

## TESINA:

# ANALISI DELLA FLORA SPONTANEA DEI LIEVITI PRE E POST FERMENTAZIONE SU UVE PASSITE DI RABOSO PIAVE E BOSCHERA



Allievo/a:  
Alice Bottarel  
Classe 6<sup>VA</sup>  
A.S. 2013/2014

Docente:  
Nicola Zanetti

# INDICE

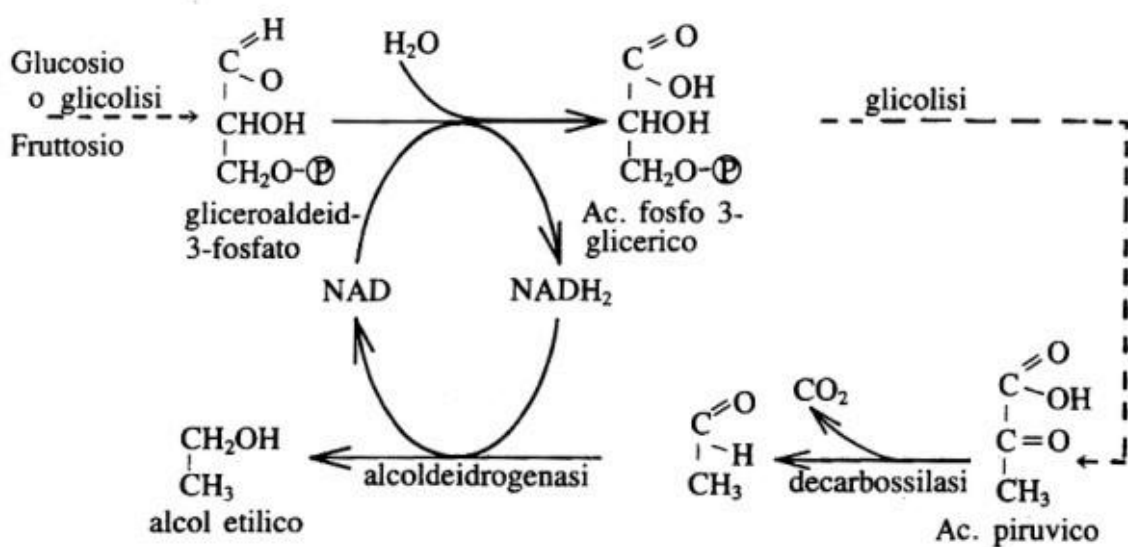
1.0	Obiettivi della tesina.....	p.3
2.0	La fermentazione alcolica.....	p.3
3.0	I lieviti.....	p.4
3.1	Lieviti autoctoni e lieviti selezionati.....	p.6
3.2	Uso ed effetto dei lieviti in enologia.....	p.7
4.0	l'appassimento.....	p.9
4.1	il processo.....	p.9
4.2	processi biochimici.....	p.10
5.0	descrizione dei vitigni in questione.....	p.12
5.1	Raboso Piave.....	p.12
5.2	Boschera.....	p.13
6.0	La sperimentazione.....	p.14
6.1	obiettivi.....	p.14
6.2	i materiali.....	p.14
6.3	procedimento.....	p.14
7.0	conclusione e ringraziamenti.....	p.20

## 1.0 OBIETTIVI DELLA TESINA

- Individuare le principali categorie di lieviti spontanei presenti sulle bacche di uve passite di Raboso Piave e Boschera.
- Individuare le principali categorie di lieviti spontanei presenti dopo la fermentazione.
- Determinare le modifiche sul prodotto causate dai lieviti tramite analisi di laboratorio (pH, zuccheri, acidità, alcool)

## 2.0 LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

Non esistono informazioni attendibili su quando e come sia stata scoperta la fermentazione, un processo che per secoli è stato circondato dal mistero, limitandosi semplicemente a osservare l'evento e a beneficiare dei suoi effetti. Si ritiene che la fermentazione sia stata scoperta casualmente in tempi piuttosto remoti, probabilmente osservando il curioso fenomeno della "bollitura" che si sarebbe sviluppato in una zuppa a base di cereali, e successivamente in altri liquidi che mostravano lo stesso comportamento, fra questi il mosto dell'uva. Per secoli considerata come un "dono divino", la fermentazione e i fattori responsabili di questo complesso fenomeno chimico, sono rimasti uno dei tanti misteri irrisolti, ma che sui quali, in modo più o meno empirico, si poteva fare affidamento. Una delle prime supposizioni relative al fenomeno della fermentazione, è stato quello di credere che si trattasse di una "specie" di decomposizione delle sostanze organiche presenti nel mosto. Solo la tecnica e i progressi ottenuti in campo chimico, biologico e tecnologico consentiranno, molto più tardi, di comprendere il fenomeno della fermentazione e i fattori che la regolano.



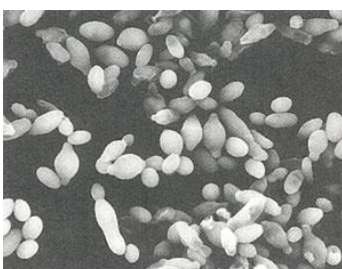
Schema della fermentazione alcolica

Il primo passo verso la comprensione del fenomeno della fermentazione fu per opera del celebre chimico francese Antoine Lavoisier che, nel 1700, riuscì a dimostrare che lo zucchero presente nel mosto dell'uva era trasformato in alcol e anidride carbonica. Nel 1800, il chimico francese Joseph Louis Gay-Lussac formulò il rapporto matematico che regolava la trasformazione degli zuccheri in alcol e anidride carbonica ( $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$ ). Bisognerà attendere gli studi del grande Louis Pasteur per comprendere esattamente cosa fosse la fermentazione e come questa avveniva. Fu infatti Louis Pasteur a dimostrare, nel 1854 e in seguito ai suoi numerosi studi, che la fermentazione era prodotta dall'attività dei lieviti quando questi si sviluppano in assenza di ossigeno. Il contributo di Louis Pasteur per l'enologia e la comprensione del fenomeno della fermentazione è stato fondamentale e il suo lavoro ha consentito lo sviluppo tecnologico dell'enologia così come la conosciamo oggi. Louis Pasteur definì la fermentazione come “un fenomeno connesso con la vita”, poiché comprese per primo che i lieviti erano appunto organismi viventi.

### 3.0 I LIEVITI

I lieviti sono microrganismi costituiti da un'unica cellula, classificati come funghi. Le ricerche condotte su questi organismi hanno consentito l'individuazione e la catalogazione di oltre mille specie diverse, ognuna con le proprie caratteristiche, pur tuttavia accomunati dagli stessi principi biologici.

I lieviti si classificano in due categorie: lieviti aerobici e lieviti anaerobici facoltativi. Queste due categorie contraddistinguono il metodo utilizzato dal lievito per il proprio mantenimento in vita. La prima categoria utilizza la respirazione aerobica - cioè necessitano di aria e ossigeno per il mantenimento della vita - mentre la seconda categoria, in assenza di ossigeno, possono adottare un processo di respirazione anaerobica, comunemente conosciuto come fermentazione. I lieviti anaerobici producono infatti energia dalla conversione dello zucchero in anidride carbonica e alcol etilico, sono pertanto questo tipo di lieviti che trovano impiego essenziale nella produzione di bevande alcoliche, come il vino.



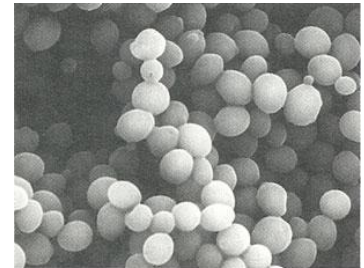
▲ Tipiche cellule di lievito apiculato (*Hanseniaspora guilliermondii*).  
Ingrandimento 2.000 X.

Questo processo è tuttavia “pericoloso” per i lieviti, poiché con l'aumento della produzione di alcol, l'ambiente in cui si trovano assume concentrazioni tali da provocare la morte del lievito stesso. Ogni tipo di lievito presenta una propria sensibilità e resistenza alle concentrazioni di alcol: una caratteristica che consente di scegliere per la produzione di vino tipi di lieviti adatti al volume alcolico che si dovrà ottenere.

Fra i tanti tipi di lieviti anaerobici facoltativi, e quindi adatti alla produzione di alcol etilico, in enologia sono prevalentemente utilizzate due specie: il *Saccharomyces cerevisiae* e il *Saccharomyces bayanus*. Di tutte le specie di lieviti, il *Saccharomyces cerevisiae* è certamente il più studiato a causa dei suoi innumerevoli utilizzi per la produzione di bevande e alimenti.

Questo tipo di lievito è comunemente noto come lievito di birra o lievito del fornaio, poiché è ampiamente utilizzato per la fermentazione della birra e la lievitazione dei prodotti da forno, incluso il pane.

Un altro elemento di classificazione dei lieviti è rappresentato dalla forma, un fattore che è determinabile mediante l'osservazione di questi microrganismi attraverso il microscopio. Questa distinzione viene fatta da Louis Pasteur tra lieviti ellittici e apiculati. Questi termini si riferiscono alla forma della loro cellula: gli apiculati sono a forma di limone, mentre gli ellittici sono a forma di ellisse. Sia il *Saccharomyces cerevisiae* sia il *Saccharomyces bayanus* appartengono alla famiglia degli "ellittici", mentre fra i principali lieviti "apiculati" della fermentazione del vino troviamo il *Kloeckera apiculata* (la cui forma sporificante è *Hanseniaspora delbruekii*), responsabile, fra l'altro, dell'attivazione della fermentazione alcolica che sarà successivamente completata dal *Saccharomyces cerevisiae*. Di questi lieviti, il *Kloeckera apiculata* è quello che possiede la minore resistenza all'effetto dell'alcol: con appena 3-4% di concentrazione di alcol etilico, questi lieviti cessano la loro attività. Alcune specie di *Saccharomyces cerevisiae* possono resistere anche fino a concentrazioni di 16-17% di alcol etilico, mentre le specie di *Saccharomyces Bayanus* possono resistere anche a concentrazioni maggiori.



▲ Tipiche cellule da globose ad ellittiche di *Saccharomyces cerevisiae*. Ingrandimento 2.000 X.

Non tutti i lieviti hanno la stessa resa di produzione di alcol etilico: ci sono lieviti che necessitano, per esempio, maggiori quantità di zucchero per produrre la stessa quantità di alcol. La specie *Kloeckera apiculata* ha bisogno di una concentrazione di 21-22 grammi per litro di zucchero per produrre l'1% di alcol etilico, il *Saccharomyces bayanus* richiede 20 grammi per litro per produrre la stessa quantità, mentre per il *Saccharomyces cerevisiae* sono sufficienti 17-18 grammi per litro. La quantità di alcol prodotta dalla fermentazione del mosto varierà quindi in funzione delle specie di lieviti: per questo motivo risulta importante operare un'opportuna selezione prima di avviare la fermentazione.

Fra i tanti fattori che regolano la fermentazione e l'attività dei lieviti, si ricorda l'anidride solforosa, i cui effetti influiscono notevolmente sulla loro vitalità e funzione. L'uso dell'anidride solforosa è quindi utile anche per operare un'opportuna selezione dei lieviti, rendendo inattivi i lieviti meno efficaci e poco utili - come i *Kloeckera apiculata* - consentendo al *Saccharomyces cerevisiae*, più resistente all'anidride solforosa e più efficace nella fermentazione, di prevalere e di svolgere una migliore fermentazione alcolica.

### 3.1 LIEVITI AUTOCTONI E LIEVITI SELEZIONATI

I lieviti si trovano naturalmente nell'aria e nella superficie delle piante, trasportati dal vento, anche da luoghi lontani, e dagli insetti. In un vigneto si viene così a creare un "ecosistema" nel quale saranno naturalmente presenti diverse specie di lieviti, alcuni utili e positivi ai fini della fermentazione alcolica, altri meno importanti e marginali, addirittura dannosi per la loro attività e per la produzione di sostanze indesiderate. I lieviti si depositano inoltre sulla superficie delle bucce dell'uva e quindi entreranno in contatto con il succo dopo che l'uva è stata pigiata, provocando una "spontanea" fermentazione senza ricorrere all'ausilio di altri sistemi. Questi lieviti sono generalmente definiti come "autoctoni", "indigeni" o "selvaggi", e sulla loro utilità ed efficacia si è lungamente discusso già a partire dagli anni 1930-1940. Poiché i lieviti influiscono enormemente sull'andamento della fermentazione, sugli aromi del vino e sulla stabilità, si può dire che prima della scoperta e le osservazioni di Louis Pasteur, la qualità e la buona riuscita di un vino erano determinate non solo dalle condizioni ambientali locali e dalla qualità dell'uva, ma anche dalla popolazione di lieviti che si trovavano in modo "naturale" in quell'area.



**Grappoli di Nebbiolo.** Questa varietà prende il nome di Nebbiolo a causa della grande quantità di pruina che ricopre gli acini, facendoli apparire come fossero ricoperti da una leggera nebbiolina. La pruina, oltre a rendere la buccia impermeabile, protegge i lieviti indigeni dal dilavamento.

Poiché l'esito di una buona fermentazione è determinato dalle specie di lieviti presenti nel mosto, con lo scopo di migliorare la qualità dei vini, dopo avere compreso i fenomeni che la regolano, si è sentita la necessità di migliorare - per meglio dire, selezionare - la presenza di alcune specie in favore di altre. Si sono quindi avviate ricerche in laboratorio con lo scopo di studiare l'attività di determinati lieviti, portando alla creazione di colture selezionate che ben presto hanno incontrato il favore dei produttori di vino, sia per il migliore controllo sulla fermentazione che queste assicuravano, sia per le migliori qualità di finezza che si potevano ottenere nei vini. L'uso di lieviti selezionati ha causato più avanti un'accesa discussione sulla pratica di fermentare

il mosto, poiché molti sostenevano che in questo modo fosse possibile stabilire a priori le caratteristiche organolettiche del vino, alterando enormemente le qualità tipiche del territorio. Dopo molti anni di discussioni, studi ed esperienze dirette, oggi si ritiene che l'uso dei lieviti selezionati è indispensabile per la produzione di vini di qualità.

Nonostante la fermentazione svolta con i lieviti "autoctoni", cioè quelli naturalmente presenti nel vigneto, possa essere considerata "tradizionale" e perfino "romantica", è bene ricordare che i lieviti sono trasportati da un luogo all'altro dal vento e dagli insetti, pertanto le specie sono in continuo cambiamento, correndo il rischio della presenza di specie poco utili e produttive alla fermentazione che, inoltre, producono quantità eccessive di sostanze indesiderate, come l'acido acetico e altri elementi tali da compromettere la stabilità



del vino. Anche per questi motivi, oggi si ritiene indispensabile operare un'opportuna selezione di lieviti prima di avviare la fermentazione, sia aggiungendo specie dal comportamento noto e affidabile, sia eliminando o inibendo l'attività delle specie ritenute poco vantaggiose. In altre parole, l'impiego di lieviti selezionati, consente di ottenere vini di maggiore qualità, finezza ed eleganza e con una migliore stabilità. Dopo lunghi studi, oggi si utilizzano prevalentemente il *Saccharomyces cerevisiae* per la fermentazione di mosti normali e il *Saccharomyces bayanus* per la fermentazioni di mosti con elevato contenuto di zuccheri o per la produzione di spumanti metodo classico.

### 3.2 USO ED EFFETTI DEI LIEVITI IN ENOLOGIA

L'attività e l'efficacia dei lieviti è condizionata da molti fattori e il prodotto di questo processo non è rappresentato solamente dall'alcol etilico. L'attività dei lieviti influisce inoltre sulle qualità organolettiche del vino - negli aromi e nel gusto - migliorando la finezza e la velocità di chiarificazione. La fermentazione produce anche sostanze che non sono ritenute utili alla stabilità e alla qualità del vino, come per esempio l'acidità volatile, prodotta in quantità variabili in accordo alla specie. I lieviti *Kloeckera apiculata* producono forti quantità di acidità volatile, e anche alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono noti per una produzione di acidità volatile piuttosto notevole. Questo effetto ribadisce ulteriormente l'importanza di utilizzare lieviti selezionati, i quali effetti e azioni sono ben studiati e conosciuti. Inoltre, la varietà di lieviti selezionati aggiunti al mosto dovranno garantire un buon fattore di sopraffazione sulle colture autoctone presenti nel mosto, così da consentire una migliore fermentazione.



Quest'ultima qualità è condizionata anche dall'uso di anidride solforosa che, grazie ai suoi effetti, inibisce l'attività dei lieviti indesiderati favorendo quindi i *Saccharomyces cerevisiae* che sono invece più resistenti.

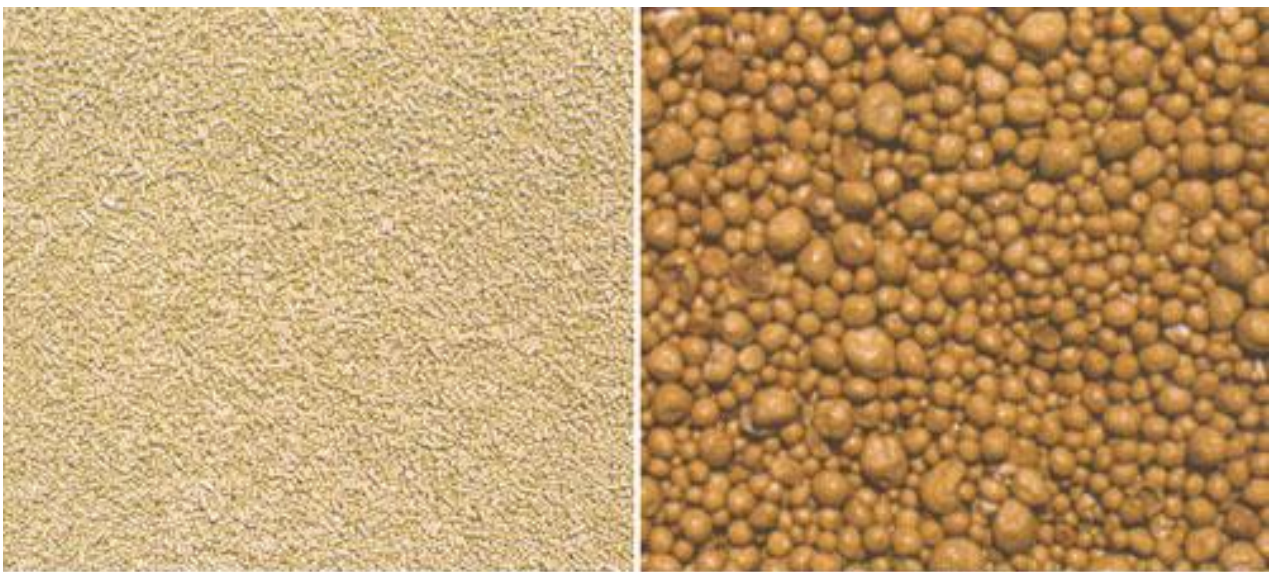
L'eccessiva presenza di *Botrytis cinerea* nelle uve influisce sull'attività dei lieviti - spesso allungando i tempi dell'inizio della fermentazione - a causa della notevole presenza di particolari batteri e

microrganismi, che, inoltre, causano difetti e alterazioni al vino.

Concentrazioni eccessive di zucchero, nonostante sia indispensabile ai lieviti anaerobici per la propria attività biologica, può rendere difficoltosa la fermentazione, talvolta impedendone l'avviamento o prolungando notevolmente i tempi per il suo completamento.

Fra i fattori che alterano l'attività dei lieviti, si ricorda infine la temperatura. I valori minimi e massimi tollerabili dai lieviti dipendono principalmente dalla specie, tuttavia a temperature più basse l'attività sarà notevolmente rallentata o bloccata, mentre a temperature più alte l'attività sarà più rapida. Temperature elevate producono risultati organolettici più grossolani e ordinari, mentre temperature eccessivamente elevate provocano la morte dei lieviti. I vantaggi e la diffusione dei lieviti selezionati, hanno consentito la disponibilità di diverse specie, ognuna di queste con caratteristiche proprie in funzione del tipo di vino da produrre e della sua qualità.

Attualmente si preferisce utilizzare i cosiddetti lieviti secchi attivi - "LSA" in breve - prodotti in laboratori specializzati e venduti disidratati sotto forma di minuscoli "bastoncelli".



### ***Lieviti enologici secchi attivi sotto forma di filamenti o di granuli***

I lieviti secchi attivi sono inoltre preferiti ad altre forme soprattutto per la semplicità e la praticità d'uso. Prima di potere essere aggiunti al mosto, i lieviti secchi attivi necessitano di un'opportuna e delicata operazione di riattivazione. Le dosi tipiche da aggiungere al mosto, sempre e comunque prima dell'avvio della fermentazione, sono generalmente comprese fra 10 e 20 grammi per ettolitro. La dose di lieviti viene sciolta in acqua tiepida alla temperatura di 40° C - ed è essenziale assicurarsi sulla giusta temperatura - per un volume pari a dieci volte il peso dei lieviti. Per facilitare il processo di riattivazione, si possono aggiungere circa 50 grammi di zucchero per litro d'acqua, oppure - in alternativa - prodotti specifici contenenti principi nutritivi per i lieviti, come la tiamina (vitamina B1) e il solfato di ammonio, entrambi reperibili in negozi specializzati in enologia. Si provvede quindi a mescolare bene e attendere circa 30 minuti, provvedendo a rimescolare il composto ogni 10 minuti. I lieviti si aggiungono quindi al mosto, provvedendo a mescolare in modo omogeneo la massa e facendo attenzione che la differenza di temperatura non ecceda, condizione che - a causa di uno shock termico - provocherebbe la morte di gran parte dei lieviti.



## 4.0 APPASSIMENTO

### 4.1 PROCESSO

La surmaturazione è definita come il periodo che segue la maturazione propriamente detta e durante il quale l'uva è soggetta a trasformazioni di natura fisica, chimica, biochimica e biologica che modificano profondamente la sua composizione, influenzando in maniera decisiva le caratteristiche dei vini che ne derivano. Da sempre l'appassimento è utilizzato sia per la conservazione da consumo diretto sia per la produzione di vini liquorosi o passiti. Anche l'enologia italiana vanta numerosi vini di questo tipo, infatti ciascuna regione a vocazione viti-vinicola annovera tra i suoi prodotti di maggior pregio almeno un vino ottenuto da uve surmature. Per quanto riguarda il Veneto, spiccano il Recioto, l'Amarone della Valpolicella, il Refrontolo Passito e il Torchiato di Fregona ottenuti da uve che vengono sottoposte, dopo la raccolta, ad appassimento naturale su graticci posti in locali denominati fruttai, spesso ricavati all'interno di costruzioni rurali. Per una buona riuscita del processo di appassimento, è molto importante che questi locali siano ben arieggiati.

In genere il periodo di appassimento della uve varia tra 80 e 100 giorni e l'aspetto più evidente è la loro disidratazione.

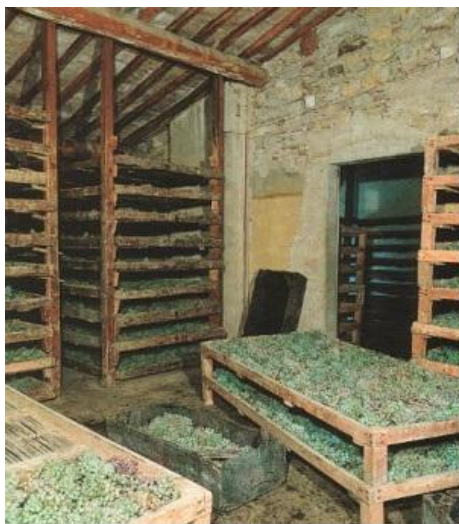


Fig. 1 - Interno di un appassitoio con i caratteristici vassoi dal fondo a cannicci a soppalco.



Fig. 2 - Panzane mobili in ferro epossidato.

Contemporaneamente si verifica un incremento della concentrazione di zuccheri, parametro molto importante per l'ottenimento di un vino ad elevate caratteristiche qualitative.

Molti sono i fattori che concorrono a determinare un buon andamento del processo di surmaturazione.

Innanzitutto è necessario porre molta cura nella selezione dei grappoli al momento della raccolta, i quali devono poi essere disposti in un singolo strato nelle cassette e collocati nei fruttai. Durante l'appassimento vanno fatte verifiche periodiche circa lo stato di salute delle uve, in particolare in concomitanza di condizioni climatiche particolarmente sfavorevoli (precipitazioni ed umidità relative elevate, mancanza di vento, etc.); se si ritiene opportuno, si può procedere con un'ulteriore cernita, scartando i grappoli e gli acini che risultano visibilmente deteriorati.

## 4.2 PROCESSI BIOCHIMICI

La surmaturazione, oltre ad un fenomeno fisico di disidratazione, comporta anche cambiamenti biochimici, nei quali sono coinvolti una serie di composti (zuccheri, acidi organici, polialcoli, fenoli, etc.) che modificano il contenuto dell'acino dall'inizio alla fine di questo periodo.



L'acino, una volta raggiunta la maturazione, sia che permanga in pianta, sia che venga raccolto, continua per un certo periodo la sua attività enzimatica, con conseguenti modificazioni del succo, non influenzate dagli apporti della pianta stessa.

Tra i composti maggiormente soggetti a fenomeni metabolici nel periodo di surmaturazione vi sono gli zuccheri; in particolare, un catabolismo maggiore a carico del glucosio rispetto al fruttosio comporta un passaggio del rapporto glucosio/fruttosio da un valore di 0,9-1,0 durante la maturazione ad un valore di 0,7-0,8 in seguito alla surmaturazione. La causa della variazione di tale rapporto potrebbe risiedere nella conversione enzimatica del glucosio a fruttosio con sorbitolo come intermediario, oppure in una metabolizzazione del glucosio nel ciclo dei pentosi. La modificazione di questo rapporto riveste una notevole importanza nella preparazione dei vini dolci, in quanto il fruttosio possiede un potere edulcorante due volte maggiore rispetto a quello del glucosio.

Nel corso della surmaturazione si assiste anche a forti modificazioni degli acidi organici, tra cui l'acido malico, che subisce un forte calo dovuto, probabilmente, al suo utilizzo come substrato nella respirazione cellulare.

Da un confronto tra l'evoluzione dell'acido malico in fruttajo e in cella a 30°C, è stato osservato come in entrambi i casi si assista ad un decremento di tale acido, che però risulta più intenso nel caso di uva posta in cella, come risultato di attivi fenomeni metabolici accentuati a quelle determinate temperature.

L'acido tartarico, non subisce invece consistenti variazioni nel corso dell'appassimento e l'aumento del suo contenuto, che normalmente si registra, è dovuto solamente ad effetti di concentrazione del succo dell'acino.

Oggetto di forte catabolismo sono anche altri acidi minori, tra cui l'acido citrico, ascorbico e ossalico.

Normalmente, la somma degli acidi malico e tartarico aumenta durante la surmaturazione, nonostante notevoli fenomeni respiratori, per effetto della concentrazione. In particolare in appassimenti effettuati in fruttai, il fenomeno è più evidente, grazie anche al contributo dato dall'acido malico, mentre è meno

marcato l'effetto concentrativo osservato in cella riscaldata, dove i fenomeni respiratori a carico di questo acido influiscono maggiormente.

Anche il contenuto di sostanze polifenoliche dell'uva mostra un'evoluzione nel corso della surmaturazione. Se si esclude l'effetto di concentrazione dovuto alla disidratazione, si assiste ad una loro diminuzione, dovuta probabilmente a fenomeni di ossidazione. Inoltre, l'estraibilità di questi composti tende ad aumentare a causa della degenerazione a cui vanno incontro le cellule dei tessuti della bacca, favorita dalla temperatura e dalla durata del processo.

Contemporaneamente, l'attività polifenolossidasi causata dall'enzima tirosinasi, che si trova localizzato



soprattutto nella buccia, comporta l'imbrunimento delle bacche e la produzione di acetaldeide. L'imbrunimento è anche favorito dalle radiazioni luminose che degradano la clorofilla eliminando la

colorazione verde (tale fenomeno è avvertibile maggiormente nelle uve bianche, rispetto a quelle rosse).

Nel corso dell'appassimento si registra inoltre un aumento del grado di polimerizzazione dei tannini.

Nelle bacche sottoposte a surmaturazione la velocità della perdita d'acqua induce l'attività degli enzimi di parete, fa aumentare la respirazione e la produzione di etilene e causa la perdita di composti volatili e cambiamenti nei livelli dei polifenoli, nel trasporto e nelle risposte allo stress.

Anche la disidratazione e la sua influenza sul turgore porta a sostanziali cambiamenti nella struttura e nella consistenza dei frutti, ossia all'ammorbidimento, a cambiamenti nell'architettura superficiale della cellula ed alla riduzione degli spazi intercellulari.

## 5.0 DESCRIZIONE DEI VITIGNI IN QUESTIONE

### 5.1 RABOSO PIAVE

Il Raboso è un vitigno autoctono del Veneto, coltivato prevalentemente nel Veneto Orientale, particolarmente nella provincia di Treviso. Il nome deriva molto probabilmente dall'omonimo torrente che scorre tra Valdobbiadene e il Quartier del Piave.

È un vitigno molto rustico che si adatta a tutti i tipi di terreno. Ha grappolo grande e allungato, di forma cilindrica, con un'ala, solitamente ben compatto.

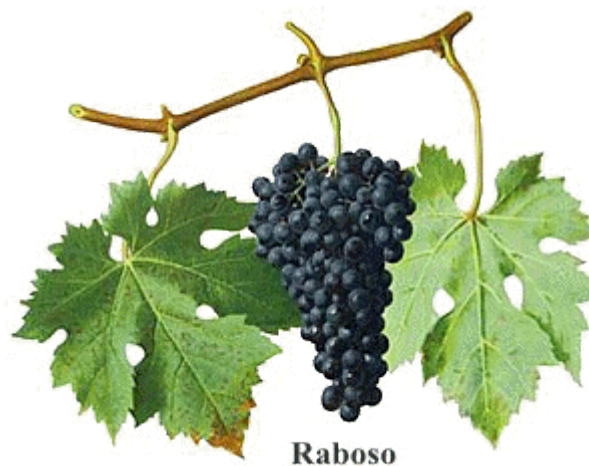
L'acino è medio, di forma ovoidale con buccia di colore blu-nero, pruinosa, coriacea, spessa. Polpa sciolta, acidula.

Vendemmia alquanto tardiva. Si coltivano due varietà: Raboso Piave, più acidulo, e Raboso Veronese, più amabile.

Il Raboso Piave coltivato nella provincia di Padova è conosciuto come Friularo, parola derivante da frio, poiché vitigno storicamente legato alla pratica della vendemmia tardiva, con le uve lasciate in surmaturazione sulla pianta sino alla metà di novembre (tradizionalmente la festa del Friularo ha luogo la terza domenica di novembre), periodo in cui il freddo ha già "mangiato" un poco l'uva. Il nome non ha nulla a che vedere, quindi, con il Friuli. I nomi "Piave" e "Veronese", indicavano anticamente il luogo di coltivazione.

I moderni metodi di vinificazione tendono a rilanciare il Raboso rendendolo di gusto più morbido e bevuta più facile, senza però togliere corpo e robustezza ad un vino conosciuto per queste caratteristiche.

Meno conosciuto e poco diffuso è il vitigno del Raboso Bianco. Recenti studi hanno visto alcuni importanti soggetti della vitivinicoltura del Piave, impegnati non solo nella riscoperta della Rabosa Bianca e della Rabosina, ma anche un forte impegno nella valorizzazione di una varietà bianca fortemente legata a quella terra, e che ha rischiato e rischia, la scomparsa dalle cantine venete.





## 5.2 BOSCHERA

La Boschera è un vitigno italiano autoctono, originario della zona di Vittorio Veneto, in provincia di Treviso. Viene coltivato in vigne alte a ridosso dei boschi, produce poca uva. Gli acini hanno una scorza dura e puntinata, un sapore fruttato e una marcata acidità. Assieme al Glera e al Verdiso viene passito su graticci e vinificato a Pasqua, producendo il Torchiato di Fregona Docg che vanta una storia secolare nel paese di Fregona, ai piedi della Foresta del Cansiglio. La vinificazione ritardata di uve passite è quasi un obbligo data l'elevata acidità di questa uva, che altrimenti darebbe un vino povero e facilmente deperibile.





## LA SPERIMENTAZIONE

### 6.1 OBIETTIVI

- Individuare le principali categorie di lieviti spontanei presenti sulle bacche di uve passite di raboso (surmaturazione in fruttaiolo e doppia maturazione ragionata) e boschera.
- Individuare le principali categorie di lieviti spontanei presenti dopo la fermentazione.
- Determinare le modifiche sul prodotto causate dai lieviti tramite analisi di laboratorio (pH, zuccheri, acidità, alcool)

### 6.2 I MATERIALI

- Cappa a flusso laminare
- Terreno WL
- Terreno YPD
- Vetreria e materiali di laboratorio
- Peptone 0,5%
- Tween
- Stufa
- Microscopio
- Attrezzature necessarie per le analisi chimiche

### 6.3 PROCEDIMENTO

Lo sviluppo di questa tesina è stato effettuato con l'aiuto del professore di microbiologia Nicola Zanetti e della dottoressa Milena Carlot del centro di microbiologia dell'Università degli studi di Padova e delle classi 6<sup>VA</sup> e 5<sup>VA</sup>.

Le uve di Boschera e Raboso Piave per la prova sono state gentilmente fornite da: Cantina della Scuola Enologica di Conegliano per quanto riguarda la prima varietà e Azienda Agricola Cecchetto Giorgio per quanto riguarda la seconda.

L'appassimento delle uve boschera è stato effettuato in graticci all'interno di celle adiacenti la cantina, mentre le uve di Raboso Piave hanno iniziato il loro appassimento nei locali della Cantina Cecchetto e successivamente in dei graticci posti in una stanza arieggiata della scuola. In quest'ultimo caso il signor Domenico, responsabile dell'area di microbiologia, ha prestato il suo aiuto per quanto riguarda l'eliminazione di eventuali acini muffiti.

La prima parte della tesina consisteva nell'individuare quali ceppi di lieviti sono presenti nella superficie delle uve in questione (lieviti indigeni).

per ottenere questo scopo gli acini devono essere immersi in una soluzione peptonata inserendo in un matraccio 0,5 L di acqua, 2,5 g di peptone 0,5% e 5µl di tween 80 0.001% (un agente stabilizzatore e solubilizzante).

Una volta preparata la soluzione, si selezionano gli acini desiderati tagliandoli con una forbice a livello della metà del pedicello, in modo da non provocare lesioni alla bacca. successivamente si inseriscono separati per varietà nelle beute formandone uno strato sottile e uniforme e versare lentamente la soluzione peptonata in modo tale da ricoprire completamente le bacche. Nel nostro caso sono stati necessari 100 g di uva Raboso Piave, 100 g di Boschera e 100 ml di soluzione peptonata.



*Acini ricoperti di soluzione peptonata*

Le beute, sono state poste nell'agitatore del laboratorio dell'Università degli studi di Padova per un'ora, tempo sufficiente per disciogliere le sostanze presenti nella superficie della buccia.



*Terreno WL*

Una volta ottenuto questo risultato, per poter effettivamente isolare i ceppi disciolti nella soluzione peptonata, è stato necessario preparare le piastre con il terreno WL, atte alla proliferazione di microorganismi. La preparazione del terreno è stata effettuata inserendo in una beuta da 400 ml, 40 ml di terreno WL e 0.8 g di agar e il tutto è stato scaldato sopra un becco bunsen fino ad ebollizione. Il liquido ottenuto è stato inserito nelle piastre Petri in modo da formare un velo omogeneo che in poco tempo è solidificato.

Per riuscire a isolare colonie di lieviti provenienti da singoli individui è stato necessario effettuare delle diluizioni successive della soluzione peptonata ottenuta precedentemente e impiestrare in terreno WL tutte le diluizioni nominando ciascuna piastra come schematizzato nella tabella sottostante.

	Boschera (B)		Raboso piave (R)	
	I	II	I	II
a	0.01	0.01	0.01	0.01
b	0.001	0.001	0.001	0.001
c	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
d	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001
e	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001



*Foto di alcune piastre di terreno WL con lo sviluppo dei ceppi e con la presenza di inquinamenti da muffe*

Una volta effettuato l'impiastamento sotto cappa ventilata e sterilizzata per mezzo di alcool e fiamma libera, le piastre sono state inserite per 48/72 ore in stufa a 27°C fino ad un sufficiente sviluppo delle colonie di lieviti.

Nelle piastre c'era molta eterogeneità di colonie, comprendenti anche inquinamenti da muffa, quindi è stato necessario effettuare una selezione delle piastre meno inquinate.

Sempre sotto cappa sono state prelevate delle porzioni di colonie che si diversificavano per quanto riguarda



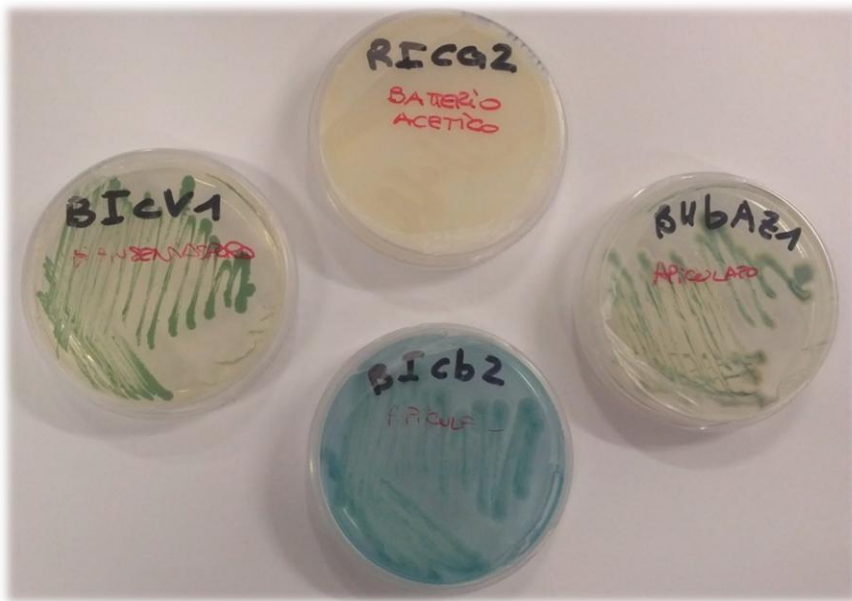
*Becchi di clarino con terreno YPD*

il fenotipo, ovvero che appaiono diverse alla vista. In questo caso differivano per il colore. Sono state prelevate colonie bianche, verdi, grigie e azzurre e inserite singolarmente in becchi di clarino preventivamente preparati con terreno di coltura YPD. I suddetti becchi sono stati inseriti in stufa per un secondo sviluppo delle colonie.

Una volta sviluppate le colonie è stata effettuata l'osservazione a microscopio per determinare la popolazione presente.

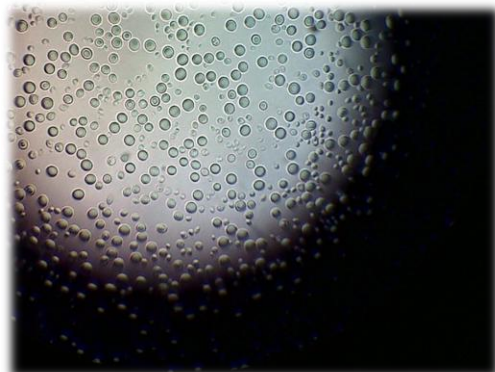
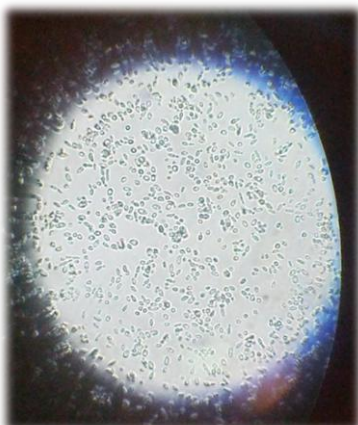
Il risultato dell'osservazione dei diversi colori, confortato dalle osservazioni al microscopio, ha permesso di classificarle le colonie di diverso colore come appartenenti a diverse tipologie di microorganismo, come riportato nella tabella seguente:

bianche	Apiculati (necessaria l'analisi del DNA)
Verdi	Hanseniaspora
Grigie	Batteri acetici
Azzurre	Apiculati (necessaria l'analisi del DNA)
Nel primo sviluppo di colonie, guardando al microscopio, è stata trovata una sola colonia di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	



(sopra) Piastre con i microorganismi isolati per colore

(sotto) Osservazioni a microscopio delle piastre: lieviti apiculati a sinistra ed ellittici a destra



La seconda parte consisteva nella pigiatura delle uve, effettuata con l'aiuto della classe 5<sup>VA</sup> e 6<sup>VA</sup>. Si è scelto di pigiare solo le uve di Raboso Piave poiché non c'erano abbastanza grappoli di Boschera per poter proseguire con la prova.

La resa del mosto è stata del 15% e dalla pigiatura sono stati ottenuti 2 litri, suddivisi in due matracci.

Sono state subito effettuate le analisi di laboratorio per la determinazione del pH, dell'acidità totale e degli zuccheri.

PARAMETRO	VALORE
pH	4.15
Acidità (g/l HTH)	7.7
Zuccheri riduttori (g/l)	262.75

La fermentazione si è avviata spontaneamente in un tempo piuttosto prolungato. I due matracci erano posti all'ombra all'interno di scatoloni in laboratorio

Dopo circa un mese, una volta terminata la fermentazione, sono state nuovamente effettuate le analisi di laboratorio, che hanno fornito i seguenti risultati:

PARAMETRO	BEUTA 1	BEUTA 2
pH	3.34	2.60
Acidità totale (g/l HTH)	7.4	8
Acidità volatile (g/l acido acetico)	1.34	0.74
Acidità fissa (g/l)	5.73	7.08
alcool	11.75°	13.63°

(Durante la fermentazione è sorto un problema, in quanto la cella frigo della cantina, nella quale sono stati posti i matracci dopo la fermentazione, necessitava di un cambio di glicole, per cui il prodotto è rimasto una settimana senza raffreddamento, con conseguente sviluppo di sentori acetici.)

Come terza e ultima parte bisognava verificare quali lieviti avevano svolto effettivamente la maggior parte della fermentazione alcolica, quindi era necessario effettuare ulteriori isolamenti dei lieviti dal vino ottenuto



Di nuovo si è proceduto con la tecnica delle diluizioni successive per isolare colonie da singoli individui.

Beuta 1	Beuta 2
1/10	1/10
1/100	1/100
1/1000	1/1000
1/10000	1/10000

Una volta sviluppate le colonie in stufa sono state prelevate porzioni di colonie isolate per la selezione di ceppi di lievito. Per la beuta 1 è stata utilizzata la colonia corrispondente alla diluizione 1/1000, mentre per la beuta 2 la colonia corrispondente alla diluizione 2/100.



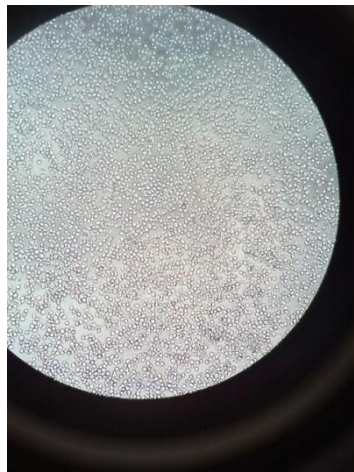
*Diluizione 1/1000*



*diluizione 2/100*

Dall'osservazione diretta delle colonie e al microscopio risulta che in entrambe le beute, i lieviti selezionati appartengono alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. Questo è stato riscontrato dalla forma ellittica delle cellule e dalle loro dimensioni. Una conferma di ciò è attesa dai risultati dell'analisi del DNA mitocondriale che verrà effettuata dalla dr. Carlot nei laboratori dell'Università. Tale analisi non rientra nella dotazione tecnica del laboratorio del nostro istituto.

*Osservazione a microscopio: Saccharomyces cerevisiae*



## 7.0 CONCLUSIONE E RINGRAZIAMENTI

Ho deciso di elaborare una tesina sperimentale perché volevo provare a fare una cosa diversa, e mettermi alla prova nell'ambiente pratico di laboratorio. Rendendo così l'elaborato personale riguardo ad un argomento che nel corso dei miei studi mi ha coinvolto molto, ovvero i lieviti: protagonisti della trasformazione del succo d'uva in quella meravigliosa bevanda che se assunta in quantità modeste stimola la mente e allontana i pensieri.

L'esperienza, della durata 7 mesi mi ha permesso, oltre ad avvicinarmi alla microbiologia, anche di mettere in pratica le mie conoscenze nell'ambito della chimica di laboratorio, due materie tra le più specialistiche di questo corso di studi.

Un ringraziamento profondo va al professor Nicola Zanetti che mi ha seguito durante tutta l'esperienza fornendomi preziosi consigli per la buona riuscita della tesina, al laboratorio di microbiologia dell'Università degli studi di Padova che ha messo a disposizione alcune delle sue attrezzature e in particolar modo la dr. Milena Carlot che si è gentilmente messa a disposizione per eventuali aiuti e consigli.

Vanno inoltre ringraziate la cantina della Scuola Enologica di Conegliano e l'azienda Agricola Cecchetto Giorgio di Tezze di Piave per aver messo a disposizione rispettivamente le uve di Boschera e Raboso Piave.

Infine un ringraziamento alle classi 6<sup>VA</sup> e 5<sup>VA</sup> per avermi assistito in alcuni lavori di impiastamento e spremitura delle uve e ai professori Santantonio e Antoniazzi per avermi sostenuta in questa esperienza.