sopra descritte (5 fermentazioni in doppio campionate giornalmente per almeno 15 giorni per un totale di 150 campioni da analizzare microbiologicamente e chimicamente). In altre parole saranno monitorate prendendo in considerazione lo sviluppo dei lieviti (conte vitali in piastra) e la loro capacità di condurre la fermentazione alcolica in termini di substrati e prodotti del metabolismo microbico (i 150 campioni saranno analizzati chimicamente per: zuccheri, acidi organici, etanolo, anidride solforosa, acidità, pH, profilo aromatico; i punti finali saranno sottoposti a analisi organolettiche). I dati chimici e microbiologici ottenuti durante il monitoraggio saranno elaborati statisticamente (ANOVA, T-test, analisi di fit a funzioni polinomiali) al fine di individuare i ceppi più adatti ad essere utilizzati come starter. I parametri presi in considerazione saranno il rendimento di crescita, la velocità fermentativa, la purezza fermentativa, la capacità di dominare su altri lieviti indigeni, il profilo aromatico ecc. Al termine della fermentazione alcolica sarà eseguita un'indagine molecolare del tutto analoga a quella sopra descritta sui lieviti che hanno condotto la fermentazione alcolica al fine di verificare che il ceppo inoculato all'inizio sia effettivamente quello che ha dominato il processo fino alla sua conclusione (saranno analizzate almeno 20 colonie per ciascuna fermentazione provenienti dall'ultimo campionamento eseguito per un totale di 200 colonie). Infine, tutti i dati ottenuti saranno inseriti nel database sopra menzionato. L'attività prevista richiederà una unità di personale del GESAAF. Ogni due settimane questa unità di personale dovrà relazionare (mediante report e/o presentazioni orali) al responsabile della ricerca prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF - Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche) e al prof. Alessandro Parenti (GESAAF - Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi) gli aggiornamenti riguardo lo svolgimento dei lavori e i risultati ottenuti.

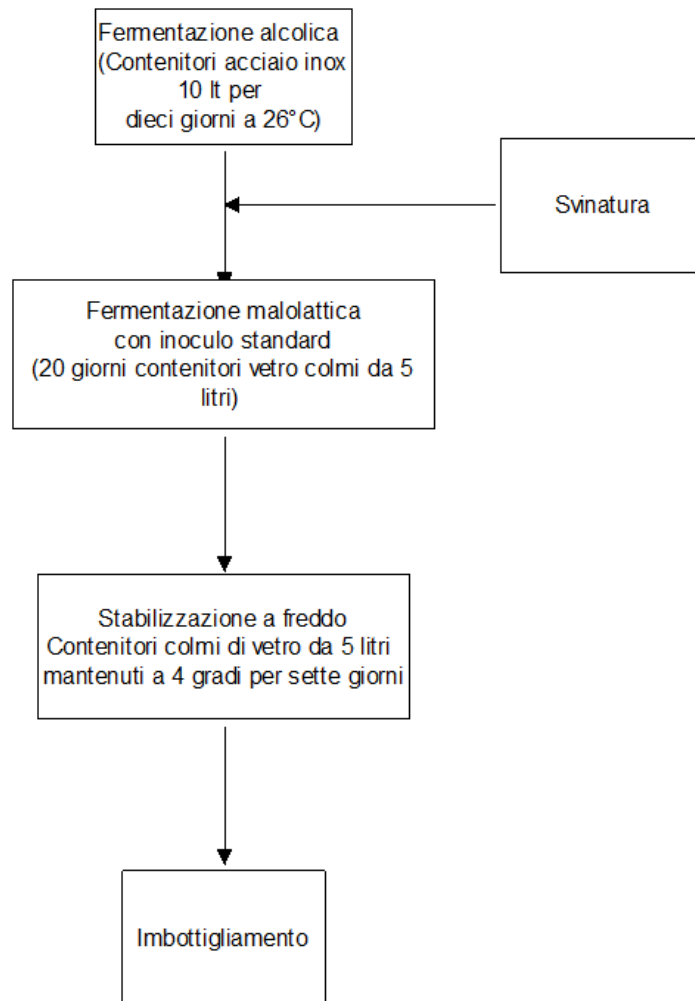
### **ATTIVITA' SVOLTE per A 4.1 nel I anno**

Le attività relative a questa azione sono state svolte dal **Dr. Niccolò Pini**. In particolare, i 6 ceppi (VI23, VI123, VI127, VI161, VI187, VI202), scelti sulla base delle fermentazioni su mosto sintetico e su mosto vero descritte al punto 2.2, sono stati utilizzati come starter in microvinificazioni condotte su mosto ottenuto da uve Sangiovese e Merlot mantenuto congelato fino al momento del suo impiego.

I 6 ceppi sono stati prelevati dalla glicerina mediante striscio su mezzo solido, le colonie ottenute sono state inoculate su un mezzo sintetico. Dopo almeno 3 rinnovi, ciascun ceppo è stato coltivato su un apposito mezzo sintetico (prove preliminari sono state necessarie non solo per definirne la composizione, ma anche per stabilire i parametri di crescita quali temperatura e ossigeno) fino al raggiungimento della fase stazionaria precoce che solitamente viene raggiunta in tre giorni (monitoraggio mediante analisi spettrofotometrica della torbidità e conteggio al microscopio mediante camera di Thoma per stimare il numero di cellule vive e morte). Le cellule sono state poi centrifugate, lavate in soluzione fisiologica e conservate a 4°C fino al loro utilizzo. Una volta preparati gli inoculi sono state allestite le microvinificazioni (in doppio per ogni ceppo) come descritto nel diagramma in figura 17.

Il mosto impiegato nella sperimentazione è stato analizzato sia chimicamente sia microbiologicamente. I risultati delle analisi chimiche, chimico-fisiche e microbiologiche del

mosto di partenza sono riportate in tabella 16. Con questo mosto sono stati allestiti 12 contenitori in acciaio inox dotati di tappo con gorgogliatore. In ciascun contenitore sono stati immessi 7 litri di mosto e sono stati inoculati due contenitori per ciascun ceppo ad una concentrazione di  $2 \times 10^6$  UFC/mL. Il mosto/vino inoculato è stato sottoposto a rimontaggi di 2 minuti due volte al giorno utilizzando un utensile differente per ogni ceppo in modo da ridurre il rischio di contaminazioni crociate tra ceppi di lievito.



**Figura 17:** Schema relativo alle prove di microvinificazione utilizzando i 6 ceppi indigeni di *S. cerevisiae* selezionati presso la cantina VICAS.

Le 12 microvinificazioni sono state monitorate (analisi condotte in doppio) prendendo in considerazione lo sviluppo dei lieviti (conte vitali in piastra) e la loro capacità di condurre la fermentazione alcolica in termini di substrati consumati e prodotti del metabolismo microbico (170 analisi circa contro le 150 previste dal progetto). I dati chimici e microbiologici ottenuti durante il monitoraggio sono stati elaborati statisticamente secondo quanto riportato nell'Azione 4.2 al fine di individuare i ceppi più adatti ad essere utilizzati come starter nella cantina VICAS durante la prossima vendemmia. Nelle tabelle 17 e 18 sono riportati i risultati delle analisi chimiche e microbiologiche dei vini ottenuti al momento della svinatura. Il ceppo VI 186 mostrava un significativo residuo zuccherino.

**Tabella 16.** Composizione chimico-fisica e microbiologica del mosto di partenza impiegato per le microvinificazioni

	Mosto
<i>Analisi chimico-fisiche e chimiche</i>	
pH	3,37
Acidità totale (g/L)	4,43
Acido malico enzimatico (g/L)	1,50
Solforosa libera (ppm)	0
Solforosa combinata (ppm)	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
<i>Analisi microbiologiche (conta su piastra)</i>	
Lieviti(UFC/ml):	
<i>Kloeckera apiculata</i>	1,1x10 <sup>4</sup>
<i>Candida zemplinina</i>	3,5x10 <sup>3</sup>
Altri lieviti	5,2x10 <sup>2</sup>
Batteri lattici (UFC/mL)	2,0x10 <sup>3</sup>
Batteri acetici (UFC/mL)	1,7x10 <sup>2</sup>

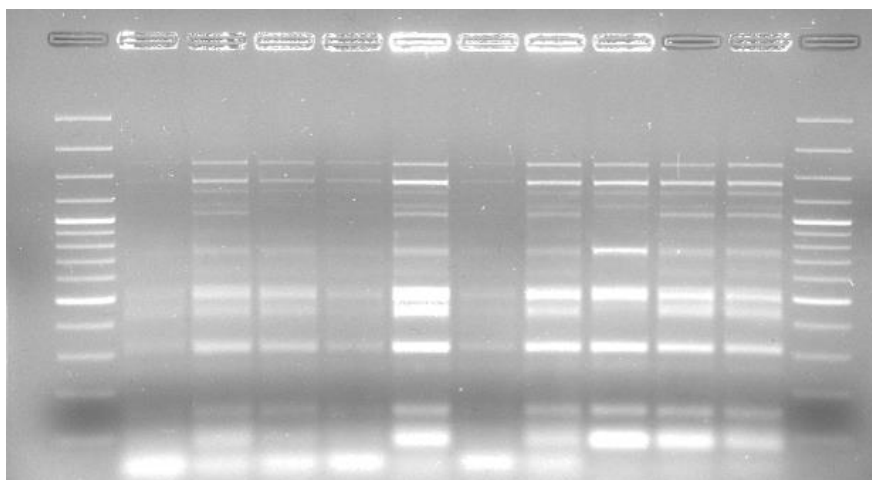
**Tabella 17:** Risultati delle analisi effettuate sui campioni di vino prelevati al momento dell'operazione di svinatura (decimo giorno) delle microvinificazioni condotte in doppio con i 6 ceppi di *S. cerevisiae* indigeni selezionati.

Campione	Zuccheri Totali (gr/L)	Etanolo (%)	Acidità totale (gr/L)	Acidità volatile (gr/l)	Anidride solforosa libera (gr/L)	Anidride solforosa combinata (gr/L)	Acido malico (gr/L)
VI 23 A	0.4	13.86	6.83	0.30	6	31	1.45
VI 23 B	0.6	13.83	6.72	0.30	5	33	1.45
VI 123 A	0.7	13.61	6.80	0.29	4	29	1.50
VI 123 B	0.5	13.63	6.69	0.30	5	30	1.50
VI 127 A	0.4	13.87	6.47	0.42	4	30	1.05
VI 127 B	0.4	13.85	6.64	0.39	5	31	1.05
VI 161 A	0.9	13.80	6.85	0.29	6	33	1.40
VI 161 B	0.9	13.80	6.75	0.30	5	30	1.40
VI 186 A	10.70	13.22	6.54	0.32	4	34	1.35
VI 186 B	11.10	13.24	6.60	0.35	3	35	1.35
VI 202 A	0.5	13.83	6.58	0.39	5	33	0.95
VI 202 B	0.5	13.84	6.58	0.39	5	33	0.95

**Tabella 18:** Analisi microbiologica dei campioni di vino prelevati a fine fermentazione alcolica nelle microvinificazioni condotte in doppio con i 6 ceppi di *S. cerevisiae* indigeni selezionati.

Campione	Lieviti (UFC/mL)	Batteri acetici (UFC/mL)	Batteri lattici (UFC/mL)
VI 23 A	2,70 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 23 B	2,20 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 123 A	1,00 x 10 <sup>5</sup>	0	0
VI 123 B	2,00 x 10 <sup>5</sup>	0	0
VI 127 A	2,20 x 10 <sup>7</sup>	0	0
VI 127 B	2,20 x 10 <sup>7</sup>	0	0
VI 161 A	2,00 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 161 B	2,50 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 186 A	1,80 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 186 B	2,40 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 202 A	1,60 x 10 <sup>6</sup>	0	0
VI 202 B	1,60 x 10 <sup>6</sup>	0	0

Al termine della fermentazione alcolica è stata anche eseguita, in collaborazione con il **Dr. Yuri Romboli**, un'indagine molecolare per verificare che i ceppi inoculati fossero effettivamente quelli responsabile della conduzione del processo fermentativo. La metodica molecolare utilizzata è stata la metodica PCR – interdelta. Sono state analizzate 20 colonie per ciascuna fermentazione provenienti dall'ultimo campionamento eseguito (fine fermentazione alcolica) per un totale di 240 colonie, contro le 200 colonie previste dal progetto. La frequenza di isolamento del ceppo atteso per ciascuna microvinificazione è stata del 100 %, pertanto è possibile concludere non solo che la sperimentazione è stata eseguita in modo corretto, senza cioè che si siano verificate contaminazioni crociate tra ceppi, ma anche senza che i lieviti presenti naturalmente del mosto di partenza prendessero il sopravvento (Figura 18).

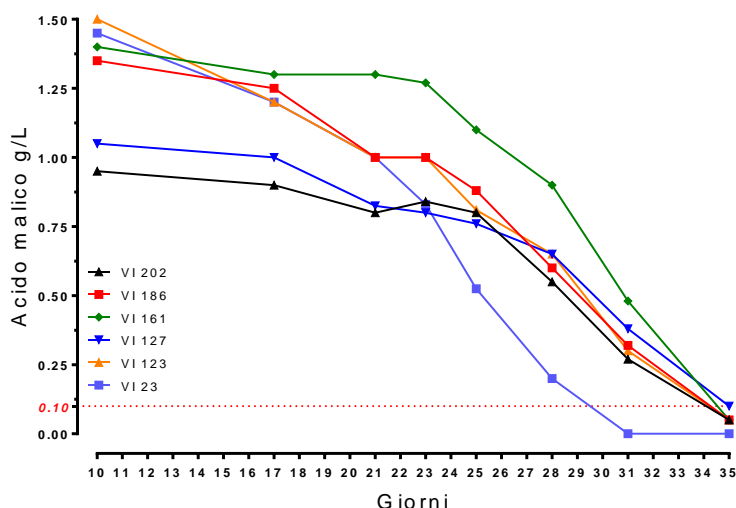


**Figura 18:** Profili ottenuti con l'analisi PCR-interdelta degli isolati provenienti dalla microvinificazione inoculata con il ceppo *S. cerevisiae* VI123

Nonostante non fosse previsto dal progetto e grazie all'attività del **Dr. Nicolò Pini**, è stato valutato indispensabile, ai fini di una migliore valutazione sensoriale della qualità dei vini, fare avvenire anche la fermentazione malolattica in ciascuna microvinificazione. Per questo alla svinatura i vari vini (2 per ciascun ceppo) sono stati travasati in contenitori da cinque litri ed è stata effettuata una fermentazione malolattica mediante inoculo diretto di 2 milioni per millilitro del preparato commerciale "*Oenococcus oeni* CH11" (Chr.Hansen).

Il monitoraggio della fermentazione malolattica in termini di analisi chimiche e microbiologiche (condotte in doppio) è stato eseguito ogni 3-4 giorni per circa un mese dal momento dell'inoculo. Anche la temperatura è stata accuratamente monitorata. Diversamente da quanto fatto fino ad ora per le analisi microbiologiche non è stato utilizzato il classico metodo della conta in piastra, ma la microscopia a fluorescenza impiegando il kit LIVE/DEAD *BacLight Bacterial*. Questa tecnica impiega un microscopio a fluorescenza e alcuni coloranti in grado di colorare diversamente le cellule vive e quelle morte. I risultati ottenuti con questa metodica hanno mostrato come al dodicesimo giorno la mortalità elevata del ceppo starter di *O. oeni* inoculato rendesse impossibile la conclusione della malolattica. Pertanto è stato deciso di eseguire un nuovo inoculo, ma questa volta previo adattamento delle cellule in un mezzo sintetico adeguato (MRS 4,5 pH a 28°C per quattro giorni). Le curve di degradazione dell'acido malico per ciascun ceppo sono riportate in Figura 19.

Al 35esimo giorno, quando l'acido malico risultava ormai sotto il limite di rilevabilità o quasi, è stato effettuato un travaso con lo scopo di eliminare le fecce e il vino così ottenuto è stato trasferito in contenitori colmi per effettuare la stabilizzazione a freddo con conservazione a 4°C per sette giorni. Alla fine dei sette giorni è stato effettuato un nuovo travaso con relativo imbottigliamento in bordolesi chiuse con tappi in silicone. In particolare, sono state riempite 48 bottiglie, 4 per ciascuno dei 6 ceppi di *S. cerevisiae* impiegati per condurre le microvinificazioni. Queste bottiglie sono state poi utilizzate per le analisi chimiche e sensoriali previste e descritte nell'Azione 4.2.



**Figura 19:** Cinetica di degradazione dell'acido malico nelle varie microvinificazioni condotte con sei ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni ed inoculate con un batterio di *O. oeni* commerciale.

#### *A 4.2 Prove chimiche e sensoriali (GESAAF)*

Per la caratterizzazione chimica i 150 campioni della fase 4.1 saranno analizzati per: zuccheri, acidi organici, etanolo, anidride solforosa, acidità, pH, profilo aromatico, ecc.; i vini finiti saranno sottoposti anche ad analisi organolettiche. A titolo di esempio, si riportano i alcuni dei metodi che saranno impiegati per le analisi:

Anidride Solforosa libera e totale OIV-MA-AS313-04B R2009

Acidità volatile OIV-MA-AS313-02-R2009

Indice di Folin Ciocalteu

Polifenoli totali (espressi in +catechina idrato) OIV-MA-AS2-10 R2009

Potenziale Redox OIV-MA-AS2-06

Ossigeno disciolto Metodo interno (ossimetro a tenuta stagna, a microprocessore, dotato di calibrazione e compensazione della temperatura automatiche)

Per i vini rossi

Caratteristiche cromatiche (intensità e tonalità) OIV-MA-AS2-07B R2009

Per la caratterizzazione sensoriale è convocata una riunione composta da 5 persone iscritte nell'Elenco dei Tecnici Degustatori e degli Esperti Degustatori di vini DOC e DOCG guidate da un enologo (che abbia la facoltà di decidere anche lo stile sensoriale da imprimere ai vini della cantina. Queste persone utilizzano una scheda (messa a punto appositamente e ispirata a schede OIV). Ai degustatori è fornita la spiegazione dei seguenti descrittori (che possono essere utilizzati in scala da 1 a 5):

Limpidezza: misura della torbidità. Questo descrittore consente di valutare l'intensità della torbidità del vino.

Aspetto: valutazione dell'intero spettro delle proprietà visibili di un prodotto. Questo descrittore valuta l'intensità, il colore principale del prodotto, le sue sfumature (colori secondari), la sua viscosità (non tenendo conto della sua limpidezza).

Franchezza: valutazione del grado di sensazione percepita, al naso o al gusto, di un difetto del prodotto. Questo descrittore consente al degustatore di valutare la pulizia del vino. Nel penalizzare la genuinità, l'assaggiatore dovrà essere in grado di identificare i difetti che percepisce al naso o al gusto. Allo stesso modo si classifica l'intensità del sapore che si percepisce dopo aver messo in bocca il campione.

Intensità aromatica: Grado (magnitudo) della gamma di odori positivi percepiti al naso e al gusto. Questo descrittore permette di valutare l'influenza dello spettro delle percezioni olfattive e gustative che contribuiscono a migliorare la percezione qualitativa percepita al naso e al gusto. Allo stesso modo si classifica l'intensità del sapore che si percepisce dopo aver messo in bocca il campione.

Impressione generale (giudizio generale): corrisponde alla valutazione globale di un prodotto. Questo descrittore consente al degustatore di esprimere l'impressione che il prodotto lascia complessivamente. Questo dà la possibilità di una classificazione alta o bassa. Secondo le informazioni fornite agli assaggiatori, questo descrittore permette anche l'analisi della difficile questione della tipicità.

**ATTIVITA' SVOLTE per A 4.2 nel I anno**

La fase 4.2 è stata organizzata e supervisionata dal **Dr. Yuri Romboli** (assegnista GESAAF, responsabile Prof.ssa Lisa Granchi). Per la caratterizzazione chimica i 150 campioni della fase 4.1 sono stati prelevati dal **Dr. Pini** e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  per poi essere recapitati al laboratorio Analytical dove sono stati analizzati per: zuccheri, acidi organici, glicerolo, etanolo, anidride solforosa, acidità, pH, estratto secco, profilo aromatico.

I vini finiti sono stati sottoposti anche ad analisi sensoriali. Sempre in collaborazione con il laboratorio Analytical, infatti, è stata organizzata l'analisi sensoriale convocando una riunione composta da persone iscritte nell'Elenco dei Tecnici Degustatori e degli Esperti Degustatori di vini DOC e DOCG. Queste persone hanno utilizzato una scheda messa a punto appositamente.

In tabella 19, vengono riportati i risultati delle analisi chimico-fisiche eseguite nei vini dopo l'imbottigliamento al termine della fermentazione malolattica. Per quanto riguarda l'analisi delle componenti volatili dei vini (profilo aromatico) è stata impiegata la metodica HS-SPME/GC-MS (microestrazione in fase solida dello spazio di testa accoppiata ad un gascromatografo avente come rivelatore uno spettrometro di massa). I cromatogrammi dei campioni sono stati processati ed integrati con il software Xcalibur e per ognuno sono stati identificati i composti volatili presenti attraverso il confronto con i tempi di ritenzione di alcuni standard e di quelli trovati in letteratura, con l'ausilio della libreria spettrale NIST2005. La quantificazione dei singoli composti è stata espressa come area equivalente di standard interno (1-eptanolo). I composti identificati nei diversi campioni, vengono riportati in tabella 20.

**Tabella 19:** Caratterizzazione chimico-fisica dei vini imbottigliati

	Vini imbottigliati					
	VI 23	VI 123	VI 127	VI 161	VI 186	VI 202
Zuccheri residui (g/L)	0,5±0,1	0,6±0,1	0,4±0,0	0,9±0,0	10,9±0,3	0,5±0,0
Etanolo (% v/v)	13,8±0,0	13,6±0,0	13,9±0,0	13,8±0,0	13,2±0,0	13,8±0,0
Acidità totale (g/L)	4,91±0.01	4,94±0.13	4,98±0.04	5,00±0.02	4,96±0.06	5,00±0.02
Acidità volatile (g/L)	0,40±0.00	0,38±0.01	0,46±0.01	0,38±0.02	0,43±0.00	0,45±0.00
Anidride solforosa libera (mg/L)	14±4	16±1	14±4	17±3	13±2	15±1
Anidride solforosa combinata (mg/L)	21±1	23±0	25±2	24±4	24±4	25±0
Acido malico (g/L)	0,00±0.00	0,05±0.07	0,10±0.00	0,05±0.07	0,05±0.07	0,05±0.07
pH	3,40±0.00	3,39±0.01	3,40±0.01	3,39±0.01	3,38±0.00	3,40±0.00
Glicerina (g/L)	5,9±0.0	5,9±0.0	5,9±0.0	5,9±0.0	5,9±0.0	6,2±0.4
Estratto secco (g/L)	20,3±0.0	21,4±0.0	21,1±0.0	21,8±0.6	29,7±0.4	21,1±0.0

**Tabella 20:** Composti volatili identificati, essenzialmente ascrivibili ad una diversa attività metabolica dei lieviti, a seguito dell'analisi HS-SPME/GC-MS nei vini all'imbottigliamento

Compound	CAS number	RT(min)	Odour quality
Ethyl acetate	141-78-6	5.053	VA, nail polish
Ethyl butanoate	105-54-4	9.320	Strawberry, lactic
1-Propanol	71-23-8	9.603	Alcohol, pungent
Ethyl 2- methylbutanoate	7452-79-1	9.997	Fruity, anise, strawberry
Ethyl 3- methylbutanoate	108-64-5	10.676	Fruit
2-Methyl-1-propanol	78-83-1	12.549	Wine, solvent, bitter
3-Methylbutyl acetate	123-92-2	13.088	Banana
Ethyl 2-butenate	10544-63-5	15.378	Compost
Limonene	138-86-3	16.817	Lemon, orange
3-Methyl-1-butanol	123-51-3	19.072	Harsh, nail polish , fusel
Ethyl hexanoate	123-66-0	19.850	Apple peel, fruit
Hexyl acetate	142-92-7	22.189	Fruity, floral
Ethyl 2-hexenoate	1552-67-6	26.943	Spicy, candy, earthy
Ethyl lactate	97-64-3	27.160	Solvent
1-Hexanol	111-27-3	28.165	Green, grass
Methyl octanoate	111-11-5	29.990	Orange
Nonanal	124-19-6	30.111	Fat, citrus, green
1-Methyl-4-(prop-1- en-2-yl)benzene	1195-32-0	32.695	Phenolic, spicy, clove, guaiacol
Ethyl octanoate	106-32-1	33.318	Melon, wood
3-Methylbutyl hexanoate	2198-61-0	34.554	Cooked meat,
Furfural	98-01-1	34. 626	Earthy, wood i
2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	36.978	Citrus, green
Benzaldehyde	100-52-7	38.053	Almond, burnt sugar
Vitispirane	65416-59-3	38.670	Vanilla, quince fruit m
Ethyl nonanoate	123-29-5	39.461	Fruity, rose, waxy, rum, tropical
Linalool	78-70-6	40.410	Flower, lavender
1-Octanol	111-87-5	41.168	Chemical, metal, burnt
Methyl decanoate	110-42-9	42.999	Wine
Ethyl furoate	614-99-3	44.460	Fruity, floral
Ethyl decanoate	110-38-3	45.885	Floral, soap
3-Methylbutyl octanoate	2035-99-6	46.961	Sweet, fruity, pineapple, coconut
Diethyl succinate	123-25-1	47.990	Wine, fruit
Ethyl 9-decenoate	67233-91-4	48.521	Fruity, fatty
a-Terpineol	98-55-5	48.940	Oil, anise, spicy
1-Decanol	112-30-1	51.902	Fat
b-Citronellol	106-22-9	51.952	Citrus
Ethyl 2-phenylacetate	101-97-3	52.388	Fruit, sweet
2-Phenylethyl acetate	103-45-7	53.470	Jammy, plum, floral, fruity
b-Damascenone	23726-93-4	53.689	Apple, rose, honey
Ethyl dodecanoate	106-33-2	54.619	Fruity, floral
Hexanoic acid	142-62-1	54.672	Leafy, wood, varnish
2-Phenylethanol	60-12-8	56.695	Floral, rose
Octanoic acid	124-07-2	60.719	Butter, almond
Nonanoic acid	112-05-0	63.138	Green, fat
Decanoic acid	334-48-5	64.978	Rancid, fat
Dodecanoic acid	143-07-7	68.432	Metal

I vini imbottigliati presentavano, un quadro chimico-fisico per i parametri sopra riportati piuttosto simile, con differenze apprezzabili per estratto secco e zuccheri residui, per i quali il vino prodotto dal ceppo VI186 mostra valori largamente superiori agli altri.

#### Analisi sensoriale dei vini imbottigliati

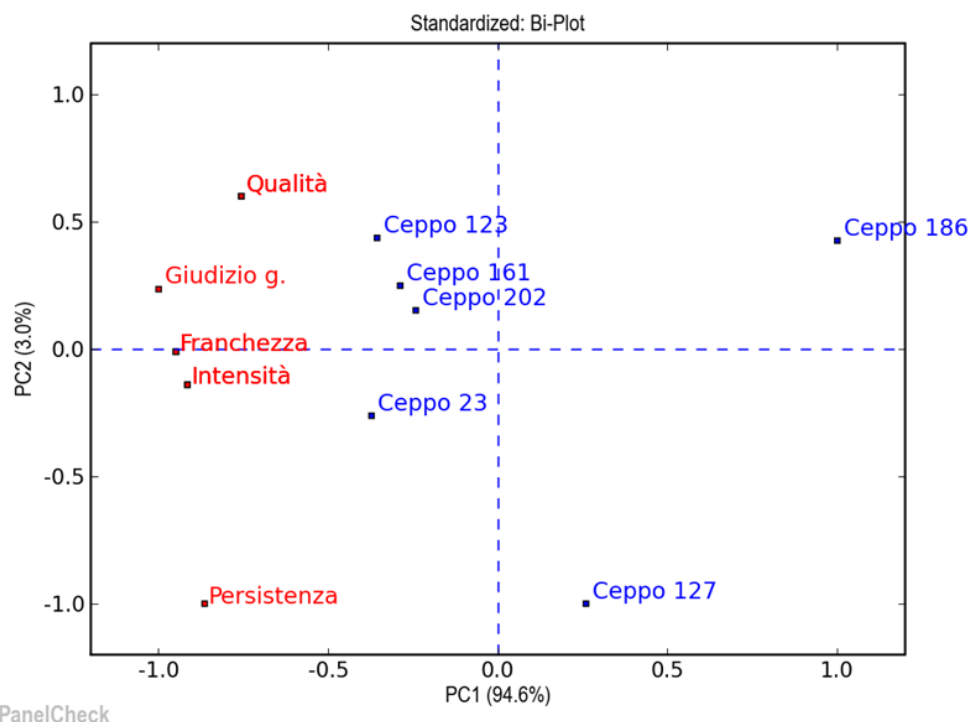
Sempre in collaborazione con il laboratorio Analytical s.r.l. è stata organizzata la caratterizzazione sensoriale dei vini. Il panel era composto da 12 esperti, alcuni dei quali iscritti agli elenchi dei Tecnici Degustatori e degli Esperti Degustatori e per le valutazioni sensoriali è stata utilizzata una scheda messa a punto appositamente, ispirata alle schede proposte da OIV. Ai degustatori è stata fornita la spiegazione dei seguenti descrittori (che possono essere utilizzati in scala da 1 a 5):

- Limpidezza: valutazione dell'intensità della torbidità del vino.
- Aspetto: valutazione dell'intensità del colore, le sue sfumature, la sua viscosità (non tenendo conto della sua limpidezza).
- Franchezza: valutazione del grado di sensazione percepita, al naso o al gusto, di un difetto del prodotto.
- Intensità aromatica: valutazione del grado (magnitudo) della gamma di odori positivi percepiti al naso e al gusto.
- Impressione generale (giudizio generale): corrisponde alla valutazione globale di un prodotto.

Affinché i test sensoriali siano significativi è necessario che il panel di assaggio sia armonizzato, ovvero che i giudici abbiano un grado sufficiente di omogeneità nell'uso dei diversi descrittori.

I risultati sono stati quindi analizzati con Panel Check (PC, Matforsk) software

I dati ricavati a seguito dall'analisi sensoriale effettuata sui vini imbottigliati sono stati elaborati attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA, fig. 20).



**Figura 20:** Analisi delle componenti principali (PCA), valutazione sensoriale dei vini

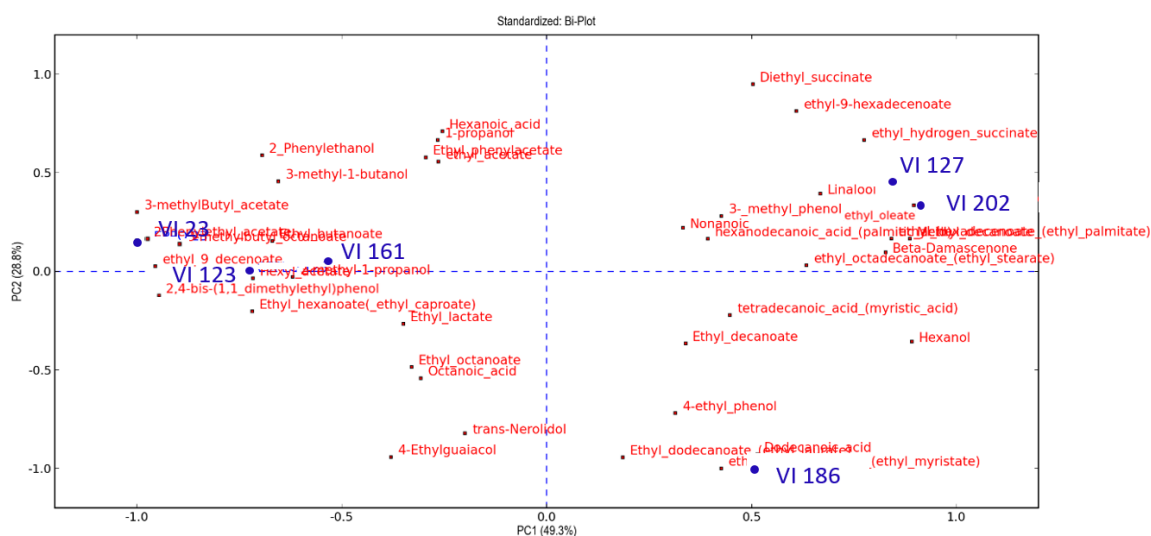
Da quanto riportato in figura 20 è possibile notare che la varianza spiegata dal modello dopo le prime due componenti rappresenta il 97.6% della varianza totale, con un largo contributo da parte della prima componente (94.6%).

Dalla PCA si può osservare come i campioni si dispongano in tre gruppi:

- Un primo gruppo, rappresentato dai campioni di vino ottenuti con i ceppi di lievito *S. cerevisiae* VI123, VI161, VI202 e VI23, caratterizzato da una correlazione positiva con le variabili prese in considerazione,
- Un secondo gruppo rappresentato dal vino ottenuto con l'inoculo del ceppo VI127, che globalmente ha ottenuto punteggi più bassi rispetto a quelli ottenuti dai vini del gruppo precedentemente descritto,
- Un terzo gruppo rappresentato dal campione VI186 che si è distinto per i più bassi punteggi assegnati per le variabili considerate. Quest'ultimo campione è stato verosimilmente penalizzato a causa del non completo svolgimento della fermentazione alcolica.

#### Analisi della componente volatile dei vini imbottigliati

Anche i risultati relativi alla componente volatile dei vini sono stati elaborati attraverso l'analisi delle componenti principali, il cui output viene rappresentato in figura 21. Dato che la fermentazione alcolica è stata condotta per tutti i ceppi su uno stesso mosto in bianco, senza cioè la presenza di bucce in grado di apportare composti volatili o precursori nativi delle uve, la differenziazione sulla base di questa analisi è interamente ascrivibile ad una diversa e peculiare attività metabolica dei lieviti stessi.



**Figura 21:** Analisi delle componenti principali (PCA), analisi della componente volatile dei vini

La varianza spiegata dal modello raggiunge il 78.1% grazie alle prime due componenti. Osservando la distribuzione dei campioni si può notare come si possano distinguere tre diversi gruppi. Il primo composto dai vini prodotti dai ceppi VI 23, VI 123 e VI 161; un secondo gruppo composto dai vini prodotti dai ceppi VI 127 e VI 202; un terzo gruppo composto dal vino prodotto dal ceppo VI 186. Questa distribuzione indica che i vini prodotti dai 6 ceppi di *S. cerevisiae* impiegati sono stati caratterizzati dalla specifica attività metabolica dei ceppi stessi.

Da quanto detto in precedenza, lo studio della componente volatile dei vini ha rappresentato l'ultimo step di selezione che ha consentito di indirizzare la scelta di 2 ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* che sono stati impiegati durante la campagna vendemmiale 2017 su scala industriale. Tenendo presente i risultati relativi al quadro analitico generale dei vini all'imbottigliamento e quelli relativi al test di analisi sensoriale, i ceppi VI 186 e VI 127 sono da considerarsi non idonei: il primo perché non è stato in grado di portare a termine la fermentazione alcolica (zuccheri residui  $\approx 10$  g/L), il secondo perché ha ottenuto più bassi punteggi da parte del panel di degustazione. Pertanto, sono stati scelti due ceppi che hanno prodotto vini caratterizzati da un diverso profilo della componente aromatica e che sono stati il *S. cerevisiae* VI 202 e uno del gruppo che si pone all'estremità opposta del plot riportato in figura 21, che nel caso specifico è stato il ceppo *S. cerevisiae* VI 123.

A seguito delle prove di microvinificazione condotte è possibile asserire che 5 dei ceppi di *S. cerevisiae* saggiati sono risultati in grado di condurre e portare a termine la fermentazione alcolica producendo vini caratterizzati da un profilo chimico-fisico idoneo per i parametri presi in considerazione. A seguito della valutazione sensoriale dei vini, emerge che 4 (VI123, VI161, VI202 e VI23) dei 6 ceppi di lievito impiegati per le microvinificazioni, hanno conferito delle caratteristiche sensoriali positive. Grazie all'analisi dei composti volatili dei vini, è stato possibile individuare tra questi 4 ceppi, 2 di essi capaci di produrre dei vini caratterizzati da un diverso profilo delle componenti volatili. Pertanto, i 2 ceppi testati nella vendemmia 2017 in vinificazioni su scala industriale presso la cantina VI.C.A.S. sono stati il ceppo *S. cerevisiae* VI123 ed il ceppo *S. cerevisiae* VI202.

#### **Documenti:**

#### **Allegato Mesovinificazioni e Microvinificazioni al sito:**

**<http://vicastart.it/risultati-del-primo-anno/>**

#### **Selezione dei ceppi autoctoni mediante meso-vinificazioni-Dott Romboli al sito:**

**<http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/>**

#### *AZIONE 5*

#### *PREPARAZIONE DEI LIEVITI*

In questa azione sarà messo a punto il processo prototipale di produzione dei lieviti starter direttamente in cantina. L'impianto dovrà consentire la produzione di una biomassa che sia sufficiente per inoculare una fermentazione (2.000-3.000 hl), in base alla disponibilità della VICAS) e che abbia anche le caratteristiche fisiologiche adeguate per garantire una fermentazione alcolica nei tempi e nei modi desiderati. Pertanto, la messa a punto del processo consisterà da un lato nell'allestimento di un impianto (GESAAF) non presente sul mercato, dall'altro nella definizione di un protocollo per la produzione della biomassa (FoodMicroTeam).

Per realizzare l'impianto sarà necessaria l'acquisizione di un fermentatore le cui dimensioni dipendono da quanto mosto si ritiene sia sufficiente, ma anche realistico, inoculare per una produzione a livello industriale ancora in fase di messa a punto. Lo stesso dovrà essere valutato per la centrifuga necessaria per raccogliere le cellule. Visto che le dimensioni dell'impianto sono funzione di quanto mosto la cantina deciderà di inoculare una volta terminato il progetto, la forma più conveniente per l'azienda appare quella del noleggio con possibilità di riscatto al termine del progetto. L'azienda in questo modo si riserva la possibilità di acquistare un

impianto sovradimensionato/sottodimensionato rispetto a quello testato nel progetto nel caso lo ritenga utile. La cooperativa inoltre valuterà nel corso del progetto l'opportunità di apportare una variante sostanziale per inserire l'acquisto in toto dell'impianto se ritenuto di natura prototipale.

#### *A 5.1 Noleggio e allestimento impianto in cantina (VICAS)*

VICAS provvederà al noleggio e all'allestimento dell'impianto presso la cantina.

Dai costi dei preventivi presentati e sulla base delle caratteristiche tecniche più adatte per un impiego in cantina (facilità di uso, possibilità di integrare una sensoristica pensata per impiego in cantina, assenza di funzioni che per lo scopo del progetto sono inutili), il fermentatore proposto da PARSEC risulta il migliore. Oltretutto l'azienda ha dato anche la disponibilità ad allestire l'impianto in fase di messa a punto presso i suoi locali dove sarà più facile intervenire per compiere le modifiche tecniche eventualmente necessarie. Nel noleggio saranno quindi compresi anche eventuali sensori per ottimizzare e/o facilitare la produzione di biomassa sulla base dei risultati ottenuti nelle azioni 5.2 e 5.3. Se l'apparecchio messo a punto risulterà un prototipo di interesse per l'azienda al termine del noleggio sarà acquistato, oppure come sopra riportato sarà valutata l'opportunità di apportare una variante sostanziale per inserire l'acquisto in toto dell'impianto se ritenuto di natura prototipale.

#### **ATTIVITA' SVOLTE per A 5.1 nel I e II anno**

VICAS nel corso del I anno ha provveduto al noleggio e nei due anni di progetto ha contribuito all'allestimento dell'impianto presso la cantina. L'impianto è stato testato realizzando alcune produzioni prima con lieviti della collezione di FoodMicroTeam, poi con quelli selezionati grazie al progetto. Questi test hanno messo in evidenza alcune criticità (si veda A 5.2). L'impianto quindi è stato trasferito presso la Parse per apportare le migliorie necessarie. Una volta raggiunti gli obiettivi desiderati, l'impianto è stato nuovamente trasferito presso la cantina VICAS dove si trova attualmente.



### *A 5.2 Messa a punto reattore (GESAAF)*

Messa a punto e ottimizzazione di un impianto per la produzione in cantina di lieviti autoctoni selezionati in base ai risultati ottenuti nelle azioni 4.1 e 4.2 per l'impiego come *starter*.

L'impianto sarà composto da due componenti principali:

a) un fermentatore di circa 300 litri che ottimizzi la crescita dei lieviti. In particolare dovrà:

- mantenere nel tempo l'omogenizzazione della massa in fermentazione
- consentire una facile gestione della temperatura
- gestire il livello di ossigeno presente.

b) un sistema di separazione che consenta di raccogliere in forma di pasta la biomassa di lieviti prodotta nel fermentatore.

Le prove di messa a punto dell'impianto saranno condotte utilizzando un lievito della collezione di FoodMicroTeam (FoodMicroBank) di cui è conosciuto alla perfezione il comportamento metabolico e quello di crescita su mosto sintetico in modo da escludere dalle variabili le caratteristiche ceppo-specifiche e quelle della composizione del mosto vero, almeno in questa fase iniziale. Una unità di personale che farà capo al Prof. Alessandro Parenti (GESAAF - Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi) si occuperà di organizzare e gestire le prove, di compiere modifiche all'impianto e di valutarne i risultati, il tutto interfacciandosi con l'unità di personale di FoodMicroTeam, il Dr. Giacomo Buscioni esperto in microbiologia della vinificazione e nella coltura massiva dei lieviti (attività di coordinamento). Il Dr. Buscioni avvierà le prove ogni volta che saranno eseguite modifiche all'impianto ed eseguirà i prelievi della coltura da sottoporre ad analisi (costi per missioni riportate nell'Azione 5.3). Le analisi sulla biomassa necessarie per capire la qualità dell'impianto saranno eseguite da FoodMicroTeam grazie ad una seconda unità di personale, la Dr.ssa Silvia Mangani (analisi chimiche per quantificare substrati e prodotti del metabolismo microbico, analisi microbiologiche per quantificare le cellule vive, analisi molecolari per verificare la stabilità del ceppo). Ragionevolmente si ritiene saranno svolte una ventina di prove pertanto la quantità di analisi chimiche saranno almeno 2 per ogni prova (al raggiungimento della fase stazionaria da parte delle cellule in fermentatore) e almeno 4 microbiologiche (per quantificare le cellule al termine della fermentazione e dopo la separazione dal liquido in modo da stimare la concentrazione di cellule vitali per grammo nonché l'assenza di inquinanti). In altre parole si prevedono almeno 40 analisi chimiche e 80 analisi microbiologiche.

## **ATTIVITA' SVOLTE per A 5.2 nel I anno**

In questa fase, grazie all'attività del **Dr. Damiano Barbato** e della **Dr. Giulia Angeloni (borsisti del GESAAF)** è stato messo a punto e ottimizzato un impianto per la produzione in cantina di lieviti autoctoni selezionati. Il sistema doveva prevedere un tino di fermentazione e un sistema di raccolta delle cellule.

Le prove di messa a punto dell'impianto sono state condotte utilizzando due lieviti diversi appartenenti alla collezione di FoodMicroTeam (FoodMicroBank) di cui è conosciuto alla perfezione il comportamento metabolico in modo da escludere dalle variabili le caratteristiche ceppo-specifiche, almeno in questa fase iniziale. Il Dr. Barbato e la Dr. Angeloni il cui responsabile scientifico è il Prof. Alessandro Parenti (GESAAF - Sezione Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi) si sono occupati di organizzare e gestire l'impianto, di effettuare le varie prove sperimentali, e di compiere eventuali modifiche su di esso interfacciandosi con l'unità di personale di FoodMicroTeam, il **Dr Giacomo Buscioni** esperto in microbiologia della vinificazione e nella coltura massiva dei lieviti (attività di coordinamento). Il Dr. Buscioni ha preparato gli inoculi per avviare le prove ed ha eseguito i prelievi della coltura da sottoporre ad analisi. Le analisi sulla biomassa necessarie per capire la qualità dell'impianto sono state eseguite da FoodMicroTeam nella persona della **Dr.ssa Silvia Mangani** (analisi chimiche per quantificare substrati e prodotti del metabolismo microbico, analisi microbiologiche per quantificare le cellule vive, analisi molecolari per verificare la stabilità del ceppo). Sono state eseguite un totale di circa 40 analisi chimiche e 80 analisi microbiologiche come previsto dal progetto. Le problematiche affrontate hanno riguardato la scelta del tino, la gestione di alcuni parametri di processo (temperatura, ossigeno, pH, tempo), lo stato igienico-sanitario dell'impianto. Infine, è stato condotto uno studio per scegliere un sistema di separazione delle cellule che consentisse di ottenere la biomassa sotto forma di pasta.

### **Tino di fermentazione**

Per le prove di messa a punto dell'impianto sono stati utilizzati inizialmente due tini di fermentazione diversi per capire le caratteristiche necessarie alla produzione di lievito per uso enologico: Agriflex e Enoitalia (messi a disposizione dalle rispettive aziende), una centrifuga per separare le cellule di lievito dal mezzo di coltura, un compressore e una lampada UV per sterilizzare l'acqua (messi a disposizione da FoodMicroTeam). Per quanto riguarda il tino, valutando i risultati ottenuti dalle varie prove, è stato scelto il tino Agriflex non solo per le sue maggiori dotazioni a livello di sensori ma soprattutto per l'efficienza del sistema di riscaldamento/raffreddamento della coltura che ha la necessità di arrivare a 28°C rispetto alla temperatura di partenza dell'acqua nel minore tempo possibile. Le prove preliminari condotte con il tino Agriflex hanno dimostrato che per produrre biomassa di lievito è necessario tenere sotto controllo alcuni parametri tra cui **temperatura, disponibilità di ossigeno, fonti di carbonio, pH**. In più l'impianto deve garantire la **qualità igienico sanitaria della biomassa prodotta**. Un altro aspetto importante è infine quello di stabilire la **durata del ciclo di produzione** che per essere ottimale per la pratica di cantina dovrebbe durare non più di 8 ore oppure 24. Di seguito sono descritti brevemente i risultati delle sperimentazioni condotte per ciascuno dei parametri esaminati.

**Temperatura:** i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono microrganismi mesofili con un optimum di temperatura compresa fra i 25 e i 35 °C alla quale si verifica la più rapida moltiplicazione cellulare. Oltre i 50 °C il lievito può andare incontro a morte. E' importante quindi che il fermentatore possieda un efficace sistema per tenere sotto controllo la

temperatura. Dopo alcune prove in cui sono state eseguite analisi chimiche e microbiologiche per descrivere le curve di crescita dei 2 ceppi di lievito in fermentatore, la temperatura scelta è stata per la temperatura di 28°C.

**Ossigeno:** i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono anaerobi facoltativi. In condizioni di aerobiosi la resa cellulare è molto superiore rispetto a quella che si ha in condizioni fermentative. Pertanto, per massimizzare la quantità di biomassa è necessario mantenere le cellule in aerobiosi. Per fare ciò però non è sufficiente areare il mezzo di coltura, ma è anche necessario che il glucosio, principale fonte di crescita del lievito, non superi i 9 g/L (effetto Crabtree) (Ribéreau-Gayon et al., 2004). L'ossigeno nelle prove effettuate è stato insufflato attraverso un micro ossigenatore Parsec (12,5 mg/L al massimo delle sue potenzialità). L'andamento osservato è stato di saturazione iniziale dell'ossigeno a cui è seguito un abbassamento drastico per poi risalire quasi alla saturazione al momento dell'immissione di acqua, necessaria per l'allargamento della coltura, per poi diminuire fino a livelli minimi. Dopo varie prove in cui risultava difficile mantenere costante il livello di ossigeno, si è compreso che l'impianto di micro-ossigenazione utilizzato non aveva una portata sufficiente per le dimensioni del tino AGRIFLEX tenendo presente le richieste dei lieviti. Infatti, per avere un metabolismo prettamente respiratorio, essi necessitano di un quantitativo di aria all'interno del mezzo che, per tutta la durata della produzione, sia almeno pari al 50 % della saturazione. Queste osservazioni saranno prese in considerazione al momento della realizzazione dell'impianto da posizionare nella cantina VICAS.

**Misura del pH in continuo:** l'andamento del pH può essere utilizzato come indicatore della crescita dei lieviti in quanto questi sono in grado di acidificare il mezzo durante la crescita. Per questo è importante che il fermentatore disponga di una sonda per misurare il pH. La sonda impiegata era quella in dotazione al tino Agriflex. Due prove condotte senza modificare il pH di partenza hanno dato problemi di contaminazione. Il problema è stato risolto acidificando il mezzo di partenza, portando cioè il mezzo di coltura da pH 7 a pH 5 con acido ortofosforico. Lo stesso abbassamento di pH è stato realizzato nella fase di allargamento della coltura.

**Tempo:** sono stati messi a confronto 2 tempi diversi per l'ottenimento della biomassa: 8 e 24 ore. Alle 24 ore il numero delle cellule era maggiore (100 mila contro 70 mila cellule/mL), ma la coltura risultava più inquinata e la maggiore produzione di etanolo e acido acetico lasciava presupporre uno stato fisiologico delle cellule non ottimale. Pertanto è stato scelto come tempo ottimale quello alle 8 ore.

**Stato igienico sanitario del fermentatore:** Per evitare contaminazioni microbiche indesiderate nella biomassa finale, è importante avere una corretta disinfezione e detersione dei tini di fermentazione. Lavaggio e disinfezione inizialmente sono stati effettuati con acido peracetico in concentrazione dell'1%. Dopo il risciacquo con acqua per togliere i residui di coltura, il tino veniva riempito con questa soluzione e lasciato per tre giorni. Le analisi microbiologiche condotte per verificare lo stato igienico sanitario del tino di fermentazione (tamponi di superficie su tutto l'impianto dopo ogni utilizzo) e dell'acqua di lavaggio hanno però mostrato la presenza di batteri e muffe troppo elevate e precisamente nell'ordine di  $10^4$  per  $\text{cm}^2$  di superficie o per mL di acqua. Per diminuire questa contaminazione sono state aumentate le dosi del disinfettante. I risultati migliori si sono ottenuti con una concentrazione del 2%. Con questa concentrazione del disinfettante la contaminazione risultava inferiore ai limiti di rilevanza. Considerando poi come possibile fonte di contaminazione l'acqua in entrata utilizzata per diluire il mezzo di coltura, sono stati presi in considerazione varie tipologie di trattamenti sanitizzanti per l'acqua e alla fine è stato scelto un dispositivo a lampada UV-C in quanto risulta avere un costo accessibile e sostenibile anche da parte di una piccola azienda,

essere facilmente reperibile sul mercato (incluse le lampade di ricambio), non comportare difficoltà nell'utilizzo e in ultimo, ma non meno importante, non creare effetti negativi sul prodotto trattato (e di conseguenza sui lieviti stessi) in caso di sovraesposizione.

### Sistema di separazione delle cellule

Per quanto riguarda il metodo di separazione (Tabella 21) la priorità è stata di scegliere una macchina che consentisse di separare un quantitativo soddisfacente di cellule nel minore tempo possibile in modo da ottenere una crema di lievito con un'umidità non superiore al 70%, senza compromettere la vitalità delle cellule, il tutto a costi sostenibili. Sono state effettuate prove di separazione di colture ottenute con l'impianto pilota utilizzando due diverse centrifughe a dischi verticali di dimensioni però differenti, una centrifuga di tipo orizzontale (decanter), una centrifuga a sacchi filtranti (utilizzando in più prove diverse tipologie di tessuti di composizione dei sacchi caratterizzati da porosità di diverse dimensioni), un filtro di tipo Dynamos di ceramica. Alla fine delle prove è stata scelta la centrifuga verticale a dischi Alfa Laval (portata 240 L/h).

**Tabella 21:** Sistemi di separazione a confronto.

Metodo di separazione	Tipologia di impianto	Esito
Centrifugazione	Centrifuga verticale a dischi Alfa Laval (portata 120 L/h)	Positivo
Centrifugazione	Centrifuga verticale a dischi Alfa Laval (portata 240 L/h)	Positivo Maggiore rapidità di esecuzione, eccellente risultato di ottenimento della crema
Centrifugazione e filtrazione	Centrifuga Nuova Sara con sacchi filtranti	Negativo Perdite del 100% di prodotto
Centrifugazione	Centrifuga Nuova Sara	Negativo Perdite dell'80% di prodotto
Filtrazione	Filtro Dynamos 0,1 mq	Negativo Nessuna perdita ma tempi troppo allungati e stress per le cellule
Centrifugazione	Decanter Mori	Negativo Perdite del 100% di prodotto

Sulla base delle informazioni ottenute, è stato messo a punto l'impianto per la produzione in cantina di starter indigeni della VICAS in collaborazione con **Parsec s.r.l.** con le seguenti caratteristiche:

- Fermentatore di forma cilindrica di base conica per facilitare lo svuotamento con capacità di 500 litri. Il fermentatore è stato dotato di sonde per la misurazione della temperatura, del pH e dell'ossigeno disciolto all'interno del tino. Inoltre è stato progettato con la presenza di una fascia riscaldante e di un gruppo frigo per una facile regolazione della temperatura. Sul fondo del tino è stata posta una piastra forata attraverso la quale viene insufflata aria a pressione con l'obiettivo di mantenere in agitazione la coltura senza creare depositi oltre che ad alimentare il quantitativo di ossigeno per evitare il più possibile l'effetto Crabtree. Un ultimo aspetto preso in considerazione è stato quello della facilità di ispezione e di igienizzazione del fermentatore per limitare l'inquinamento delle colture dovuto a fattori strutturali.
- Sistema di trattamento dell'acqua in entrata mediante un dispositivo a lampada UV-C.
- Centrifuga verticale a dischi Alfa Laval (portata 240 L/h).

**ATTIVITA' SVOLTE per A 5.2 nel II anno**

In questa fase, grazie all'attività del **Dr. Damiano Barbato** e della **Dr. Giulia Angeloni**, è stato ulteriormente ottimizzato l'impianto per la produzione in cantina di lieviti autoctoni selezionati. Il Dr. Barbato si è occupato di organizzare e gestire l'impianto e di compiere modifiche su di esso interfacciandosi con l'unità di personale di FoodMicroTeam, il **Dr Giacomo Buscioni** esperto in microbiologia della vinificazione e nella coltura massiva dei lieviti (attività di coordinamento). Il Dr. Buscioni ha preparato gli inoculi per avviare le prove ed ha eseguito i prelievi della coltura da sottoporre ad analisi. Le analisi sulla biomassa necessarie per capire la qualità dell'impianto sono state eseguite da FoodMicroTeam nella persona della **Dr.ssa Silvia Mangani** (analisi chimiche per quantificare substrati e prodotti del metabolismo microbico, analisi microbiologiche per quantificare le cellule vive, analisi molecolari per verificare la stabilità del ceppo).

L'impianto utilizzato durante la vendemmia 2017 ha dimostrato di possedere alcuni punti di forza, ma anche alcune criticità che hanno necessitato di interventi per migliorare il prototipo.

Gli aspetti presi in considerazione per migliorare l'impianto sono stati:

- Ottimizzazione delle procedure di pulizia nel breve e lungo periodo.
- Valutazione dell'opportunità di eliminare dall'impianto il gruppo frigo (contenimento costi macchina).
- Valutazione delle portate dei compressori per l'arieggiamento della biomassa.
- Valutazione del dimensionamento della pompa di mandata verso il separatore verticale.
- Dimensionamento del dosaggio dei nutrienti e veicolazione in uscita del vapore prodotto dalla coltura.
- Immissione di nuovi punti di campionamento.

L'ottimizzazione dell'impianto è stata effettuata attraverso l'analisi delle varie componenti prese in considerazione, per alcune di esse è stato necessario effettuare delle prove di produzione a ciclo intero per altre si è trattato di effettuare modifiche in settori circoscritti dell'impianto. Sono riportate di seguito le soluzioni trovate per ogni criticità emersa durante la produzione in vendemmia.

**-Ottimizzazione delle procedure di pulizia.** L'impianto è composto da una pompa centrifuga con funzionalità automatizzate di pescaggio del liquido sanitizzante, ricircolo durante il ciclo di lavaggio, scarico della soluzione a fine ciclo e facile programmazione a automazione grazie ad uno specifico programma inserito nel software dell'impianto che è dotato di due programmi differenti, uno relativo al ciclo di sanitizzazione e uno relativo a un ciclo di risciacquo utilizzando sempre acqua sanificata in ingresso attraverso il dispositivo UV. Il sensore di pH è stato utilizzato per verificare l'introduzione dell'acido peracetico come sanitizzante (diminuzione pH da 7 a 2,5-3,0). A fine ciclo, la sonda di pH può essere utilizzata per monitorare che il risciacquo sia avvenuto correttamente (pH di nuovo a 7.0). Le prestazioni sono state valutate attraverso tre cicli differenti di lavaggio per un tempo di 30 minuti in tutte le prove. I risultati sono riportati in tabella 22.

Protocollo per l'igienizzazione dell'impianto:

- 1) START ciclo → risciacquo automatizzato tramite acqua calda sterilizzata attraverso irraggiamento UV (5min.) 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 L di acqua). Sanitizzazione: riempimento automatizzato con circa 40 L di acqua sterilizzata tramite UV, aggiunta automatizzata di acido peracetico per una concentrazione del 2 %. Tempo di sanitizzazione: 30 minuti, con lavaggio in continuo del serbatoio attraverso la pompa che irroro tutto il serbatoio dal getto posizionato in alto al centro. Svuotamento del serbatoio. Risciacquo effettuato tramite riempimento automatizzato con circa 40 L di acqua sterilizzata tramite UV. Tempo di risciacquo: 30 minuti, con lavaggio in continuo del serbatoio attraverso la pompa che irroro tutto il serbatoio dal getto posizionato in alto al centro. Svuotamento del serbatoio.

3) CENTRIFUGA → (manuale) risciacquo delle componenti del separatore, immersione dei dischi del separatore in una soluzione contenente il 2 % di acido peracetico.

**-Valutazioni sull'opportunità di eliminare dall'impianto il gruppo frigo.** Da quanto si evince dalle rilevazioni effettuate durante la produzione delle biomasse a settembre 2017, non sembrerebbe strettamente necessaria la presenza del gruppo frigo. A differenza, infatti, dell'impianto da laboratorio messo a disposizione da FoodMicroTeam per le prove preliminari (A5.2 I anno), dove il gruppo frigo era sicuramente sempre in funzione e l'agitazione della massa era garantita da pale meccaniche, nell'impianto VICAS non è stato necessario tenere in funzione il gruppo frigo visto che la dispersione di calore era garantita dall'agitazione stessa del serbatoio effettuata attraverso l'insufflazione continua di aria sterile. Questo fenomeno è stato osservato grazie all'analisi dei tracciati della temperatura monitorata in continuo durante i cicli di produzione. I tracciati. Infatti, hanno chiaramente dimostrato come anche senza l'ausilio del gruppo frigo la temperatura si mantenesse nel *range* desiderato.

**-Valutazione delle portate dei compressori per arieggiare il brodo di coltura.** Le dimensioni del flusso di aria in ingresso, necessario al fermentatore per ottimizzare la produzione di biomassa, sono state valutate testando compressori a portata crescente (100, 200 e 800 L/min). L'aria insufflata doveva essere tale da garantire il fabbisogno dell'impianto e precisamente fornire la quantità necessaria per favorire l'agitazione in continuo, il raffreddamento della massa ed infine a il quantitativo di ossigeno necessario (> 50 % della saturazione) alla coltura per la crescita minimizzando lo stress. Il risultato quantitativo è stato valutato grazie al monitoraggio condotto con una specifica sonda che quantificava l'ossigeno (in ppb) presente all'interno del brodo di coltura riportando i dati in un tracciato grazie ad un software dedicato. Dalla tabella 14 si evince come il risultato sia stato migliore utilizzando un compressore di portata 800 L/min, con una pressione di 8 bar dotato di filtro sterilizzante ed essiccatore dell'aria. Tuttavia, non è stato possibile effettuare altre prove con compressori di portata maggiore per incrementare ulteriormente il tempo in ore di ossigenazione.

**-Valutazione del dimensionamento della pompa di mandata verso il separatore verticale.** La pompa utilizzata durante la produzione 2017 è stata considerata sovradimensionata. Si è provveduto alla sostituzione della stessa con una più piccola dotata di inverter con la possibilità di effettuare con precisione l'apporto di coltura verso il separatore verticale utilizzato al massimo delle sue possibilità di separazione (perdita < 2% a 36° L/h per un totale di 75 minuti di tempo per uno scarico completo del serbatoio).

**Tabella 22.** Prove di sanitizzazione dell'impianto.

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

**Tabella 23.** Valutazione dell'apporto di aria sterile alla coltura durante la produzione.

Portata compressore utilizzato nelle prove (L/min)	Pressione (atm)	Tempo di ossigenazione accettabile secondo i requisiti prestabiliti (h)
100	1,5	2
200	3,0	4
800	8,0	10

**Documenti: "Allegato impianto" al sito <http://vicastart.it/risultati-del-primo-anno/>**

.....A 5.3 *Messa a punto della produzione di lievito (FOODMICROTEAM)*

Il protocollo di produzione da definire dovrà prendere in considerazione le seguenti variabili:

- 1) Composizione del mezzo di coltura da utilizzare (mosto vero più o meno diluito, integrato o meno con vari nutrienti quali azoto ammoniacale, fattori di crescita di vario tipo, ecc.);
- 2) Parametri di crescita che possono influenzare la fase lag, il rendimento e la velocità di crescita: temperatura, pH, ossigeno, concentrazione di zuccheri, ecc.;
- 3) Stato fisiologico delle cellule (dopo centrifugazione devono mantenere una buona vitalità a 4°C per almeno il tempo utile per essere impiegate, devono sopravvivere ad elevate percentuali una volta inoculate in mosto);
- 4) Valutare se e eventualmente in che misura ceppi diversi richiedono modifiche o meno al protocollo.

Tutto ciò potrà essere realizzato con poco spreco di materiali da FoodMicroTeam grazie al fatto che dispone di un piccolo impianto pilota. Al termine di questa fase di messa a punto, sarà fornito un protocollo riguardante la composizione del mezzo di crescita e i parametri di processo adeguati ai ceppi selezionati. La scelta di ciò sarà decisa sulla scorta di risultati analitici (analisi chimiche di substrati e prodotti del metabolismo dei lieviti, quantificazione delle cellule vitali, verifica della stabilità genetica del ceppo). Il protocollo una volta individuato dovrà poi essere testato presso l'impianto vero e proprio pertanto saranno previsti spostamenti giornalieri fino alla messa in opera del processo.

Indicativamente (ipotizzando di realizzare una ventina di combinazioni diverse tra i parametri sopra riportati) per questa attività saranno necessarie circa 80 analisi chimiche, 80 microbiologiche e 20 analisi molecolari.

Questa attività richiederà due unità di personale di FoodMicroTeam: il Dr. Giacomo Buscioni per la gestione dell'impianto pilota e il coordinamento delle varie operazioni, la Dr.ssa Silvia Mangani per eseguire le varie analisi ed elaborarle statisticamente. Entrambe le unità di personale sono tenute a preparare dei report con i risultati ottenuti e le criticità evidenziate.

Incontri settimanali saranno organizzati tra GESAAF e FoodMicroTeam per valutare la qualità dei risultati e coordinare le attività.

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 5.3 I anno**

Questa attività ha richiesto due unità di personale di FoodMicroTeam: il **Dr. Giacomo Buscioni** per la preparazione degli inoculi e l'esecuzione materiale delle prove con l'impianto pilota, **la Dr.ssa Silvia Mangani** per eseguire le varie analisi chimiche e microbiologiche nonché la loro elaborazione. Entrambe le unità di personale si sono interfacciate con il **Dr. Damiano Barbato** che si è occupato della gestione dell'impianto durante l'esecuzione delle diverse prove.

La definizione di un protocollo di produzione della biomassa ottimale ha previsto una serie di prove volte a stabilire sia il **protocollo da attuare per la preparazione delle cellule da inoculare nel fermentatore**, sia la **composizione del terreno di coltura** più idoneo tenendo presente non solo la quantità di biomassa che deve essere prodotta, ma anche il costo e la reperibilità sul mercato della materia prima necessaria. Sono state condotte tredici prove per ottimizzare tali condizioni colturali. Si riportano i risultati ottenuti dall'interpretazione delle suddette prove.

Per quanto riguarda la **preparazione dell'inoculo**, il protocollo migliore è risultato il seguente:

- **PRIMO GIORNO:** prelievo della colonia da piastra ottenuta da uno striscio di purificazione del lievito conservato a -80°C e inoculo in beuta da 100 mL contenente 50 mL di mezzo YEPD o YM (incubazione a 28°C 24h in agitazione). Al termine della crescita sono state effettuate analisi molecolari per verificare l'identità dei lieviti in termini di specie e di ceppo.
- **SECONDO GIORNO:** trasferimento di 20 mL di coltura dalle beute da 100 mL di coltura in beute da 2 L contenente 1 L di YEPD o YM effettuato su 3 beute incubate in termostato 28°C per 24h in agitazione. Sono state eseguite letture allo spettrofotometro per verificare il corretto incremento cellulare ed eseguire il prelievo delle cellule in fase stazionaria oppure in fase esponenziale.
- **TERZO GIORNO:** controllo microbiologico (conte vitali in piastra per valutare l'eventuale presenza di inquinanti) e conta delle cellule di lievito tramite camera di Thoma. Al raggiungimento del numero cellulare desiderato è stato eseguito l'inoculo in fermentatore. Lo sviluppo cellulare è da ritenersi soddisfacente quando è superiore ai 100 milioni di cellule per millilitro.

Per quanto riguarda la scelta della **composizione del mezzo**, i substrati sicuramente indispensabili per la crescita dei lieviti sono risultati i seguenti:

MCR: lo zucchero è stato aggiunto nelle prove in dose di 1 g/L/ora con risultati soddisfacenti. I lieviti hanno mostrato un metabolismo respiratorio ed è stato evitato l'effetto Crabtree. Nelle prove è stato consumato più rapidamente il glucosio rispetto al fruttosio. Le prove che prevedevano un tempo di crescita di 8 ore sono terminate con piccoli quantitativi di zucchero residuo. Viceversa, le prove di 24 ore, che prevedevano, dopo 8 ore, l'aggiunta 10 g/L di zucchero, hanno dato fermentazioni che alle 24 h non mostravano nessuno zucchero residuo.

Azoto: dalla letteratura scientifica è risaputo che la migliore fonte di azoto per lo sviluppo dei lieviti è rappresentata dai composti ammoniacali, ma la crescita risulta molto più rapida in presenza anche di miscele di aminoacidi. Il mezzo più idoneo per la crescita e la produzione dei lieviti in funzione non solo della biomassa prodotta ma anche del costo è stato valutato attraverso una serie di prove. Il miglior mezzo di crescita è risultato essere il terreno YEPD ma per il costo eccessivo non è risultato utilizzabile. Dalle prove si evince come il prodotto "Nutravit Lallemand", utilizzato a concentrazione di 1,5 grammi per litro di coltura, dia buoni risultati per l'apporto sia in azoto aminoacidico che ammoniacale nonché da un punto di vista della sostenibilità economica e della facilità di impiego in un impianto automatizzato, a differenza ad esempio di sostanze liquide o poco miscibili.

Al termine delle varie sperimentazioni il **protocollo ottimale** messo a punto è risultato il seguente:

#### **- IMPIANTO**

Utilizzo di un impianto pilota da 120 litri di volume.

#### **- PREPARAZIONE INOCULO**

Fase sterile per la preparazione dell'inoculo

Primo giorno: inoculo di una colonia in beuta da 100 mL contenente 50 mL di YEPD (termostato 28°C 24h).

Secondo giorno: trasferimento di 20 mL di coltura dalle beute da 100 mL in beute da 2 L contenenti 1 L di YEPD effettuato su 3 beute (20 mL in 1000 mL) in termostato a 28°C per 24h.

Terzo giorno: inoculo in fermentatore (T0).

#### **- PRODUZIONE DELLA BIOMASSA NELL'IMPIANTO PILOTA.**

Durata del processo di produzione: 8 h.

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

Ossigeno aggiunto tramite un microdosatore 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.

Mezzo di coltura (start):

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

Mezzo di coltura (ogni ora):

- aggiunta di MCR solido con cadenza oraria (1 gr/L totale a h) per evitare l'effetto Crabtree.

- Monitoraggio pH, temperatura e ossigeno. Analisi microbiologiche tramite conte vitali in doppio attraverso la camera di Thoma. Analisi chimiche effettuate tramite HPLC.

Mezzo di coltura (alla quarta ora):

- immissione di 70 litri di acqua trattata con UV a 60 L/h.

- nuova aggiunta della fonte azotata Nutravit Lallemand (1,5 gr/h).

- continua aggiunta di MCR solido con cadenza oraria (1 gr/L totale a h) per evitare l'effetto Crabtree.

- pH 5 corretto tramite acido ortofosforico 1:4.

- Raccolta delle cellule dopo 8 ore (circa 60-80 milioni di cellule/mL).

### **-OTTENIMENTO DELLA BIOMASSA IN FORMA DI PASTA**

Raccolta delle cellule mediante centrifugazione.

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 alla centrifuga e conservata in vasetti a 4°C. La pasta deve avere un'umidità del 70%.

### **- CONTROLLO DI QUALITA' SULLA 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.

### **-PULIZIA DEL FERMENTATORE**

Lavaggio e disinfezione del tino di fermentazione effettuata con acido peracetico in concentrazione del 2%.

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 5.3 nel II anno**

Nel corso del II anno è stato testato il protocollo messo a punto per ottimizzare il dosaggio dei nutrienti e per tenere maggiormente sotto controllo il processo di produzione. Questa attività ha richiesto due unità di personale di FoodMicroTeam: il **Dr. Giacomo Buscioni** per la preparazione degli inoculi e l'esecuzione materiale delle prove con l'impianto pilota, la **Dr.ssa Silvia Mangani** per eseguire le varie analisi chimiche e microbiologiche nonché la loro elaborazione. Entrambe le unità di personale si sono interfacciate con il **Dr. Damiano Barbato** che si è occupato della gestione dell'impianto durante l'esecuzione delle diverse prove.

Per migliorare la resa è stato ottimizzato il dosaggio dei nutrienti e la veicolazione in uscita del vapore prodotto dalla coltura. Il dosaggio degli zuccheri è stato ridimensionato visto l'aumento delle ore della seconda fase del ciclo dove necessita dell'apporto continuo di zuccheri passando da 8 ore a 15 h. Per ovviare a questo problema è stato aggiunto un secondo dosatore inserendo uno scarico automatico alternato in modo da evitare tempi di stazionamento della polvere troppo lunghi e considerati rischiosi per aggregazioni solide della polvere. Il vapore proveniente dal liquido in agitazione crea un rischio per la fuoriuscita dello zucchero dal beccuccio del dosatore. Dal momento che è stato innestato un tappo, un sistema di chiusura in acciaio sulla superficie del serbatoio, forato solo in prossimità del punto dove si inserisce il

becco del serbatoio del distributore dello zucchero, il vapore e l'umidità generata dal brodo di coltura in agitazione sono convogliati verso il foro andando a creare un problema nella fuoriuscita dello zucchero che si scioglie e va a bloccare il beccuccio. Dall'altra parte questo flusso verso l'esterno in continuo può essere considerato un punto di forza per l'igiene del brodo di coltura perché il flusso in uscita rallenta e crea problemi per l'ingresso di potenziali inquinanti. Il problema è stato risolto installando un flusso di aria sterile continua in prossimità della coclea di scarico della polvere per essiccare lo zucchero ed evitare il problema dello scioglimento dello stesso all'interno del dosatore.

Al fine di tenere maggiormente sotto controllo il processo di produzione, sono stati inseriti nuovi punti di campionamento. È stato installato un nuovo punto di campionamento situato nella parte bassa del fermentatore per permettere di effettuare campionamenti nelle fasi in cui i volumi sono inferiori ai 200 litri (livello del punto di campionamento inizialmente installato e tuttora presente), situazione reale durante il primo step del ciclo (prime 4 ore).

In conclusione, l'impianto ottenuto è ritenuto utilizzabile da personale addestrato della cantina e garantisce la produzione di uno *starter* qualitativamente soddisfacente e analiticamente rispondente ai requisiti di sicurezza microbiologica e chimica stabiliti dall'OIV, ed è capace di produrre vini che rispondano all'obiettivo enologico della cantina stessa. Il risultato ottenuto dalla produzione dei due ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* è stato soddisfacente per la cantina che ha potuto utilizzare lo *starter* nelle proprie vinificazioni su scala industriale.

## AZIONE 6

### FERMENTAZIONE INDUSTRIALE DEL VINO

#### *A 6.1 Preparazione dell'inoculo da utilizzare in cantina (FOODMICROTEAM)*

Inoculi dei lieviti selezionati e coltivati in cantina in occasione della vendemmia 2017 (Analisi chimiche, microbiologiche, biomolecolari). I lieviti scelti come starter (da 1 a 3 ceppi) saranno coltivati separatamente in laboratorio per poi essere inoculati in mosto una volta trasportati in cantina. Più in dettaglio, gli inoculi dei lieviti selezionati saranno preparati in laboratorio (alcuni grammi di biomassa per ciascun ceppo) coltivandoli in sterilità e in purezza su un mezzo adeguato. Al raggiungimento della fase stazionaria (valutata mediante analisi di torbidità allo spettrofotometro) le cellule saranno centrifugate e lavate in soluzione fisiologica. Prima di portare la biomassa in cantina per avviare la produzione vera e propria questa sarà analizzata microbiologicamente per valutare non solo il numero di lieviti vitali presenti, ma anche l'assenza di microrganismi indesiderati. Sarà anche verificato il ceppo mediante analisi molecolari secondo le metodiche sopra esposte. In particolare, per verificare la purezza di ciascun preparato, e quindi l'assenza di microrganismi inquinanti, saranno condotte analisi microbiologiche (almeno 6 analisi per la ricerca di: carica batterica totale, coliformi, lieviti non-*Saccharomyces*, batteri lattici, muffe) e analisi molecolari per verificare il profilo genetico del ceppo (almeno 20 colonie per ciascun preparato). La vitalità del lievito presente in ciascun preparato (almeno 6 analisi), e quindi il numero di cellule vitali per grammo di inoculo, sarà fatta utilizzando un metodo diretto che prevede l'impiego di una camera conta globuli (la camera di Thoma) un microscopio ottico e un colorante che consente di distinguere le cellule vive da quelle morte. Una volta appurata la purezza e la vitalità cellulare, ciascun preparato sarà impiegato singolarmente per inoculare il bioreattore e produrre una quantità di biomassa adeguata ad inoculare il mosto messo a disposizione da VICAS in occasione della vendemmia 2017. La preparazione dell'inoculo sarà svolta da una unità di personale di FoodMicroTeam (Dr. Buscioni) che si occuperà anche dei prelievi giornalieri per seguire la fermentazione, mentre la

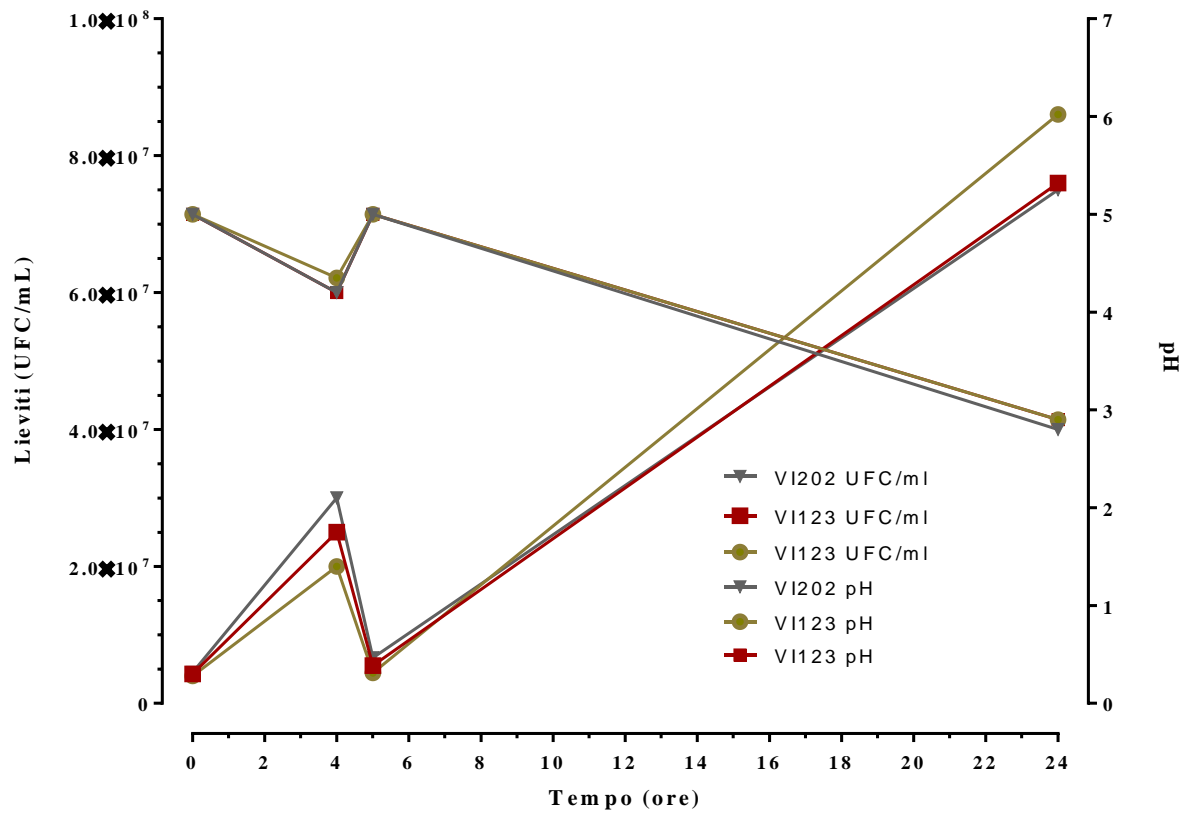
verifica della sua purezza e vitalità sarà eseguita da una seconda unità di personale (Dr.ssa Mangani).

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 6.1 nel I anno**

Questa attività ha richiesto due unità di personale di FoodMicroTeam: il **Dr. Giacomo Buscioni** per la preparazione degli inoculi e per eseguire i prelievi dei campioni di coltura da analizzare, la **Dr.ssa Silvia Mangani** per eseguire le varie analisi chimiche e microbiologiche sulle paste prodotte. Entrambe le unità di personale si sono interfacciate con il **Dr. Damiano Barbato** che si è occupato della gestione dell'impianto durante l'esecuzione delle diverse prove. Sono stati effettuati tre cicli di produzione effettivi per la vendemmia 2017; il primo con il ceppo selezionato *Saccharomyces cerevisiae* VI202, il secondo e terzo ciclo utilizzando il ceppo *Saccharomyces cerevisiae* VI123.

Le biomasse sono state prodotte utilizzando l'impianto e le procedure messe a punto in A5.2 secondo i protocolli riportati in A5.3. Le curve di crescita e il pH sono stati monitorati durante le produzioni a 0, 5, 24 ore e i risultati ottenuti sono riportati in figura 22. In tabella 13 sono invece riportate le caratteristiche fisiche e microbiologiche delle biomasse (liquide e centrifugate) appena prodotte con 20 ore di attività del fermentatore. Come si evince dalla tabella, la resa del fermentatore in termini di concentrazione cellulare di cellule vitali a fine ciclo era compresa fra  $7,5 \times 10^6$  cellule/ml e gli  $8,6 \times 10^6$  cellule/ml (metodo: conteggio delle cellule di *S. cerevisiae* mediante camera di Thoma e utilizzo del colorante a base di blu di metilene per discriminare le cellule vive da quelle morte). Una volta centrifugata la coltura, la quantità di pasta ottenuta era compresa fra i 2000 e i 2200 grammi con una concentrazione di *S. cerevisiae* nella pasta nell'ordine di  $10^{10}$  cellule per g, in linea con quanto atteso sulla base del protocollo scelto. Per valutare la qualità della pasta è stata anche quantificata la sua umidità utilizzando il metodo dell'essiccazione in stufa pesando la biomassa prima e dopo il trattamento con il calore. La pasta ha dimostrato di possedere un'umidità dell'80%, un valore questo atteso sulla base del protocollo scelto ed ottimale secondo quanto riportato in letteratura. Infine, per valutare la qualità microbiologica della pasta, i microrganismi inquinanti sono stati quantificati utilizzando il metodo della conta in piastra sui mezzi di coltura PCA per la carica batterica totale e VRBA+MUG per i coliformi. La carica microbica totale si è dimostrata in tutte le produzioni nell'ordine di  $10^4$  UFC/ml e quindi al di sotto dei valori critici riportati dalla legislazione che vedono come limite massimo per i batteri nell'ordine di  $10^5$  UFC/ml. Per quanto riguarda invece i coliformi, questi sono risultati sempre al di sotto del limite di rilevabilità (<10 UFC/g) e quindi ben al di sotto del limite di  $10^2$  UFC/ml imposto per legge.

Sempre in tabella 13 sono riportati i dati di *shelf life* della pasta una volta conservate a +4°C per 40 giorni. Dai risultati ottenuti si evince una diminuzione del 5% della vitalità dei lieviti e un incremento della contaminazione microbica totale di circa il 30% in tutti i campioni ma comunque sempre al di sotto limiti consentiti per legge. I coliformi sono risultati sotto il limite di rilevabilità (<10 UFC/g) in tutti i campioni saggiati.



**Figura 22.** Curva di crescita in relazione agli andamenti del pH di *Saccharomyces cerevisiae* VI202 e VI123 (due produzioni) durante la produzione di crema di lievito effettuata in cantina a settembre 2017.

**Tabella 24.** Caratteristiche fisiche e microbiologiche della pasta di lievito utilizzata in vendemmia 2017; un controllo microbiologico è stato effettuato a 40 giorni dalla produzione durante la conservazione a +4°C.

<b>Ceppo di <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>VI202</b>	<b>VI123</b>	<b>VI123</b>
<b>Produzione (data)</b>	5/9/2017	6/9/2017	7/9/2017
<b>Durata prova (h)</b>	20	20	20
<b>Concentrazione finale lieviti nel brodo di coltura (cell/mL)</b>	7,5+10 <sup>7</sup>	8,6+10 <sup>7</sup>	7,9+10 <sup>7</sup>
<b>Pasta di lievito ottenuta (gr/ciclo)</b>	2000	2200	2000
<b>Concentrazione pasta di lievito (cell/gr)</b>	1,00+10 <sup>10</sup>	1,3+10 <sup>10</sup>	1,1+10 <sup>10</sup>
<b>Umidità pasta di lievito (%)</b>	80	78	80
<b>Carica batterica totale (cell/g)</b>	1,50+10 <sup>4</sup>	3,00+10 <sup>4</sup>	2,8+10 <sup>4</sup>
<b>Coliformi totali (UFC/g)</b>	<10	<10	<10
<b>Controllo shelf life (40 giorni +4°C)</b>			
<b>Mortalità cellule pasta di lievito (%)</b>	5	5	5
<b>Carica batterica totale (UFC/g)</b>	2,50+10 <sup>4</sup>	3,00+10 <sup>4</sup>	3,60+10 <sup>4</sup>
<b>Coliformi totali (UFC/g)</b>	<10	<10	<10

#### *A6.2 Fermentazioni (FOODMICROTEAM)*

Una volta inoculati i lieviti, l'impianto produttivo sarà gestito come stabilito sulla base della messa a punto dell'impianto e le fermentazioni saranno controllate campionando periodicamente il mosto/vino (indicativamente prelievi giornalieri). I campioni ottenuti saranno sottoposti ad analisi chimiche, microbiologiche e biomolecolari per verificare il corretto svolgimento della fermentazione alcolica e la dominanza dei ceppi inoculati (A 6.3 e 6.4). Sui vini finiti saranno eseguite analisi chimiche del profilo aromatico dei vini (almeno 3 ceppi diversi daranno 3 vini che saranno analizzati in doppio per un totale di 6 analisi, i risultati saranno confrontati con 2 vini prodotti dall'azienda a partire dallo stesso mosto ma utilizzando ceppi del commercio – analisi eseguite da un laboratorio esterno).

Più in dettaglio, il protocollo impiegato sarà quello messo a punto nell'azione 5. Durante la produzione della biomassa (supervisionata e gestita dal Dr. Buscioni), per verificare che tutto proceda come dovuto saranno condotte analisi microbiologiche (6.3) e chimiche (6.4). Le prime serviranno sia a quantificare le cellule vitali del lievito in modo da verificare il corretto svolgimento della crescita che l'assenza di inquinanti, le seconde serviranno a valutare lo stato fisiologico delle cellule e l'andamento delle fermentazioni. La gestione della fermentazione e l'attività di monitoraggio giornaliera in cantina (prelievo campioni e osservazioni al microscopio)

sarà svolta da una unità di personale di FoodMicroTeam (Dr. Buscioni), le analisi microbiologiche e biomolecolari saranno eseguite da una seconda unità di personale di FoodMicroTeam (Dr.ssa Mangani), come riportato più in dettaglio nell'azione 6.3. Le analisi chimiche invece saranno gestite dal GESAAF secondo quanto riportato nell'azione 6.4. In questa fase, durante cioè le attività di cantina, saranno presenti anche le unità di personale del GESAAF precedentemente coinvolte nella messa a punto dell'impianto per verificare il corretto svolgimento di tutte le operazioni ed eventualmente apportare le modifiche necessarie (impiantistiche o di protocollo).

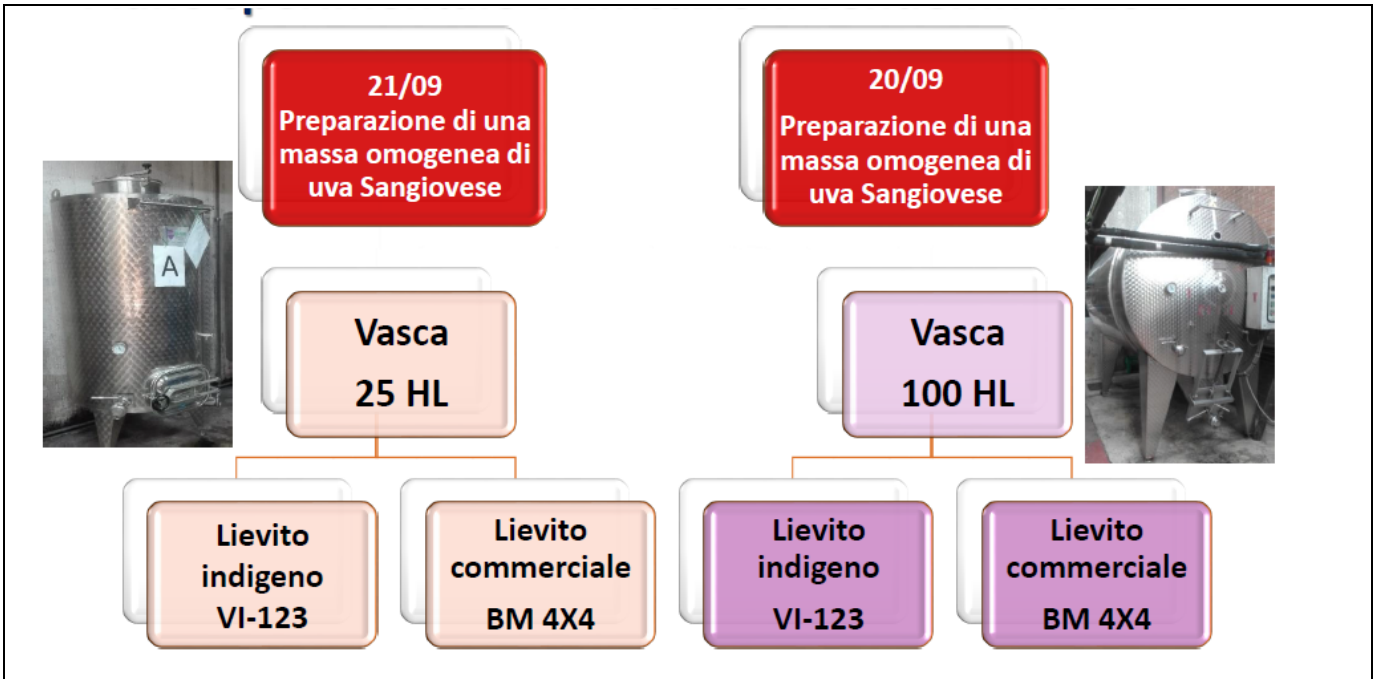
#### **ATTIVITA' SVOLTE per A 6.2 nel II anno**

Le attività A 6.2 sono state svolte presso la VICAS il cui personale ha dato supporto nelle varie operazioni necessarie all'allestimento dei vasi vinari e alle varie operazioni di cantina.

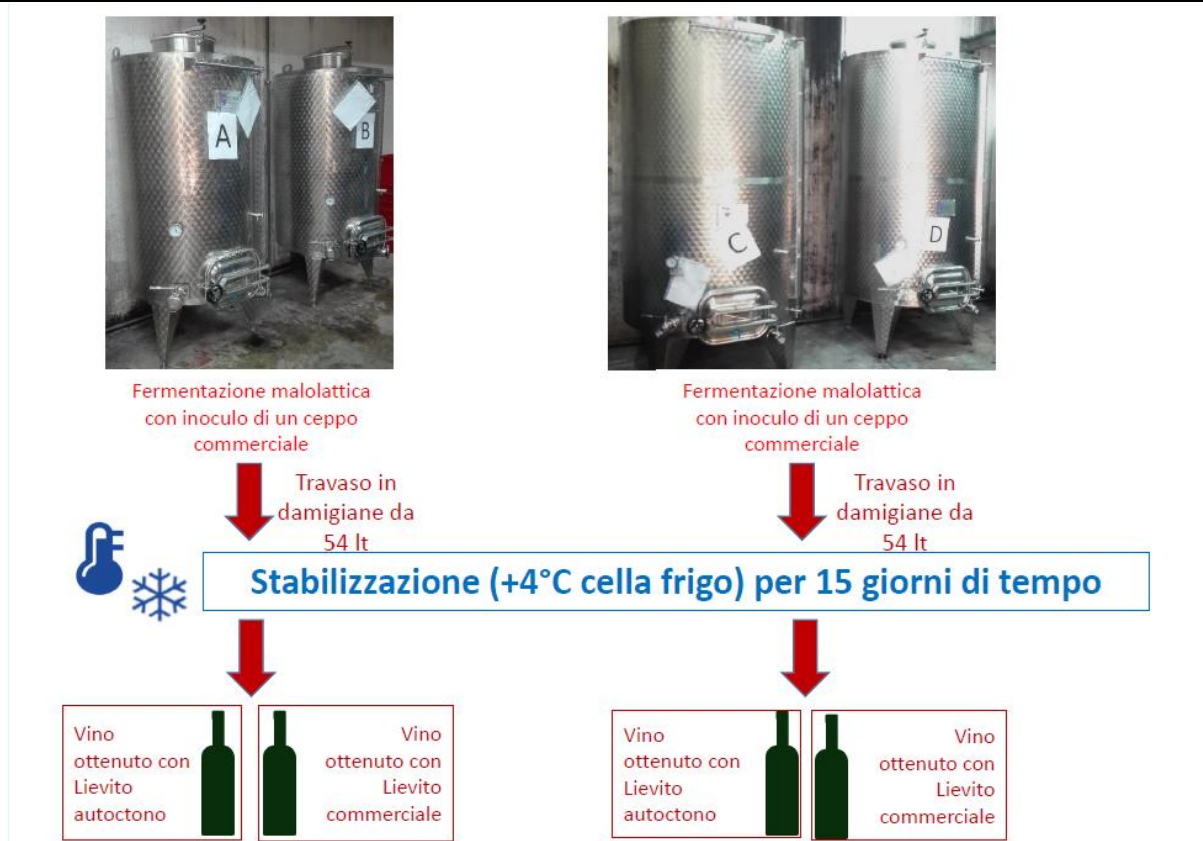
La pasta di lievito prodotta in A 6.2 è stata utilizzata dal Dr. Giacomo Buscioni per inoculare masse omogenee di uva secondo lo schema sperimentale riportato in figura 23 Più in dettaglio, sono state allestite quattro vasche, due da 25 HL e due da 100 HL con uva Sangiovese che sono state inoculate con il lievito autoctono VI-123 oppure con il ceppo commerciale BM4x4.

Inoltre, un terzo lievito autoctono, il ceppo VI-202, è stato inoculato in una vasca contenente **300hL di mosto**. La scarsità di uve dell'annata 2017 non ha consentito né di effettuare delle repliche delle vasche inoculate né di saggiare un numero più elevato di ceppi autoctoni.

Al termine della fermentazione alcolica (per le valutazioni analitiche, A6.3), i vini sono stati svinati e trasferiti nei serbatoi da 10 e 25 HL (opportunamente sanitizzati) e inoculati con un ceppo di *Oenococcus oeni* commerciale per far avvenire la fermentazione malolattica (Figura 24). Una volta terminato l'acido malico (si veda A6.3), il vino è stato travasato in damigiane (54L) e stabilizzato a freddo (4°C) per 15 giorni. Al termine dei 15 giorni, il vino è stato imbottigliato. Nelle varie fasi descritte e a intervalli di tempo regolari sono stati prelevati in sterilità dei campioni di mosto/vino che sono stati analizzati chimicamente e microbiologicamente secondo quanto riportato in A6.3.



**Figura 23:** Schema sperimentale in cui è riportato l'allestimento delle vasche inoculate con il ceppo autoctono VI-123 e quello commerciale BM4x4.



**Figura 24:** Schema sperimentale in cui è riportato l'allestimento dei tini dopo la svinatura per la fermentazione malolattica e il successivo imbottigliamento.

**Documenti: Allegato Vendemmia 2017 al sito:  
<http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/>**

### *A6.3 Analisi chimiche, microbiologiche e biomolecolari dei vini (FOODMICROTEAM)*

Nel corso della fermentazione alcolica saranno eseguite analisi chimiche sui vini e molecolari sui lieviti che hanno condotto la fermentazione alcolica al fine di verificare la dominanza del ceppo inoculato. Sui ceppi dominanti isolati a fine fermentazione sarà verificato anche il mantenimento delle capacità tecnologiche (uso di mosto sintetico in beute con valvola di Muller, sperimentazione come A4.1).

Più in dettaglio, una volta che i ceppi selezionati saranno inoculati in mosto, prelievi giornalieri saranno eseguiti e analizzati microbiologicamente (lieviti, batteri lattici, batteri acetici) per verificare il corretto andamento delle fermentazioni alcoliche inoculate (prelievi giornalieri su ciascuna fermentazione). Le analisi microbiologiche saranno eseguite da una unità di personale di FoodMicroTeam (Dr.ssa Mangani). Saranno anche svolte analisi molecolari al fine di valutare l'effettiva dominanza del ceppo autoctono inoculato in ciascuna fermentazione (Dr.ssa Mangani). Si prevede di eseguire per ogni fermentazione avviata, tenendo presente che una fermentazione alcolica può durare in media 15 giorni, mediamente 15 analisi chimiche (azione 6.4) e 15 analisi microbiologiche in doppio e 2 analisi molecolari per verificare la dominanza del ceppo inoculato (una a metà fermentazione, una fine prelevando almeno 20 colonie ogni volta). Supponendo che le fermentazioni allestite con i ceppi autoctoni siano 3 e che le fermentazioni impiegate come controllo siano 2, avremmo circa 90 analisi microbiologiche per ciascuna tipologia di microrganismo ricercato (lieviti, batteri lattici, batteri acetici), 6 analisi molecolari per arrivare al ceppo. Un laboratorio esterno svolgerà le analisi del profilo aromatico dei vari vini prodotti e di quelli prodotti dalla VICAS a partire dallo stesso mosto per valutare le differenze (3 + 2 in doppio = 10 analisi). Il Dr. Buscioni si occuperà dell'elaborazione dei dati e della realizzazione di grafici degli andamenti delle varie fermentazioni raccogliendo tutti i dati sperimentali: microbiologici, biomolecolari, chimici e sensoriali (6.4).

### **ATTIVITA' SVOLTE per A 6.3 nel II anno**

Nel corso della fermentazione alcolica sono stati eseguiti come previsto prelievi quasi giornalieri di mosto/vino per eseguire varie tipologie di analisi. In particolare, sono state condotte analisi chimiche e microbiologiche sui mosti/vini per verificare il corretto andamento della fermentazione alcolica e analisi molecolari sulla popolazione di lieviti al fine di verificare la dominanza del ceppo inoculato. Tutte le analisi sono state eseguite in doppio. Sui ceppi dominanti isolati a fine fermentazione è stato confermato il mantenimento delle capacità tecnologiche dei ceppi VI123 e VI202 (uso di mosto sintetico in beute con valvola di Muller, sperimentazione come A4.1). In Tabella 25 sono riportati i risultati delle analisi chimiche e microbiologiche del mosto al momento del riempimento dei tini, mentre nelle figure 25-27 sono raffigurati gli andamenti delle fermentazioni in termini di crescita dei lieviti, di degradazione di substrati e rilascio di prodotti del metabolismo microbico. Le analisi molecolari sui lieviti sono state condotte a metà e a fine fermentazione alcolica ed hanno confermato la presenza univoca dei ceppi di lievito inoculati (100% delle colonie saggiate). La caratterizzazione fenotipica, condotta sugli stessi isolati indagati geneticamente, ha dimostrato il mantenimento delle capacità tecnologiche osservate in fase di selezione.

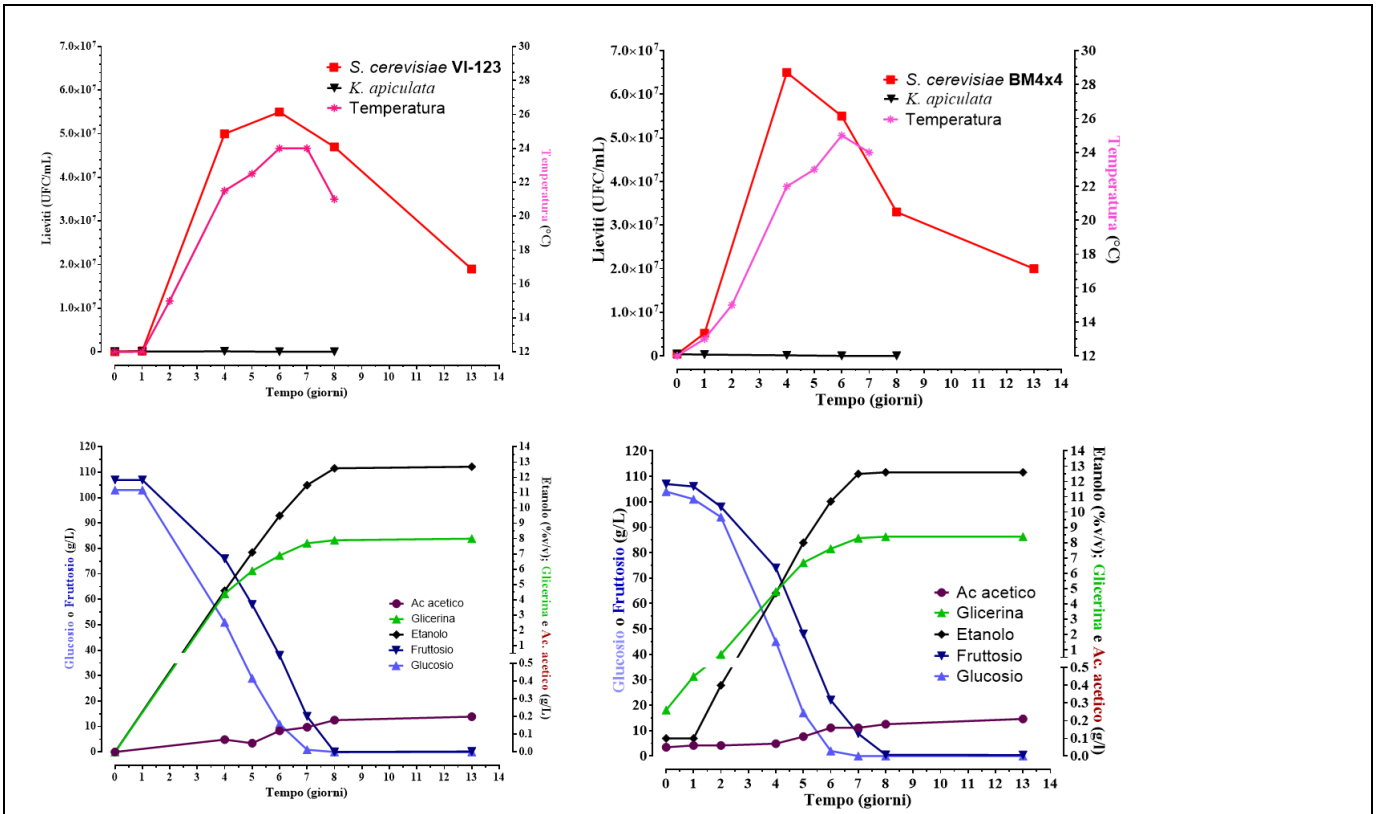
Per finire. I vini ottenuti sono stati analizzati da un laboratorio esterno per la loro composizione aromatica. I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente mediante analisi delle componenti principali (PCA) e sono mostrati in figura 28.

I risultati ottenuti dalla suddetta attività possono essere così commentati:

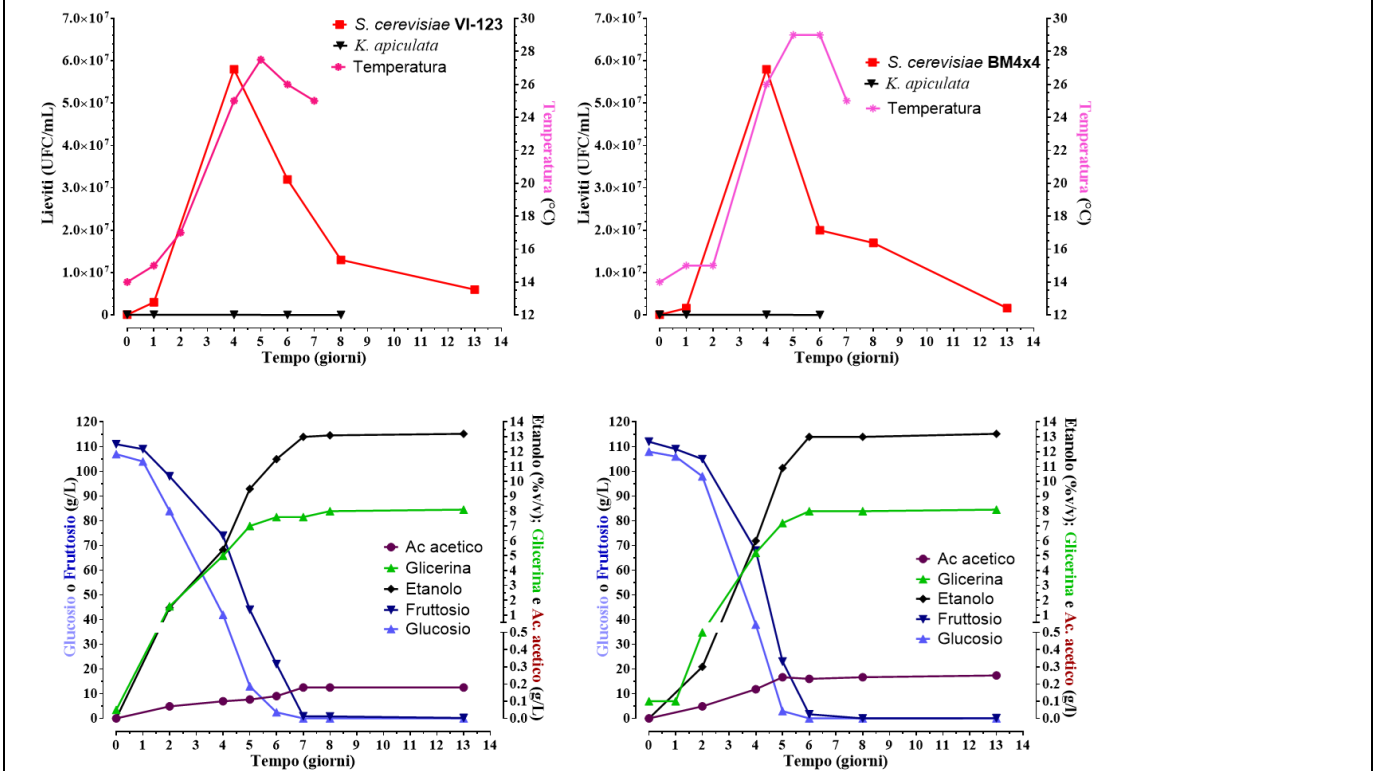
- Indipendentemente dalla dimensione della vasca i due ceppi autoctoni selezionati, *S. cerevisiae* VI-213 e *S. cerevisiae* VI-202, hanno condotto la fermentazione alcolica con cinetica analoga a quella del ceppo di lievito commerciale;
- I vini ottenuti con i due ceppi autoctoni hanno mostrato una composizione chimico-fisica non significativamente diversa dai vini ottenuti con il ceppo di lievito commerciale;
- L'analisi degli aromi nei vini imbottigliati ha evidenziato una composizione simile tra il ceppo *S. cerevisiae* VI-123 ed il ceppo commerciale 4x4 (Figura 28).

**Tabella 25:** Analisi chimiche e microbiologiche del mosto al momento dell'inoculo.

	BM4x4-25 hL	Vi-123-25 hL	BM4x4-100 hL	Vi-123-100 hL
<b>Parametri CHIMICI</b>				
<b>SO<sub>2</sub> Totale (mg/L)</b>	45	45	96	58
<b>Acidità totale (g/L)</b>	4.9	4.8	4.8	4.7
<b>pH</b>	3.42	3.30	3.28	3.43
<b>Glucosio (g/L)</b>	104	107	108	103
<b>Fruttosio (g/L)</b>	107	111	112	107
<b>Parametri MICROBIOLOGICI</b>				
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> (UFC/mL)</b>	4,2x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>4</sup>	7,0x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>
<b>Lieviti non <i>Saccharomyces</i> (UFC/mL)</b>	4,1x10 <sup>5</sup>	6,0x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>
<b>Batteri lattici (UFC/mL)</b>	<10	<10	<10	<10
<b>Batteri acetici (UFC/mL)</b>	1,6 x 10 <sup>3</sup>	440	200	1,2x10 <sup>3</sup>



**Figura 25:** andamenti delle fermentazioni da 100hL in termini di crescita dei lieviti, di degradazione di substrati e rilascio di prodotti del metabolismo microbico



**Figura 26:** andamenti delle fermentazioni da 25hL in termini di crescita dei lieviti, di degradazione di substrati e rilascio di prodotti del metabolismo microbico



#### A6.4 Analisi chimiche e sensoriali dei vini a fine fermentazione (GESAAF)

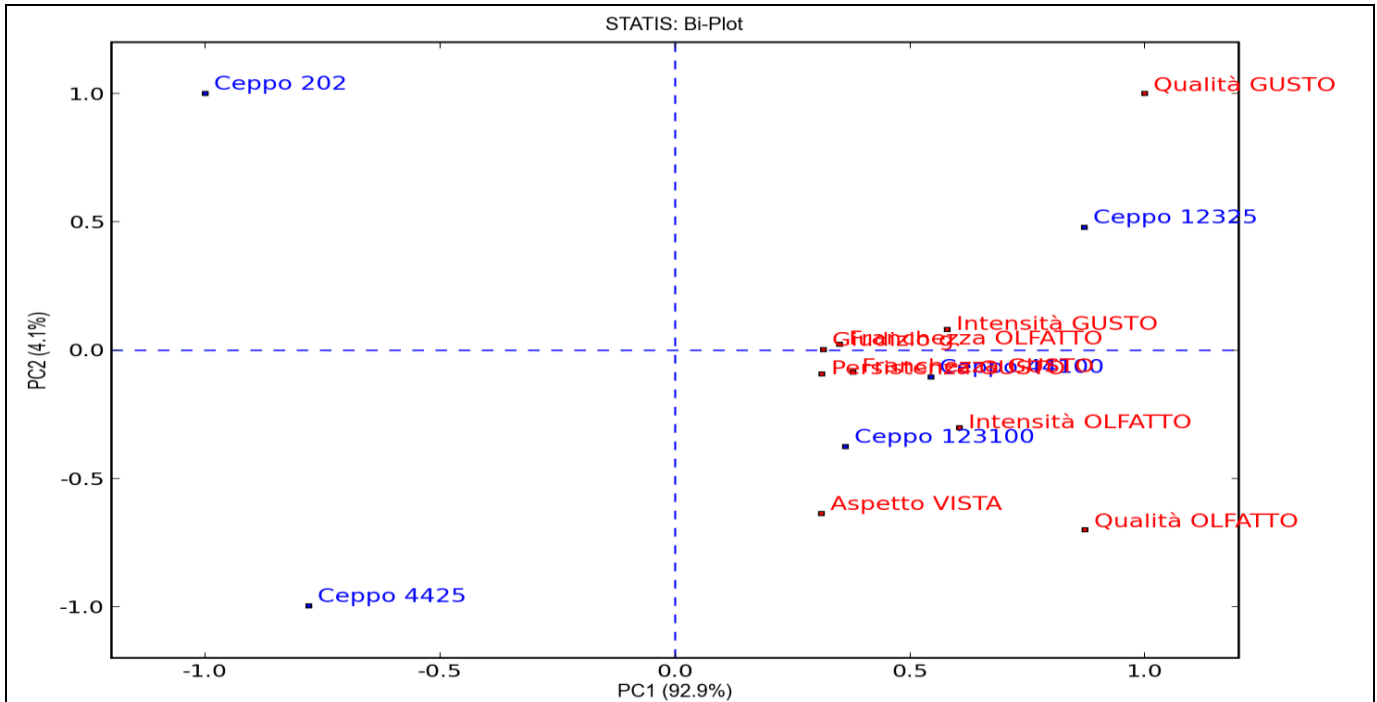
Con metodi simili alla fase 3.2 si valuta la qualità dei prodotti finiti. In particolare, i vini ottenuti saranno analizzati sia microbiologicamente per valutarne la stabilità (GESAAF – una unità di personale facente capo alla Prof.ssa Lisa Granchi) che chimicamente (laboratorio esterno). Infine, la qualità organolettica dei vini sarà valutata da un panel test addestrato (laboratorio esterno). Le attività del panel test saranno coordinate dal Prof. Alessandro Parenti. Le analisi saranno eseguite anche su due vini della VICAS prodotti nel modo tradizionale. Pertanto, ipotizzando di arrivare ad avere 3 vini sperimentali più 2 tradizionali e ipotizzando vinificazioni che durino circa 15 giorni (analisi in doppio quasi giornaliere), il numero di analisi chimiche (zuccheri, acidi organici, etanolo, anidride solforosa, acidità volatile, pH) da fare saranno circa su 50 campioni, mentre quelle organolettiche saranno su almeno 15 vini finiti.

#### ATTIVITA' SVOLTE per A 6.4 nel II anno

La qualità dei vini finiti ottenuti in A6.3 è stata valutata con lo stesso approccio utilizzato per i prodotti delle mesovinificazioni (A3.2). I vini sono stati prima analizzati chimicamente e microbiologicamente (Tabella 26), poi sono stati sottoposti ad analisi sensoriale mediante l'impiego di un panel test addestrato coordinato dal Prof. Alessandro Parenti in collaborazione con il Dr. Barbato e con il Dr. Romboli. I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente mediante analisi delle componenti principali (Figura 29). L'analisi sensoriale dei vini imbottigliati ha evidenziato una preferenza da parte del panel per i vini ottenuti con il ceppo autoctono *S. cerevisiae* VI-123. Pertanto, questo ceppo è stato prodotto durante il mese di Agosto 2018 in modo che la biomassa fosse disponibile per la Cantina VICAS in occasione della vendemmia 2018.

**Tabella 26.** Analisi chimiche dei vini ottenuti all'imbottigliamento.

VINI	VI-123 100HL	BM4x4 100HL	VI-123 25HL	BM4x4 25HL	VI-202 P 300HL
Etanolo (%v/v)	12.3	12.0	12.9	12.9	13.2
pH	3.47	3.51	3.20	3.15	3.39
Ac. totale (g/L)	4.7	4.6	5.7	5.8	5.2
Ac. volatile (g/L)	0.40	0.40	0.41	0.49	0.59
SO <sub>2</sub> totale (mg/L)	22	20	3	12	19
SO <sub>2</sub> libera (mg/L)	63	64	20	62	46



**Figura 29:** analisi delle componenti principali (PCA) dei risultati ottenuti dall'analisi sensoriale.

### Degustazione mediante la tecnica del Napping® a Villa Montepaldi 5 Luglio 2018

In occasione dell'evento organizzato da GESAAF e FOOD MICROTEAM "Lievitati autoctoni in enologia" in data 5 Luglio 2018 presso la sala convegni di Villa Montepaldi (San Casciano, Firenze) è stata allestita una degustazione riservata a tecnici e assaggiatori del settore (30 persone di età compresa tra 22 e 70 anni) per testare vini sperimentali ottenuti nella vendemmia 2017 in collaborazione con la cantina sociale VICAS durante il progetto regionale PIF-VICASTART (Figura 30).



**Figura 30.** Sala con postazioni per la degustazione dei vini sperimentali mediante la tecnica del Napping®

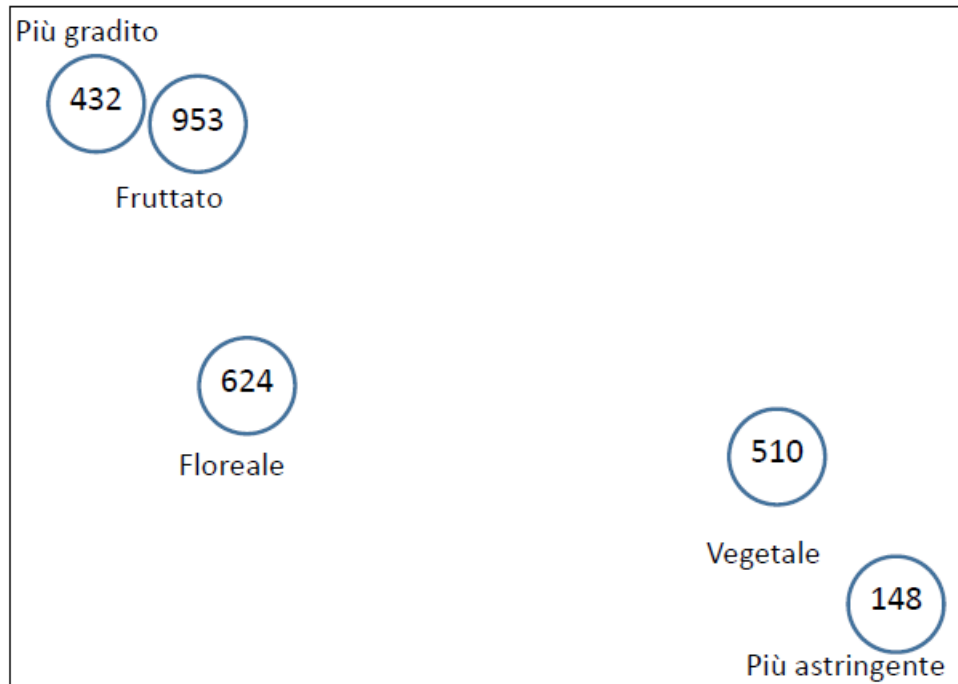
La finalità è stata quella di stimare la riconoscibilità dei vini prodotti con lieviti autoctoni rispetto agli stessi vini prodotti con lieviti con *starter* commerciali. Ogni soggetto è stato dotato di un foglio rettangolare, di 60x40 cm, ed istruito sulle modalità del test, così come sopra riportato, specificando che il grado di differenziazione fra i campioni, era espresso dalla distanza di posizionamento sul foglio e che il criterio di discriminazione, era completamente libero. Ad ogni esperto è stato presentato un set di 5 campioni codificati con un numero a tre cifre (set numerici randomizzati e unici per ogni giudice). In tabella 27 sono riportati i campioni di vino presi in esame.

**Tabella 27**

Vini	1	2	3	4	5 (REPLICA)
Ceppo <i>S.cerevisiae</i>	VI123	VI123	BM 4X4	BM 4X4	VI123
Serbatoio (HL)	100	25	100	25	100

Il campione 1 è stato replicato due volte (1-5) nella serie per introdurre un controllo della validità del responso. I campioni sono stati presentati secondo un ordine randomizzato. Ai soggetti è stato chiesto di iniziare da un qualsiasi campione della serie e dopo averne esaminato l'aspetto, l'odore ed il sapore di posizionarlo sul foglio, quindi di procedere alla valutazione di un nuovo campione e di posizionarlo sulla mappa in relazione alla similitudine con il precedente. Ad ogni nuovo campione i soggetti potevano effettuare confronti con i campioni precedentemente valutati in modo da formare gruppi in base alle similitudini ed alle differenze fino al completamento del set. Ai soggetti è stato indicato che non dovevano esitare nell'utilizzare tutta la superficie loro disponibile per rappresentare le differenze percepite. Al termine della valutazione, è stato chiesto di scrivere sulla mappa, in corrispondenza di ogni campione, il codice di identificazione e accanto ad ogni gruppo o singolo campione, se volevano il descrittore più efficace per connotarli e la preferenza. In figura 21 è riportato un esempio di mappa.

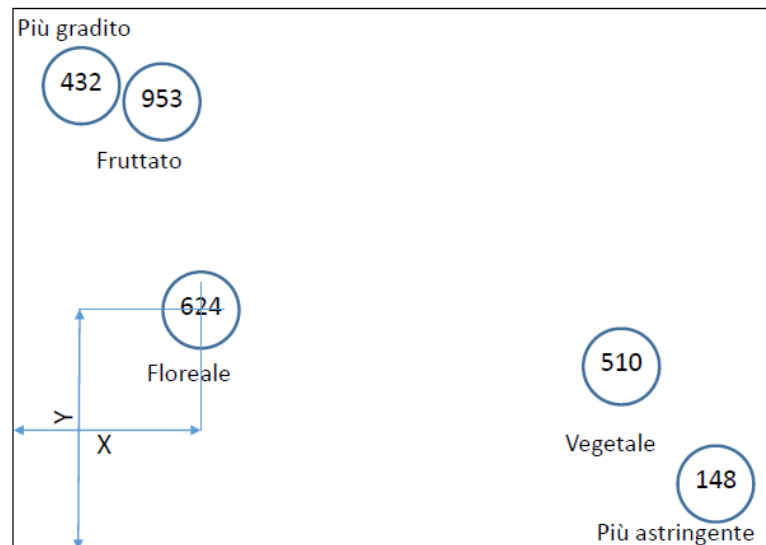
### Esempio Mappa



**Figura 31.** Esempio di mappa, i numeri rappresentano i campioni di vino sottoposti a degustazione.

Una volta effettuato il test si è provveduto all'elaborazione dei dati: per ogni mappa, sono state rilevate e misurate in cm, le coordinate cartesiane, di ogni campione, previa fissazione dello 0 degli assi nell'angolo in basso a sinistra del foglio 60x40. Da ogni mappa è stata ottenuta una matrice, nella quale le righe erano costituite dall'elenco dei campioni, e le colonne dalle coordinate x e y rilevate (Figura 32).

### Esempio Mappa



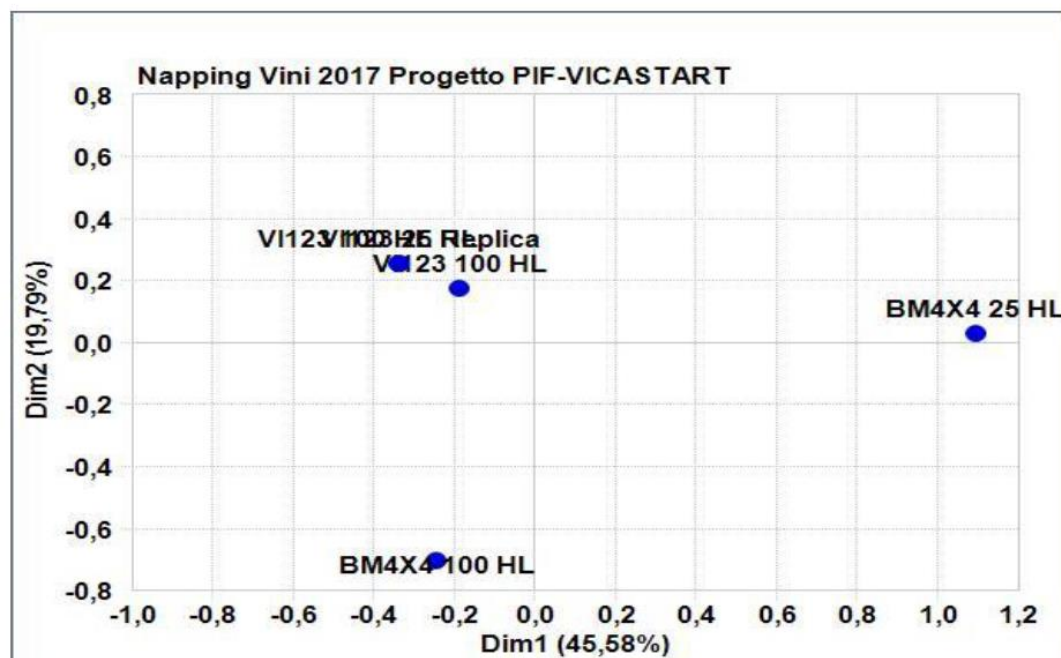
**Figura 32.** Sistema per calcolare le coordinate di ogni vino secondo ciascun giudice.

Tutte le matrici così ottenute, dopo essere state scalate, sono state elaborate mediante l'Analisi Procastica Generalizzata (GPA). I risultati di questa elaborazione ci permettono di individuare due gruppi distinti riconosciuti dai giudici. Un primo gruppo formato dai due vini (più il campione in replica) prodotti con ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* autoctoni e un secondo gruppo formato dai due vini prodotti con ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di starter commerciali. Il panel non addestrato ha messo in evidenza che un numero considerevole di soggetti è stato in grado di posizionare nella stessa area della mappa i due campioni replicati (Figura 33). Ai giudici era stata lasciata la possibilità di indicare qualora lo avessero voluto una preferenza per il campione più gradito e per il campione meno gradito (Figura 34).

#### RISULTATI

1. Il 70 % dei giudici ha espresso un giudizio per il campione più gradito.
  2. Il 66 % dei giudici ha espresso un giudizio per il campione meno gradito.
  3. **Il campione più gradito è stato per il 70 % dei giudici quello prodotto in serbatoio da 100 HL con un ceppo di lievito autoctono e l'attributo associato a questo campione più utilizzato è stato "fruttato".**
  4. Il campione meno gradito è stato quello prodotto in serbatoio da 25 HL con un ceppo di lievito starter commerciale e l'attributo più associato ad esso è stato "vegetale".
- In conclusione **il panel è stato in grado di distinguere vini ottenuti con ceppi starter autoctoni selezionati e con starter commerciali al di là della tecnologia differente di vinificazione in relazione alla capacità delle vasche (100 e 25 hL).**

#### NAPPING TEST



**Figura 33.** Elaborazione dei risultati del Napping® mediante l'Analisi Procastica Generalizzata (GPA).





La Cantina Sociale Viticoltori tra Arno e Sieve Società Cooperativa (V.I.C.A.S.), congiuntamente all'Università degli Studi di Firenze e a FoodMicroTeam S.r.l., hanno il piacere di invitarLa al

**SEMINARIO TECNICO**  
**“Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni” (VICASstart)**

Venerdì 16 Marzo ore 17.00 presso la  
Cantina Sociale Viticoltori tra Arno e Sieve Società Cooperativa  
Via Tifariti, 12 50035 Pontassieve (FI) Tel. 055-8314020

Ore 17.00 Saluti ed introduzione del Presidente V.I.C.A.S.  
*Stefano Fantechi*

Ore 17.10 Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni: finalità del progetto e fasi sperimentali.  
*Prof. Lisa Granchi (Responsabile scientifico) e Prof. Alessandro Parenti (GESAAF-Università di Firenze)*

Ore 17.25 Isolamento e caratterizzazione dei lieviti autoctoni della cantina VICAS.  
*Dr.ssa Eleonora Mari (relatore) (GESAAF-Prof. Granchi)*

Ore 17.40 Selezione dei ceppi autoctoni mediante meso-vinificazioni.  
*Dr Yuri Romboli (relatore) e Dr. Niccolò Pini (GESAAF – Prof. Granchi)*

Ore 17.55 Individuazione di un protocollo per la produzione della biomassa di lieviti.  
*Dr. Giacomo Buscioni (relatore) e Dr.ssa Silvia Mangani (FoodMicroTeam s.r.l. spin-off accademico, Università di Firenze)*

Ore 18.10 Messa a punto dell'impianto per la produzione di lieviti autoctoni in cantina.  
*Prof. Parenti (relatore), Dr. Damiano Barbato (relatore) e Giulia Angeloni (GESAAF – Prof. Parenti)*

Ore 18.30 Conclusioni e discussione: sviluppi futuri del progetto

Ore 18.45 Degustazione di vini sperimentali



Intervento realizzato con il cofinanziamento FEASR del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana sottomisura 16.2 Progetto “Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni” (VICASstart)

Le foto dell'evento sono visibili sulla pagina Facebook di FoodMicroTeam.  
Le presentazioni sul sito [www.vicastart.it](http://www.vicastart.it) (risultati primo anno).

Un altro evento è stato organizzato il **6 settembre 2018** presso la cantina VICAS per la presentazione dei risultati finali del progetto. Durante l'incontro, a scopo dimostrativo, è stata anche condotta una produzione dei lieviti mediante l'impianto realizzato e collocato in una parte della cantina confinata e lontana dai locali utilizzati per le vinificazioni. Infine, sono stati nuovamente degustati i vini prodotti con i lieviti autoctoni messi a confronto con quelli ottenuti con uno *starter* commerciale.



## **Presentazione dei risultati finali del progetto Vicastart: Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni.**

6 Settembre 2018, presso la Cantina Sociale Viticoltori tra Arno e Sieve  
Società Cooperativa Via Tifariti, 12 50035 Pontassieve (FI) Tel. 055-8314020

Per la gestione delle fermentazioni alcoliche, solitamente le aziende vitivinicole utilizzano lieviti starter commerciali, spesso a scapito della tipicità dei vini prodotti. L'impiego di lieviti autoctoni, quando adeguatamente selezionati per caratteristiche enologiche desiderate, può rappresentare una valida alternativa in grado di conferire ai vini caratteristiche sensoriali peculiari. Una volta selezionati i lieviti autoctoni per essere impiegati in produzioni reali di cantina, devono essere prodotti nelle quantità adeguate, essere vitali e in condizioni metaboliche ottimali per condurre in modo efficiente la fermentazione alcolica. Il progetto VICASTART ha avuto lo scopo di rendere la cantina VICAS in grado di produrre il proprio starter di lievito per condurre la fermentazione alcolica partendo da ceppi autoctoni selezionati per le caratteristiche enologiche desiderate.

**Ore 15:30 – Iscrizione**

**Ore 16:00 - Saluti ed introduzione del Presidente V.I.C.A.S. Dott. Stefano Fantechi**

**Ore 16:30 – Descrizione dell'impianto e dimostrazione pratica del suo impiego a cura del Dott. Damiano Barbato (GESAAF) in collaborazione con FoodMicroTeam**

**Ore 17:30 – Discussione (moderatori: Prof.ssa Lisa Granchi e Prof. Alessandro Parenti)**

**Per iscrizioni scrivere a:**  
[vicastart@foodmicroteam.it](mailto:vicastart@foodmicroteam.it)

**Per info sul convegno:**  
[www.foodmicroteam.it](http://www.foodmicroteam.it) sezione NEWS

**Per saperne di più sui risultati del progetto:**  
[www.vicastart.it](http://www.vicastart.it)



Intervento realizzato con il cofinanziamento FEASR del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana sottomisura 16.2 Progetto "Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni" (VICASTART)

Le foto dell'evento sono visibili sulla pagina Facebook di FoodMicroTeam.  
Le presentazioni sul sito [www.vicastart.it](http://www.vicastart.it) (risultati finali)

### *A7.2- Divulgazione del progetto sul web (VICAS)*

Si prevede di pubblicare i risultati del progetto su un sito *ad hoc* che sia linkato sulle home page dei siti web della cantina sociale (<http://www.vicas.it/htdocs/index.htm>), del GESAAF (<http://www.gesaaf.unifi.it/>) nonché sul sito web di FoodMicroTeam (<http://www.foodmicroteam.it/>).

ATTIVITA' SVOLTE per A 7.2

**E' stato creato il sito dedicato al progetto: <http://vicastart.it/>** dove sono riportati tutti i risultati del I e del II anno del progetto nonché tutti gli eventi organizzati. Sono disponibili e scaricabili tutti i file in pdf presentati in occasione di quest'ultimi.

Gli obiettivi del progetto sono visibili sulla pagina web:

<https://www.foodmicroteam.it/it/chisiamo-page.php#team>

I risultati relativi al primo anno di attività sono visibili alla pagina web:

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/progetto-sottomisura-16-2-psr-2014-2020-della-regione-toscana-filiera-corta-produttori-fra-arno-e-sieve-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni\\_3.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/progetto-sottomisura-16-2-psr-2014-2020-della-regione-toscana-filiera-corta-produttori-fra-arno-e-sieve-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni_3.html)

I risultati relativi al primo anno di attività in forma estesa ma divulgativa sono visibili alla pagina web:

[https://www.foodmicroteam.it/media/all\\_news/pif%20per%20sito.pdf](https://www.foodmicroteam.it/media/all_news/pif%20per%20sito.pdf)

I risultati presentati il 16 Marzo 2018 sono scaricabili alla pagina web:

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/seminario-tecnico-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-vicastart-1\\_12.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/seminario-tecnico-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-vicastart-1_12.html)

I risultati presentati il 5 luglio 2018 sono scaricabili alla pagina web:

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018\\_18.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018_18.html)

Sono stati anche pubblicati alcuni articoli su Agronotizie riguardanti sul progetto VICASTART:

[https://agronotizie.imagelinetwork.com/agricoltura-economia-politica/2017/10/16/foodmicroteam-la-ricerca-a-portata-delle-aziende/55959?utm\\_source=social&utm\\_medium=facebook&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-55959](https://agronotizie.imagelinetwork.com/agricoltura-economia-politica/2017/10/16/foodmicroteam-la-ricerca-a-portata-delle-aziende/55959?utm_source=social&utm_medium=facebook&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-55959)

[https://agronotizie.imagelinetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm\\_source=notifiche&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook](https://agronotizie.imagelinetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm_source=notifiche&utm_medium=email&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook)

### *A 7.3- Convegno conclusivo aperto ai soci del Chianti (GESAAF)*

Si prevede di organizzare al termine del progetto un evento divulgativo finale nel territorio del Chianti, con particolare coinvolgimento degli operatori del settore nell'area del Chianti Rufina.

**In sostituzione dell'evento previsto per i soci del Chianti è stato organizzato il 5 luglio 2018** un convegno nel quale sono stati presentati i progressi ottenuti con l'impianto di produzione dei lieviti autoctoni e la loro *performance* durante la vendemmia 2017. Infine, sono stati degustati i vini prodotti con i lieviti autoctoni messi a confronto con quelli ottenuti con uno *starter* commerciale.



## Lieviti autoctoni in enologia

**5 Luglio 2018**, AZIENDA AGRICOLA DI MONTEPALDI  
Via Montepaldi 12 - 50026 San Casciano In Val Di Pesa (FI)

Per la gestione delle fermentazioni alcoliche, solitamente le aziende vitivinicole utilizzano **lieviti starter commerciali**, spesso a scapito della tipicità dei vini prodotti. L'impiego di **lieviti autoctoni**, quando adeguatamente selezionati per caratteristiche enologiche desiderate, può rappresentare una valida alternativa in grado di conferire ai vini caratteristiche sensoriali peculiari. Su tale argomento saranno presentati i risultati di un progetto finanziato dalla **Regione Toscana** dal titolo: **"Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni"** (VICASstart)

### Mattino:

9:00 Iscrizione

09:30 Saluti e presentazione del programma della giornata

09:40 I lieviti autoctoni: selezione e impiego in enologia. Relatore:  
Prof.ssa Lisa Granchi (GESAAF)

10:00 I risultati del progetto VICASstart: «Produzione in cantina di  
lieviti starter autoctoni». finalità del progetto e fasi sperimentali.  
Relatore: Prof. Lisa Granchi (GESAAF)

10:10 Isolamento e caratterizzazione dei lieviti autoctoni della  
cantina VICAS. Relatore: Dr.ssa Eleonora Mari (GESAAF)

10:25 Selezione dei ceppi autoctoni mediante meso-vinificazioni.  
Relatore: Dr. Yuri Romboli (GESAAF)

10:45 Coffee break

11:15 Messa a punto dell'impianto per la produzione di lieviti  
autoctoni in cantina. Relatori: Prof. Alessandro Parenti e Dr.  
Damiano Barbato (GESAAF)

11:45 Produzione di vini nella cantina VICAS mediante i lieviti  
autoctoni selezionati. Relatore: Dr. Giacomo Buscioni  
(FoodMicroTeam)

12:00 Domande e discussione

12:15 Panel test dei vini sperimentali (a cura di GESAAF, in  
collaborazione con la cantina VICAS)

13:45 Pranzo a Buffet

Per iscrizioni: [vicastart@foodmicroteam.it](mailto:vicastart@foodmicroteam.it)

Per info: [www.foodmicroteam.it](http://www.foodmicroteam.it) sezione NEWS



Regione Toscana



Intervento realizzato con il cofinanziamento FEASR del Piano di Sviluppo Rurale 2014-2020 della Regione Toscana sottomisura 16.2 Progetto "Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni" (VICASstart)

Le foto dell'evento sono visibili sulla pagina Facebook di FoodMicroTeam.  
Le presentazioni sono scaricabili dal sito [www.vicastart.it](http://www.vicastart.it) (risultati secondo anno)

#### *A 7.4- Condivisione con la comunità scientifica (GESAAF)*

Pubblicazione dei risultati acquisiti in una pubblicazione scientifica con impact factor.

Una parte dei risultati del progetto sono stati presentati come presentazione orale e come "abstract esteso" alla AgEng conference che si è tenuta a Wageningen (the Netherlands) dal 8 al 12 luglio 2018.

Si riporta di seguito l'abstract, mentre l'articolo integrale è scaricabile dal sito [www.vicastart.it](http://www.vicastart.it) (risultati finali).

*AgEng conference*

*July 8–12, 2018, Wageningen, the Netherlands*

#### **Development of a Machine for the Production of Liquid Wine Yeast to Induce Grape Juice Fermentations**

**Lorenzo Guerrini<sup>a,\*</sup>, Alessandro Parenti<sup>a</sup>, Giulia Angeloni<sup>a</sup>, Piernicola Masella<sup>a</sup>, Damiano Barbato<sup>a</sup>, Eleonora Mari<sup>a</sup>, Yuri Romboli<sup>a</sup>, Giacomo Buscioni<sup>b</sup>, Silvia Mangani<sup>b</sup>, Simona Guerrini<sup>b</sup>, Lisa Granchi<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> 1Department of Management of Agricultural, Food and Forestry Systems (GESAAF) University of Florence, Italy

<sup>b</sup> FoodMicroTeam - University of Florence Academic Spin-off

\* Corresponding author. Email: [lorenzo.guerrini@unifi.it](mailto:lorenzo.guerrini@unifi.it)

#### **Abstract**

During the winemaking process, the alcoholic fermentation can be carried out either spontaneously or by inoculating commercial dried yeasts. Commercial yeasts ensure effective and quick juice colonization, allowing a better control of the fermentation. Thus, they are usually preferred by winemakers to reduce the fermentation quality-related risks. However, the spontaneous fermentation can produce wines with sensory properties typical of a certain region or even of a specific cellar. This characteristic is particularly appreciated by those winemakers that wish to produce a wine easy to recognize.

To keep the advantages of both approaches, a machine able to produce on-demand a liquid yeast biomass from selected local yeasts was studied and developed. In this way, producers can inoculate a quantity of yeasts able to reduce the fermentation risks, with a local selected strain able to give wines typical properties.

The machine is composed by two parts: a tank and a centrifuge. The tank is where the yeasts increase in number. It is equipped with to supply systems for water and nutrients. The water supply system includes an UV-lamp for water sterilization and a heat exchanger to set the temperature of the medium water. The feeding system continuously doses the nutrients to keep a low sugar content into the medium, promoting yeasts respiration instead of fermentation. This increases the yeast-growing rate. Furthermore, the fermenter is equipped with a heating/cooling jacket to maintain the set temperature, and with an air supplier to mix the medium and provide the adequate oxygen. At the end of this cycle, the medium is separated by the yeast biomass with a vertical centrifuge.

The machine was tested during the 2017 vintage. The produced yeast was used to inoculate must fermentations at industrial scale. The inoculated yeast strains carried out the alcoholic fermentation, as confirmed by the microbial molecular analysis.

**Keywords:** autochthonous yeasts; centrifuge; fermenter; spontaneous fermentations; wine quality; wine typifying.

Un articolo comprensivo di tutto il progetto è attualmente in preparazione e sarà probabilmente pronto per essere sottomesso ad una rivista internazionale a inizio del 2019.

## Risultati del progetto

### Indicare i risultati complessivi attesi (quantificabili e controllabili) con particolare riferimento ai produttori primari (max 2 pagine)

I risultati attesi sono misurabili in quanto ad ogni risultato è associato un report (R, che può essere un progetto, una relazione) o la realizzazione di un impianto (I) o la realizzazione di azioni divulgative (D).

Si possono quindi così elencare i risultati attesi del progetto:

I1: Messa a punto dell'impianto per la produzione di biomassa, inizialmente su scala ridotta per poi arrivare all'impianto definitivo.

L'obiettivo è stato raggiunto come dimostrano i risultati dettagliati riportati in A5.3. L'impianto era già funzionante in occasione della vendemmia 2017 quando sono state prodotte biomasse di lievito per inoculare in totale 420 hL di mosto, ma necessitava di una serie di interventi tecnici per l'ottimizzazione del processo di produzione della biomassa. Pertanto, al termine della vendemmia 2017 l'impianto è stato sottoposto ad una serie di modifiche come riportato nella sezione A 5.3 (II anno). In conclusione, l'impianto ottenuto è utilizzabile da personale opportunamente addestrato della cantina e garantisce la produzione di uno starter qualitativamente soddisfacente e analiticamente rispondente ai requisiti di sicurezza microbiologica e chimica stabiliti dall'OIV. Inoltre, i lieviti ottenuti mediante l'impianto hanno consentito di produrre vini con le caratteristiche enologiche richieste dalla cantina VICAS. Pertanto, vista la qualità della produzione dei ceppi di *S. cerevisiae* starter autoctoni ottenuti in occasione sia della campagna 2017 che di quella 2018, l'impianto è da ritenersi soddisfacente per le vinificazioni su scala industriale della Cantina Vicas che rappresenta un'importante realtà produttiva del territorio Toscano.

R1: Mappatura dei processi produttivi aziendali e individuazione dei punti critici nelle fermentazioni per la qualità del vino (primo anno) e valutazione di quanto questi possano impattare nell'aumentare il valore della filiera (secondo anno).

I punti critici dell'azienda (evidenziati nel corso del I anno) risiedono principalmente nella qualità microbiologica dell'uva che arriva in cantina in diverse condizioni sanitarie.

Pertanto, l'aspetto essenziale per garantire una maggiore e controllata qualità dei prodotti finiti è quello di impiegare lieviti *starter* capaci di contrastare la presenza e lo sviluppo di microrganismi contaminanti (lieviti, batteri e muffe) che potrebbero compromettere le caratteristiche sensoriali del vino. La selezione di lieviti *S. cerevisiae* da impiegare come *starter* autoctoni realizzata in questo progetto è stata condotta tenendo presente anche l'aspetto della bioprotezione e non solo quello della qualità sensoriale del prodotto finito (primo e secondo anno di attività).

R2: L'identificazione dei lieviti atti a massimizzare la qualità del prodotto.

I 3 vini sperimentali di cui 2 ottenuti con lieviti autoctoni e 1 con un ceppo commerciale sono stati oggetto di studio e i risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- I due ceppi autoctoni selezionati, *S. cerevisiae* VI-213 e *S. cerevisiae* VI-202, hanno condotto la fermentazione alcolica con cinetica analoga a quella del ceppo di lievito commerciale;
- I vini ottenuti con i due ceppi autoctoni hanno mostrato una composizione chimico-fisica non significativamente diversa dai vini ottenuti con il ceppo di lievito commerciale;

- L'analisi degli aromi nei vini imbottigliati ha evidenziato una composizione chimica simile tra il ceppo *S. cerevisiae* VI-123 ed il ceppo commerciale 4x4.

**Tuttavia, a fronte di una analoga composizione chimico-fisica e un analogo profilo aromatico dei vini imbottigliati, l'analisi sensoriale ha evidenziato una preferenza da parte del panel per i vini ottenuti con il ceppo autoctono *S. cerevisiae* VI-123.**

**In conclusione, il ceppo autoctono *S. cerevisiae* VI-123 può essere impiegato dalla cantina VICAS come starter**

R3: Valutazione dei migliori ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, in relazione anche alla produzione di quantità di biomassa con il prototipo, date dalla valutazione dei componenti chimici, nutrizionali e organolettici dei mosti e dei vini (prima valutazione nel primo anno, seconda valutazione nel secondo anno).

I ceppi autoctoni sono stati scelti sia sulla base delle cinetiche fermentative dei vini sintetici ottenuti con le microvinificazioni (A4.1) sia delle caratteristiche tecnologiche e sensoriali dei vini ottenuti con le mesovinificazioni (A4.2). Questi stessi ceppi si sono anche dimostrati non solo efficienti nella crescita in fermentatore su mezzi contenenti sostanze di facile reperimento da parte della cantina, ma anche capaci di sopravvivere molto bene sia alla fase di centrifugazione che di conservazione sotto forma di pasta a +4°C (A5.3). Questi sono aspetti importanti per quanto riguarda l'abbattimento dei costi sia in termini di materie prime impiegate, sia di dimensionamento dell'impianto. La possibilità di conservare il lievito per alcuni mesi a 4°C consente una produzione distribuita nel tempo secondo le esigenze della cantina in termini di masse da inoculare.

R4: Valutazione della possibilità di non utilizzare ceppi commerciali in cantina, per la produzione con evidente risparmio in termini economici, ambientali e accrescimento della tipicità e del margine del prodotto.

Vista la produttività dell'impianto e la possibilità di conservare la pasta di lievito a 4°C senza perdere cellule vitali, è teoricamente possibile utilizzare i ceppi autoctoni per inoculare tutti i vini prodotti dalla cantina. Chiaramente questo eviterebbe alla Cantina di acquistare i preparati commerciali. Anche senza arrivare a questi estremi, che forse rischierebbero di stravolgere troppo la produzione attuale, limitare l'uso degli starter autoctoni ai vini di punta potrebbe garantire pubblicità per l'azienda nonché un accrescimento della tipicità e della qualità dei prodotti con la conseguenza di poter incrementare il prezzo al consumatore e quindi il margine del prodotto.

R5: Protocollo di trattamenti fermentativi e postfermentativi per i vini, derivante dalla valutazione integrata del report 2 e del report 3 (azione finale del progetto).

In A 5.3 è scritto in dettaglio il protocollo di utilizzo e di pulizia del fermentatore. E' descritta anche la composizione del mezzo di coltura da impiegare. I lieviti di proprietà di VICAS necessari per avviare il processo di produzione sono attualmente conservati in una soluzione di glicerolo a -80°C pronti per essere inoculati nel fermentatore dopo una fase di replicazione in sterilità secondo quanto previsto dal protocollo. Sempre nel protocollo sono indicati dei punti critici e le azioni da seguire per garantire una produzione dei lieviti senza problemi.

D1: Divulgazione degli aspetti relativi ai trattamenti fermentativi e postfermentativi negli aspetti di interesse generale (non legati alla specifica realtà aziendale ma alla denominazione Chianti Rufina).

Per divulgare gli aspetti generali relativi ai possibili vantaggi provenienti dall'impiego di lieviti autoctoni è stato organizzato un convegno dal titolo "Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni". Ai link successivi è possibile scaricare gli interventi dei vari relatori:

1) [https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018\\_18.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018_18.html)

2) <http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/>

### **Indicare i risultati specifici attesi dall'introduzione dell'innovazione proposta**

*Ricadute economiche attese dal progetto (indicare le ricadute economiche e gli indicatori per la loro valutazione) (max 2 pagine)*

Il Chianti Rufina DOCG è la sottozona del Chianti più diffusa insieme al Chianti Colli Senesi. Questo è dovuto alla reputazione e alla qualità di quello che con efficace slogan commerciale è definito "il più alto dei Chianti" grazie soprattutto alla particolare struttura del vino ed al suo colore particolarmente intenso. Queste caratteristiche sono legate a fattori pedoclimatici che interagiscono nell'espressione dei caratteri peculiari dei vitigni utilizzati. Tale tipicità potrebbe essere valorizzata dall'impiego, in sostituzione dei preparati commerciali (starter), di lieviti autoctoni, cioè tipici della cantina.

Da una breve indagine che non ha valore statistico possiamo appurare che alla grande distribuzione fiorentina il Chianti senza denominazioni ha un prezzo al litro, al dettaglio, variabile all'incirca tra i 5,5 e gli 8 €, il Chianti Rufina Riserva ha un prezzo di 16 €/litro.

Tra i tanti fattori che dovrebbero essere messi in conto per una analisi economica e statistica si sottolinea:

- il valore aggiunto della tipicità percepita del consumatore è notevole in termini di prezzo;
- i livelli qualitativi devono mantenersi elevati per giustificare la differenza di prezzo.

Non si parla di un prodotto di nicchia ma di una realtà produttiva importante con 2.263.546 fascette da 750 ml consegnate nel 2013.

Supponendo che il ritorno di immagine e qualitativo possa portare un valore aggiunto di 1,5 € a bottiglia, si parla di potenziali ricadute sul territorio di oltre 3.000.000 € annuali e con una buona probabilità anche sulla cantina sociale coinvolta nel progetto. A questo incremento di valore della produzione va aggiunto il risparmio diretto sull'acquisto dei lieviti secchi attivi commerciali che impegna risorse, per una cantina delle dimensioni di quella di VICAS, di circa 20.000 annuali.

La valutazione delle ricadute economiche si potrà ottenere nel medio periodo se la cantina VICAS sfrutterà commercialmente i risultati del progetto.

In particolare l'uso dei lieviti selezionati permetterà:

1. Ridurre i costi di produzione grazie ad un minore acquisto di lieviti selezionati che in un ipotesi estrema potrebbe essere azzerato.
2. Caratterizzare i vini prodotti soprattutto per quelli di qualità maggiore con una maggiore remunerazione a bottiglia; i risultati del panel test mettono in evidenza come i vini prodotti

con i lieviti autoctoni sono identificabili e più apprezzati rispetto a quelli prodotti con lieviti starter.

3. Apportare un valore aggiunto al prodotto vini prodotti con lieviti autoctoni

Chiaramente tutti i predetti risultati vanno perseguiti con una campagna promozionale per informare ed educare i consumatori dell'innovazione introdotta nella metodo di produzione della cantina.

Successivamente alla conclusione del progetto la cantina dovrà presentare i vini prodotti con lieviti autoctoni nelle fiere di settore e potrà inserire nella retro etichetta delle bottiglie le informazioni relative al progetto in modo da valorizzare al massimo i risultati ottenuti.

*Ricadute ambientali attese dal progetto (indicare le ricadute ambientali e gli indicatori per la loro valutazione) (max 2 pagine)*

La possibilità di usare ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae* sotto forma di lieviti secchi attivi per indurre la fermentazione alcolica, ha comportato una larga diffusione di questa pratica in quanto semplice da usare e ritenuta efficace per il controllo della durata del processo fermentativo e della qualità organolettica del vino. Negli ultimi anni, però, è stato evidenziato come l'uso di queste colture starter, solitamente selezionate in pochi paesi stranieri, riduca la biodiversità naturale dei lieviti e concorra ad uniformare l'aroma e il gusto del vino compromettendo la possibilità di diversificare il prodotto finito sul mercato.

Considerando che nel settore enologico italiano, attualmente, sia i produttori che i consumatori manifestano una crescente attenzione verso i vini di qualità che siano espressione di un determinato territorio e, quindi, riconoscibili sul mercato, appare fondamentale promuovere delle strategie per la valorizzazione delle produzioni locali. Un vino con un maggior valore aggiunto vuol dire poter investire di più in una corretta gestione ecosostenibile della vigna.

L'idea stessa di spaccio aziendale che consenta di approvvigionarsi in loco di prodotti di grande quantità è un incentivo al consumo a km 0, riducendo l'impatto ambientale del trasporto dei prodotti.

I lieviti secchi attivi commerciali provenienti dall'estero hanno evidentemente una "impronta di carbonio" non nulla sia per lo stabilimento produttivo per il trasporto delle biomasse alla cantina.

Questo impatto viene ridotto, autoriproducendo in loco il lievito necessario (che oltretutto è sfuso e prodotto nelle quantità strettamente necessarie, senza sprechi e confezioni di plastica).

L'uso di lieviti starter piuttosto che fermentazioni spontanee si è diffuso sia per uniformare il livello qualitativo del prodotto ma anche per far fronte ai cambiamenti climatici in quanto negli ultimi anni per vari motivi si trovano uve con titolo alcolometrico volumico importante e non sempre le fermentazioni arrivano con facilità a consumare tutti gli zuccheri. Una attenta selezione di lieviti autoctoni, già adattati alle caratteristiche di uno specifico ecosistema di produzione, può rappresentare uno strumento idoneo per ottimizzare la gestione del processo fermentativo per ridurre la probabilità di arresti di fermentazione. Una gestione estremamente personalizzata e controllata delle proprie fermentazioni può aiutare la cantina a ridurre la propria "impronta di carbonio": il controllo delle temperature ha un impatto per esempio nel controllo della temperatura che comporta consumi di acqua (per raffreddamento dei vasi vinari), energia elettrica e termica.

Anche le ricadute ambientali si potranno valutare nel medio periodo se la cantina VICAS perseguirà i risultati del progetto.

Infatti appare evidente come l'uso dei lieviti autoctoni possa ridurre l'impronta di carbonio dell'azienda in seguito a:

- Riduzione dei trasporti.
- Riduzione nella produzione di imballaggi.
- Riduzione degli input energetici per la produzione dei lieviti starter che molto spesso sono liofilizzati (processo che richiede molta energia).
- Riduzione degli input energetici grazie alla gestione delle fermentazioni.

## 9. Divulgazione dei risultati acquisiti e diffusione dell'innovazione

*Specificare con sufficiente dettaglio i metodi, i mezzi e le iniziative previsti per un'adeguata attività di divulgazione dei risultati e di diffusione dell'innovazione (max 2 pagine)*

La presente proposta, attuando un'innovazione di processo, renderà la cantina indipendente nel reperimento dello starter necessario per condurre la fermentazione alcolica dei vini. Allo stesso tempo la selezione e l'impiego di lieviti autoctoni Toscani potrà contribuire alla tipicità del vino esaltando le caratteristiche del Sangiovese in modo da salvaguardare la tipicità territoriale e la biodiversità naturale in una ottica di ecosostenibilità.

I vini ottenuti con questi lieviti saranno valutati da un punto di vista chimico e sensoriale e per ogni lievito selezionato sarà redatta una scheda tecnica secondo la normativa in vigore. Le schede tecniche saranno disponibili al termine del progetto per essere divulgate tramite siti internet, ecc.

Non sarebbe utile usare questi lieviti senza che, contemporaneamente, ci sia una parallela crescita culturale e critica degli operatori che li utilizzano. Per questo è previsto, per tutta la durata di un progetto, un collegamento permanente tra staff scientifico e soci della cantina sociale. Saranno infatti organizzati workshop *in itinere* al progetto che consentiranno di divulgare i risultati ottenuti sia a coloro che lavorano nella cantina sociale, sia a tutti i produttori primari che ad essa afferiscono. Durante tali incontri saranno sintetizzati i risultati del progetto in modo da favorire anche la crescita culturale di coloro che operano nei settori della produzione primaria.

L'*workshop* finale prevedrà anche la degustazione a confronto dei vini ottenuti con lo starter autoctono rispetto a quelli normalmente commercializzati dalla cantina.

L'utilizzo del web, compresi i social network, è diventato un importante mezzo di contatto e aggiornamento continuo. Si prevede quindi di pubblicare i risultati del progetto su un sito ad hoc che sia linkato sulle home page dei siti web della cantina sociale (<http://www.vicas.it/htdocs/index.htm>), del GESAAF (<http://www.gesaaf.unifi.it/>) nonché sul sito web di FoodMicroTeam (<http://www.foodmicroteam.it/>).

Si prevede di organizzare un evento divulgativo nel territorio del Chianti, con particolare coinvolgimento del Chianti Rufina. Questo evento potrebbe servire per estendere il trasferimento tecnologico condotto presso VICAS anche ad altre cantine della zona ed indirettamente contribuire alla costruzione di una bio-banca di lieviti del Chianti. Ogni cantina potrebbe avere i propri ceppi autoctoni (debitamente conservati e geneticamente marcati) e potrebbe produrseli autonomamente, senza ricorrere a quelli commerciali. Questo potrebbe avere una ricaduta interessante non solo sull'economia della cantina (risparmio e valorizzazione della tipicità del vino), ma anche sull'aspetto di promozione del vino Chianti visto che l'approccio proposto risulta una novità assoluta per il settore vino. Infine, i risultati potranno

essere condivisi nell'ambito della comunità scientifica attraverso almeno una pubblicazione dei risultati acquisiti in una pubblicazione scientifica.

Come previsto, gli obiettivi del progetto e le fasi della sua realizzazione sono stati messi a disposizione di tutti pubblicandoli su vari siti le cui pagine sono state condivise sui diversi social (facebook, twitter, linkedn). Più in dettaglio...

Gli obiettivi del progetto sono stati pubblicati sulle pagine web:

<http://vicastart.it/premessa-e-obiettivi-del-progetto/>

<https://www.foodmicroteam.it/it/chisiamo-page.php#team>

I risultati relativi al primo anno di attività stati pubblicati sulle pagina web:

<http://vicastart.it/risultati-del-primo-anno/>

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/progetto-sottomisura-16-2-psr-2014-2020-della-regione-toscana-filiera-corta-produttori-fra-arno-e-sieve-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni\\_3.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/progetto-sottomisura-16-2-psr-2014-2020-della-regione-toscana-filiera-corta-produttori-fra-arno-e-sieve-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni_3.html)

[https://www.foodmicroteam.it/media/all\\_news/pif%20per%20sito.pdf](https://www.foodmicroteam.it/media/all_news/pif%20per%20sito.pdf)

I risultati relativi al secondo anno di attività stati pubblicati sulla pagina web:

<http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/>

Sono stati organizzati tre eventi per diffondere sul territorio i risultati ottenuti. Un seminario tecnico (16 marzo 2018) in cui sono stati descritti i risultati ottenuti il primo anno di attività, un convegno sui lieviti autoctoni (5 luglio 2018) ed infine una dimostrazione pratica del funzionamento dell'impianto (Relazione finale: 6 settembre 2018).

I risultati presentati il 16 Marzo 2018 sono scaricabili alle pagine web:

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/seminario-tecnico-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-vicastart-1\\_12.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/seminario-tecnico-produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-vicastart-1_12.html)

<http://vicastart.it/risultati-del-primo-anno/>

I risultati presentati il 5 luglio 2018 sono scaricabili alla pagina web:

[https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018\\_18.html](https://www.foodmicroteam.it/it/news/produzione-in-cantina-di-lieviti-starter-autoctoni-a-voi-gli-interventi-del-convegno-tenutosi-il-5-luglio-2018_18.html)

<http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/>

Visto l'interesse suscitato dai suddetti eventi, sono stati anche pubblicati alcuni articoli su Agronotizie riguardanti sul progetto VICASTART:

[https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2017/10/16/foodmicroteam-la-ricerca-a-portata-delle-aziende/55959?utm\\_source=social&utm\\_medium=facebook&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-55959](https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2017/10/16/foodmicroteam-la-ricerca-a-portata-delle-aziende/55959?utm_source=social&utm_medium=facebook&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-55959)

[https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm\\_source=notifiche&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook](https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm_source=notifiche&utm_medium=email&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook)

[https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm\\_source=notifiche&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook](https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm_source=notifiche&utm_medium=email&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook)

[https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm\\_source=notifiche&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook](https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm_source=notifiche&utm_medium=email&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook)

[https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm\\_source=notifiche&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=notifica-azienda-102314&utm\\_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook](https://agronotizie.imaginenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2018/07/19/vicastart-riprodurre-i-lieviti-autoctoni-in-cantina/59492?utm_source=notifiche&utm_medium=email&utm_campaign=notifica-azienda-102314&utm_content=kANArticolo-59492#.W1BazGRCYUA.facebook)