

Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni (VICASTART)

PROGETTO SOTTOMISURA 16.2
PSR 2014-2020 della Regione Toscana
TITOLO: Filiera corta produttori fra Arno e Sieve

Premessa e obiettivi del progetto.

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 proposto l'impiego di ceppi di lievito selezionati nella specifica area di produzione indicati come "lieviti autoctoni o indigeni". 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 autoctoni ha richiesto un arco di tempo che andava da due a cinque anni, a seconda dei casi.

Da un punto di vista pratico, una volta ottenuti i ceppi autoctoni e selezionati quelli con le capacità enologiche desiderate, è necessario ottenere con questi ceppi un preparato contenente una quantità di cellule di lievito tale da inoculare il mosto a concentrazioni che garantiscano il successo della fermentazione alcolica (solitamente intorno a 10⁶ UFC/mL di mosto). Ad oggi l'unico modo per fare questo è appoggiarsi ad aziende che producono starter mentre un'alternativa potrebbe essere quella di mettere a punto un impianto per la produzione in cantina del preparato starter.

Il presente progetto dunque ha avuto lo scopo di selezionare ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* indigeni (autocotoni) per le caratteristiche enologiche desiderate e di progettare e realizzare un impianto semi-automatico (costituito da un fermentatore ed un sistema di separazione) per la produzione nella cantina VICAS di lieviti starter autoctoni per la conduzione della fermentazione alcolica.

I partner del progetto

Cantina Sociale VI.C.A.S.

Il territorio che ha come sede la cantina si allunga idealmente, quasi per intero, sul percorso della statale Tosco-romagnola. 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 sono di acciaio inox e permettono di ottenere, nel rispetto dei principi tradizionali di vinificazione, vini con caratteristiche evolute, adatti al mercato di oggi.

<http://www.cantinavicas.it/>

Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF) dell'Università degli Studi di Firenze

Il GESAAF istituito con delibera congiunta Senato Accademico - Consiglio di Amministrazione del 17/05/2012, comprende attualmente 4 sezioni. Al presente progetto partecipano le 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 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.

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.

<https://www.gesaaf.unifi.it/>

FoodMicroTeam Srl (Spin off Accademico dell'Università degli Studi di Firenze)

FMT è uno Spin Off accademico dell'Università degli Studi di Firenze (proponente prof. Massimo Vincenzini) nato nel 2014 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 i 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.

www.foodmicroteam.it

Disegno sperimentale

In figura 1 è riportato lo schema sperimentale del progetto Vicastart che ha avuto durata biennale. I risultati ottenuti per ciascuna fase sono riportati nei paragrafi successivi.

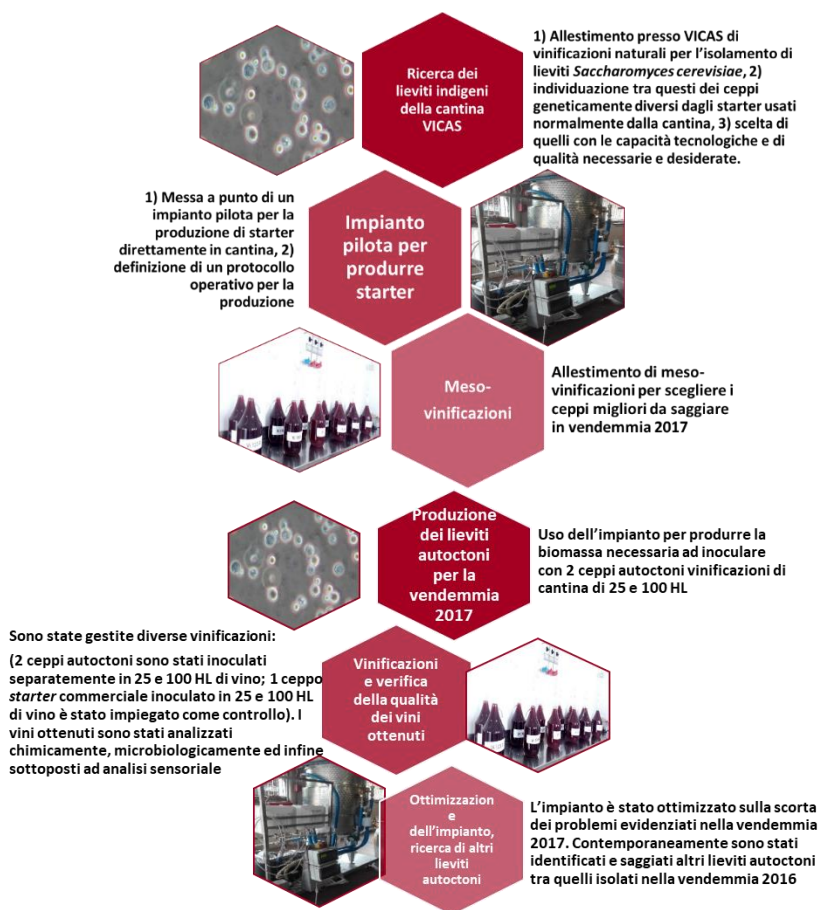


Figura 1: Disegno sperimentale del progetto Vicastart.

Risultati

Ricerca dei lieviti indigeni della cantina VICAS

Fermentazioni alcoliche spontanee, (cioè condotte senza l'impiego di preparati *starter* commerciali) sono state allestite presso la cantina VICAS il 12 (Figura 2 A) e il 27 Settembre 2016 (Figura 2 B), prima dell'avvio della attività di cantina vera e propria in occasione della vendemmia 2016. In corrispondenza delle diverse fasi delle fermentazioni (indicate nelle figure dalle frecce) sono stati prelevati i campioni di mosto/vino per la ricerca dei lieviti autoctoni.

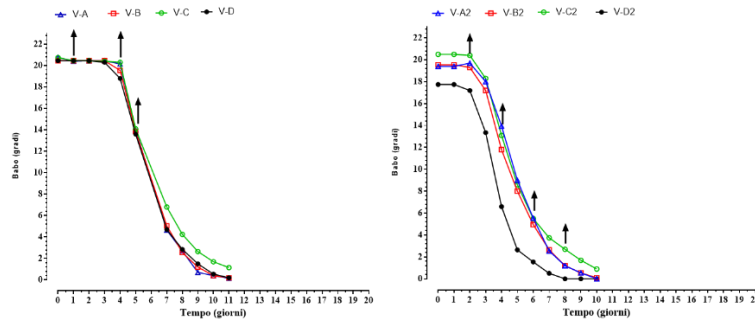


Figura 2 A e B: In figura sono riportati gli andamenti in gradi BABO delle varie fermentazioni spontanee da cui sono stati isolati i lieviti tra cui individuare quelli autoctoni della cantina VICAS

I campioni di mosto/vino prelevati sono stati sottoposti ad analisi microbiologica (semina in piastra) e sono stati ottenuti 400 isolati di lievito. Questi sono stati poi purificati mediante strisci successivi per essere sottoposti ad analisi molecolari che hanno consentito di identificarne la specie e di caratterizzarli a livello di ceppo (Figura 3). **Questa attività ha consentito di individuare 18 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* autoctoni della cantina VICAS geneticamente diversi da tutti gli starter commerciali impiegati negli anni dalla cantina stessa e da quelli presenti nella collezione del GESAAF.**

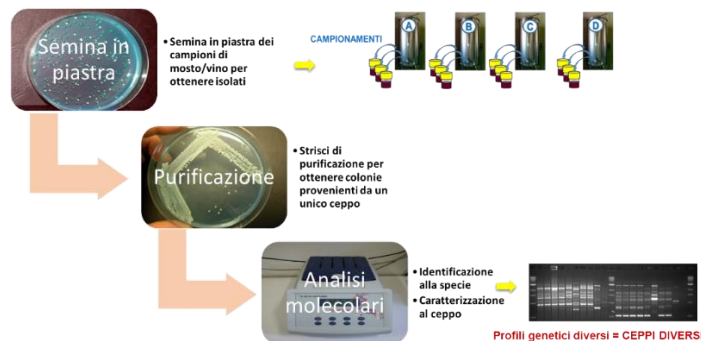


Figura 3: Isolamento, purificazione, identificazione alla specie e caratterizzazione a livello di ceppo dei lieviti provenienti dalla fermentazioni spontanee condotte presso la cantina VICAS in occasione della vendemmia 2016.

Per scegliere tra i 18 ceppi autoctoni individuati quelli con le caratteristiche enologiche desiderate, sono state allestite micro-vinificazioni (in beute allestite con valvola di Müller) su mosto sintetico e su mosto vero. Le fermentazioni di ciascuna beuta sono state seguite mediante analisi chimiche, microbiologiche e biomolecolari. Tutte le prove sono state condotte in doppio. Infine, i risultati analitici ottenuti sono stati elaborati statisticamente (analisi delle componenti principali) ed hanno consentito di individuare **6 ceppi autoctoni con le caratteristiche enologiche desiderate**. Una schematizzazione dell'approccio sperimentale è riportato in figura 4.

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



Figura 4: Schematizzazione dei saggi utilizzati per scegliere 6 ceppi autoctoni della cantina VICAS che possedessero le caratteristiche enologiche desiderate.

Impianto pilota per produrre starter

Parallelamente all'attività di selezione dei ceppi autoctoni è stato messo a punto l'impianto pilota per la produzione dello starter direttamente in cantina. L'impianto al termine della sperimentazione è risultato costituito da (Fig. 5): un fermentatore (munito di un gorgogliatore di aria, un dosatore di substrati e varie sonde di controllo del processo), un sistema di raffreddamento e uno di riscaldamento, un sistema UV per la sanitizzazione dell'acqua in entrata, una centrifuga per raccogliere la biomassa.

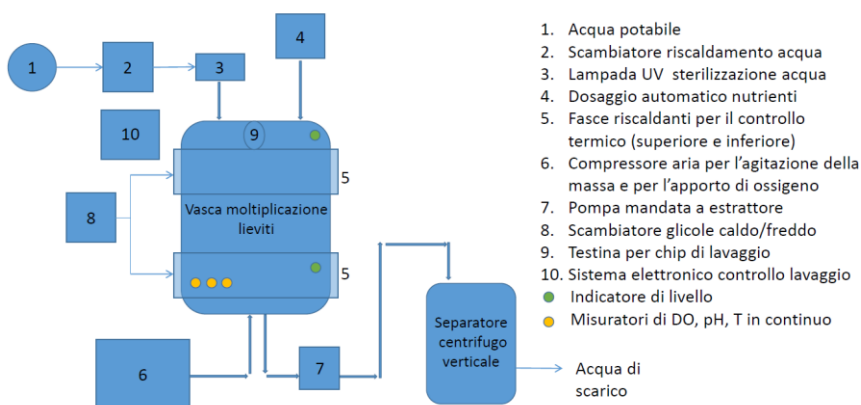


Figura 5: Schematizzazione dell'impianto pilota per la produzione di starter attualmente presente presso la cantina VICAS.

Oltre al funzionamento meccanico dell'impianto sono stati definiti: il mezzo e le condizioni di crescita del lievito nel fermentatore, i tempi ottimali di attività, i protocolli di preparazione della coltura di avvio, i sistemi di pulizia dell'impianto per garantirne la sterilità. I dettagli del protocollo sono visibili al sito: <http://vicastart.it/risultati-del-prim-anno/> mentre in figura 6 è schematizzata la sequenza delle problematiche affrontate che hanno consentito non solo di definire un preciso protocollo ma anche di ottimizzare il sistema di produzione dei lieviti.



Figura 6: Problematiche affrontate al fine di ottimizzare il sistema di produzione dei lieviti.

Mesovinificazioni

I 6 ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni selezionati sono stati utilizzati per allestire altrettante meso-vinificazioni (vinificazioni condotte inoculando ciascun ceppo in 10L di mosto posto contenitori in acciaio appositamente allestiti con una valvola per la fuoriuscita di anidride carbonica) per scegliere i 2 ceppi con le migliori proprietà enologiche da inoculare in occasione della vendemmia 2017. I vini ottenuti sono stati analizzati chimicamente e microbiologicamente per verificare il corretto svolgimento della fermentazione. Sono state poi condotte analisi molecolari per confermare che i ceppi inoculati fossero effettivamente quelli che avevano portato avanti il processo fermentativo. Infine, sono state condotte analisi sensoriali da un panel addestrato per valutare la qualità percepita dei vini ottenuti. **Tutto questo ha consentito di scegliere i ceppi VI 123 e VI 202 per condurre la fermentazione alcolica della vendemmia 2017.**

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

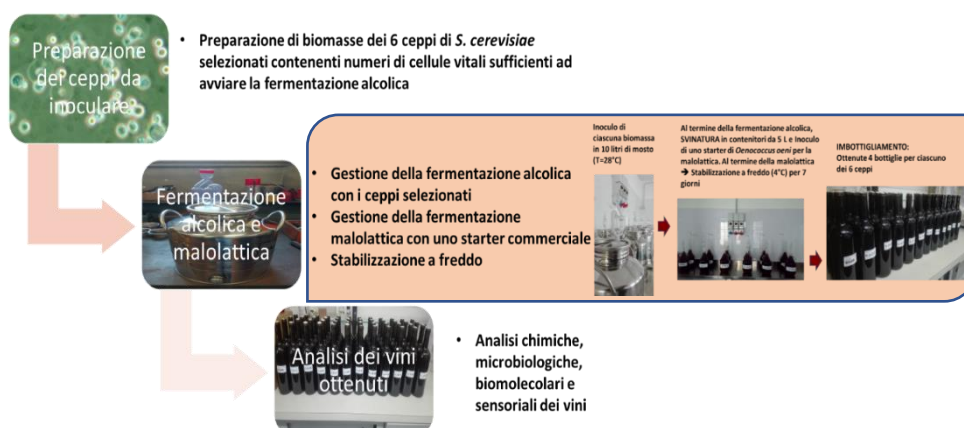


Figura 7: Allestimento e gestione delle mesovinificazioni che hanno consentito di scegliere i 2 ceppi autoctoni con le caratteristiche enologiche desiderate e per questo impiegabili come starter in occasione della vendemmia 2017.

Produzione dei lieviti autoctoni per la vendemmia 2017

L'impianto messo a punto durante il primo anno di attività ha consentito di ottenere lievito in pasta le cui caratteristiche sono riportate nella tabella sottostante. Le biomasse ottenute sono state utilizzate per inoculare mosti ottenuti in occasione della vendemmia 2017. L'uso a livello industriale ha messo in evidenza alcune problematiche che sono state risolte nel corso del secondo anno di attività.

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

Tabella 1: Caratteristiche delle paste prodotte che sono state impiegate durante la vendemmia 2017.

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



Vinificazioni e verifica della qualità dei vini ottenuti

La pasta di lievito prodotta è stata utilizzata per inoculare masse omogenee di uva secondo lo schema sperimentale riportato nella figura 8. 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. Il lievito autoctono VI-202 invece è stato inoculato in una vasca contenente 300hL di mosto. La scarsità di uve dell'annata 2017 e le esigenze della cantina VICAS non hanno consentito di condurre in modo diverso la prova. Al termine della

fermentazione alcolica, i vini sono stati svinati e inoculati con un ceppo di *Oenococcus oeni* commerciale per far avvenire la fermentazione malolattica (Figure 8). Una volta terminato l'acido malico, 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 per gestire in modo ottimale le fermentazioni. Verifiche sulla dominanza del ceppo di lievito inoculato sono state eseguite mediante analisi molecolari. Infine, **i vini finiti invece sono stati sottoposti ad analisi sensoriale con un panel test addestrato.**

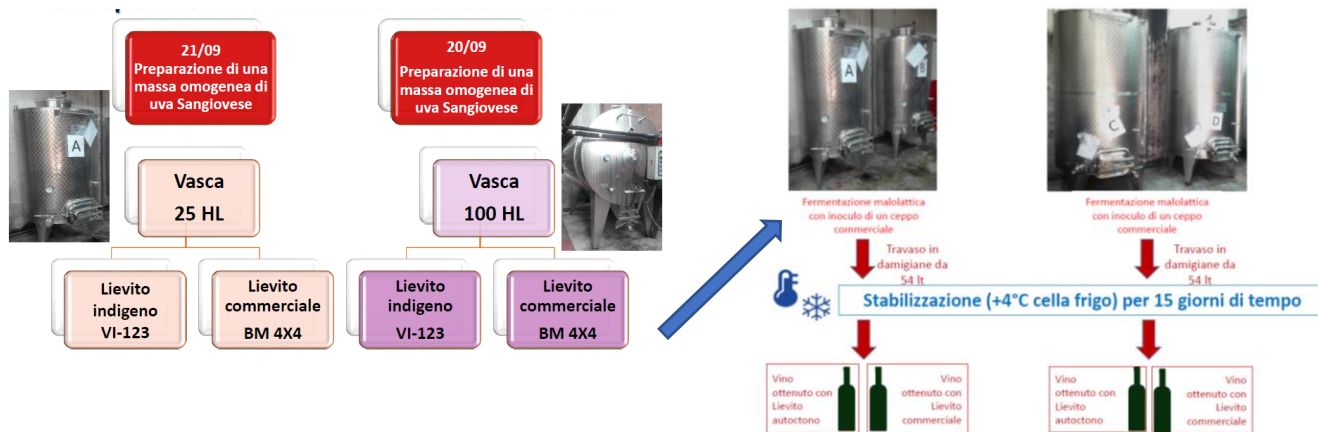


Figura 8: Schema della vinificazione condotta in occasione della vendemmia 2017 mettendo a confronto il ceppo autoctono scelto VI 123 e il ceppo commerciale BM4X4 normalmente impiegato dalla cantina VICAS.

I risultati delle varie analisi condotte possono essere così riassunti:

- 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;**
- **L'analisi sensoriale dei vini imbottigliati ha evidenziato una preferenza dei vini fermentati con il ceppo autoctono *S. cerevisiae* VI-123**

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

Ottimizzazione dell'impianto e ricerca di altri lieviti autoctoni

L'ottimizzazione dell'impianto, realizzata nel corso del secondo anno di attività grazie alle informazioni ottenute in occasione della vendemmia 2017, ha preso in esame i seguenti aspetti:

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

Al termine della suddetta attività, 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 dalla normativa vigente. Pertanto, il risultato ottenuto dalla produzione dei due ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* è stato soddisfacente per la cantina che potrà utilizzare lo *starter autoctono* nelle proprie vinificazioni su scala industriale. E' possibile visionare in un video il funzionamento dell'impianto al seguente link: <http://vicastart.it/risultati-finali/>

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

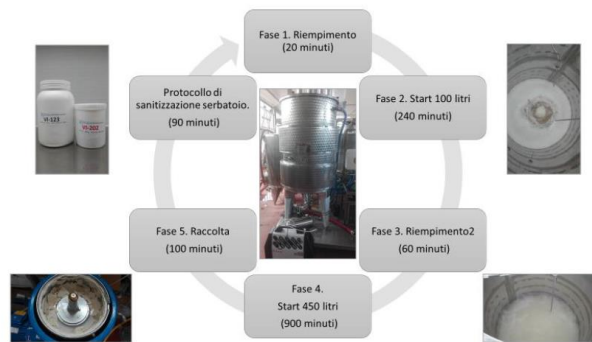


Figura 9: Schema per l'ottenimento della biomassa in pasta da utilizzare come inoculo in vinificazione.

Infine, In occasione del convegno che si è tenuto il 5 Luglio 2018 presso l'AZIENDA AGRICOLA DI MONTEPALDI, San Casciano Val di Pesa (FI) sono stati analizzati mediante Napping Test i vini sperimentali sopra descritti. Hanno partecipato al test oltre 60 persone tra cui enologi, agronomi, ricercatori universitari, aziende vitivinicole, giornalisti e studenti universitari i quali hanno mostrato un elevato gradimento per i vini sperimentali. Per un dettaglio dei risultati ottenuti è possibile consultare il sito <http://vicastart.it/risultati-del-secondo-anno/> e la presentazione del 6 settembre eseguita a conclusione del progetto <file:///C:/Users/Simona%20Guerrini/Downloads/Allegato-2-Presentazione-Dr-Yuri-Romboli-del-6-Settembre.pdf> nella quale sono riportati i risultati del Napping test condotto il 5 luglio. Tali risultati mostrano una sostanziale preferenza per i vini prodotti con il ceppo autoctono VI 123 rispetto a quelli prodotti con lo starter commerciale.

Conclusioni

Al termine del progetto **la Cantina VICAS dispone di lieviti autoctoni selezionati** per le loro caratteristiche enologiche, **di un impianto per l'ottenimento della biomassa** nella quantità desiderata, **di un protocollo di produzione e conservazione della biomassa** adeguato alle esigenze di cantina.