

ISS "G.B. Cerletti" – Conegliano

Anno scolastico 2017 – 2018



Bioprotezione in enologia – Prova di vinificazione

Corso Enotecnico 2017/2018

Alunna: Marianna Corona

Sommario

BIOPROTEZIONE: COS'È ED EFFETTI SUL VINO.	3
STRATEGIE PER LIMITARE I SOLFITI NEI VINI – QUALI ALTERNATIVE?	5
STUDI DI STRATEGIE DI BIOPROTEZIONE NELLE FASI PRE-FERMENTATIVE:	6
Inoculo frazionato di <i>S. cerevisiae</i> durante la macerazione pre-fermentativa di uve nere.	6
Impiego di <i>Torulaspota delbrueckii</i> nelle operazioni pre-fermentative di mosti bianchi.	7
Impiego di <i>Metschnikowia fructicola</i> nelle operazioni pre-fermentative di mosti rossi: macerazione pre-fermentativa a freddo	8
Biocontrollo delle uve al momento della raccolta	10
AEB – RICERCA CONTINUA PER UNA VINIFICAZIONE MIRATA.	14
PROVA DI VINIFICAZIONE IN BIANCO	16
PROVA DI VINIFICAZIONE IN ROSSO	18
PROVA DI VINIFICAZIONE CON LIEVITI PRIMAFLORE VB[®]	20
RAPPORTO DI VINIFICAZIONE	20
BILANCIO DI VINIFICAZIONE	21
SITOGRAFIA E BIBLIOGRAFIA	23

Bioprotezione: cos'è ed effetti sul vino.

Dalla raccolta ai serbatoi di fermentazione, i microrganismi responsabili delle deviazioni acetiche o degli avvii incontrollati della fermentazione possono moltiplicarsi in modo esponenziale. I rischi aumentano dal momento in cui si estende la durata delle operazioni pre-fermentative, in caso di trasporto delle uve o di mosto per tempi prolungati, in caso di macerazioni pre-fermentative a freddo, di macerazione pellicolare, di permanenza sulle fecce, di conservazione di mosto a freddo o ancora di appassimento in fruttai, soprattutto in caso di temperature troppo elevate (>8°C) o qualora si desideri ridurre l'utilizzo di SO₂. I cambiamenti climatici e l'evoluzione delle pratiche colturali conducono anche verso livelli di maturità che accentuano ulteriormente lo sviluppo di microrganismi indesiderati.

La flora microbica presente sull'uva raccolta e nel mosto in condizioni sanitarie normali non è da sottovalutare. Se si raccoglie, pigia e mette in cisterna un raccolto in condizioni sterili (flora proveniente esclusivamente dall'uva), vi sarà un primo sviluppo di muffe, senza alcun avvio della fermentazione anche dopo alcuni giorni. Ciò non presenta alcun pericolo in condizioni enologiche reali. Tuttavia esiste una problematica molto più concreta che riguarda le uve appassite in fruttai, ad esempio nel caso della produzione di vini come l'Amarone. Infatti, durante la fase di appassimento in cantina che precede la vinificazione di queste uve, si constata uno sviluppo importante di *Botrytis cinerea* che spesso compromette la qualità della vendemmia.

Hanseniaspora uvarum (noto anche con la denominazione *Kloeckera apiculata*) è uno dei rappresentanti più temibili dei lieviti apiculati dell'uva. È caratterizzato da una morfologia a forma di limone e molti dei suoi rappresentanti sono responsabili del fortissimo aumento del livello di acidità volatile (fino a 4 volte di più di *S. cerevisiae*) e della concentrazione di acetato di etile (odore di solvente – fino a 10 volte di più di *S. cerevisiae*). Questo lievito è spesso molto diffuso sull'uva sana giunta a maturità. Fermenta poco, ma si moltiplica estremamente in fretta durante il trasporto delle uve, oppure in caso di macerazione pre-fermentativa a freddo. Le basse temperature (a partire da 15°C) favoriscono la resistenza di questo lievito all'alcool e talvolta si osservano casi di dominanza di questa specie alla fine della fermentazione alcolica.

In alcuni casi in cui le fasi pre-fermentative durano a lungo, il rischio di crescita di *Saccharomyces* indigeno è inevitabile fino a livelli che possono attivare la fermentazione alcolica prima del previsto. Questi rischi sono tanto maggiori quanto più la temperatura è elevata ed il livello di SO₂ è ridotto. Possono verificarsi in particolare in caso di permanenza sulle fecce, macerazione pellicolare, macerazione pre-fermentativa a freddo, conservazione del succo d'uva a freddo, sfecciatura, ecc. I problemi sensoriali o tecnologici associati a questi avvii precoci sono vari: difficoltà di sfecciatura, necessità di filtrazione regolare, spese di refrigerazione, produzione di etanale e/o di SO₂ da parte del lievito *Saccharomyces* indigeno, deviazioni del profilo organolettico e della qualità sensoriale del vino, difficoltà d'inoculo del lievito *S. cerevisiae* selezionato, possibilità di arresto della fermentazione...

Come affrontare tutto questo senza ricorrere all'utilizzo dell'anidride solforosa? Specialmente nei vini biologici si presenta questo problema, ma una soluzione innovativa c'è e si chiama Bioprotezione.

Con il termine **bioprotezione** si indica l'utilizzo di microrganismi, o di loro metaboliti, per il controllo di microbiota patogeni o alteranti negli alimenti. Questo approccio di tipo biologico ha acquisito particolare rilevanza specialmente negli ultimi anni, in seguito alla richiesta da parte del consumatore di prodotti alimentare sempre più freschi e naturali, senza aggiunta di conservanti e non sottoposti a trattamenti tecnologici invasivi. I prodotti artigianali tipici sono una fonte unica di biodiversità microbica. In essi risiedono sia batteri che lieviti, che con le loro attività di tipo metabolico sono alla base dei processi di fermentazione e che portano all'ottenimento di alimenti dalle caratteristiche qualitative uniche. Accanto alla capacità prettamente fermentativa, è stato più volte evidenziato che microbiota autoctoni sono anche in grado di inibire lo sviluppo di altri microrganismi, sia patogeni, che alterativi. I batteri, e in particolare batteri lattici d'importanza alimentare, sono capaci di produrre batteriocine, proteine attive contro microrganismi patogeni, come *Listeria monocytogenes*, ma anche alteranti, come *Clostridium butyricum*. Questi ceppi sono stati ben studiati e caratterizzati e un loro utilizzo come starter microbici può aumentare sia la qualità igienico-sanitaria che la conservabilità. Inoltre anche i lieviti, ed in particolare *Saccharomyces cerevisiae* nel settore enologico, ma anche altre specie nell'ambito orto-frutticolo, producono proteine killer, che inibiscono la crescita di altri lieviti, nella maggior parte dei casi alterativi.



Strategie per limitare i solfiti nei vini – quali alternative?

Il diossido di zolfo (SO₂) è un ausiliario tecnologico essenziale in enologia poiché molti sono i suoi benefici, sia sotto il profilo del controllo microbiologico, sia nella prevenzione dei fenomeni di ossidazione.

Tuttavia, il diossido di zolfo viene ultimamente criticato in ragione dei suoi inconvenienti:

- Tossico per l'organismo umano, rappresenta un pericolo per il consumatore e l'operatore in cantina;
- Possibile precursore di aromi solforati, detti “di riduzione” prodotti durante la fermentazione alcolica (*Henschke e Jiranek, 1991*);
- Possibile ossidazione a solfati, spesso considerati come responsabili della sensazione di “secchezza” in degustazione;
- L'anidride solforosa può provocare, attraverso il lievito, la formazione di acetaldeide, altra molecola potenzialmente indesiderabile (*Cleroux et al., 2015*);
- Il suo odore è percettibile e può mascherare alcuni aromi positivi del vino (*Peynaud e Blouin, 1991*);
- Combinandosi con gli antociani, pigmenti dei vini rossi e rosati, provoca una parziale decolorazione, reversibile.

Per queste ragioni, numerose ricerche hanno come obiettivo quello di ridurre il suo utilizzo in enologia e di trovare delle valide alternative, tra cui alcuni strumenti biotecnologici alternativi, provenienti da un approccio essenzialmente microbiologico, per gestire le fasi pre-fermentative.

Infatti, durante il periodo che va dalla raccolta dell'uva all'avvio della fermentazione alcolica (FA), una flora indigena può svilupparsi nei mosti, producendo metaboliti indesiderati nei confronti della qualità finale del vino e della sua definizione sensoriale: produzione di acido acetico, di ammine biogene, di fenoli volatili, o ancora difficoltà di impianto del lievito enologico inoculato in una seconda fase, per realizzare la FA.

L'anidride solforosa, sotto la sua forma molecolare H₂SO₃, rappresenta quindi uno strumento incontestabile per gestire questi rischi. Si considera che un livello di SO₂ molecolare corrispondente a 0,5 mg/l sia battericida, mentre questo non è sufficiente per avere un effetto fungicida. Usseglio-Tomasset (1995) ha dimostrato che per ritardare la fermentazione alcolica di 50 ore, 0,5 mg/l di SO₂ attiva sono necessari per far fronte a *Saccharomyces cerevisiae*, mentre ne servono 3,5 mg/l per far fronte a *Saccharomyces uvarum*. Il pH gioca un ruolo determinante poiché più questo è elevato più la proporzione di SO₂ molecolare è bassa. Le basse temperature così come l'assenza di etanolo, condizioni riscontrate in fase pre-fermentativa, diminuiscono ugualmente l'attività della SO₂ molecolare.

Per questo motivo, la messa in opera di strategie di lotta microbiologica, per mezzo di microrganismi selezionati, potrebbe rappresentare un'alternativa per ridurre l'uso della solfitazione.

Studi di strategie di bioprotezione nelle fasi pre-fermentative:

Inoculo frazionato di *S. cerevisiae* durante la macerazione pre-fermentativa di uve nere.

Una prima strategia per limitare questi rischi consiste nell'inoculare prima possibile il lievito scelto per realizzare la fermentazione alcolica. Tuttavia, nella situazione – frequente – di macerazione pre-fermentativa ad una temperatura superiore ai 10°C, con questa tecnica è possibile assistere ad avvii di fermentazione troppo precoci, specie se l'inoculo viene fatto a piena dose (20-25 g/hl), a scapito del lavoro di estrazione in fase acquosa, ricercato dal vinificatore in questo tipo di processo. Per questo motivo, un'alternativa raccomandata all'inoculo precoce è che questo avvenga frazionato in due tempi; in una prima fase l'inoculo viene eseguito con basse dosi di lievito, prima della macerazione pre-fermentativa, per evitare avvii indesiderati della FA, in seguito si aggiunge una dose di lievito più importante quando l'estrazione in fase acquosa è considerata conclusa.

In questo studio vengono confrontati questi due protocolli (inoculo precoce ed inoculo frazionato) su del Pinot nero macerato per 4 giorni a 14°C con un inoculo a piena dose differito, cioè effettuato al termine della macerazione. In seguito vengono misurate le popolazioni microbiche presenti. I risultati (figura 1) mostrano che più l'inoculo è precoce, migliore è la repressione della popolazione non-*Saccharomyces* indigena. Il protocollo detto frazionato rappresenta un livello di repressione intermedio, di cui non si può essere completamente soddisfatti. In definitiva, sarebbe quindi preferibile controllare la microflora indigena il prima possibile, apportando un lievito selezionato a forte dose ma senza che questo provochi l'innesco della FA o, in alternativa, assicurarsi di effettuare una macerazione pre-fermentativa ad una temperatura più bassa, così da ostacolare l'avvio della FA.

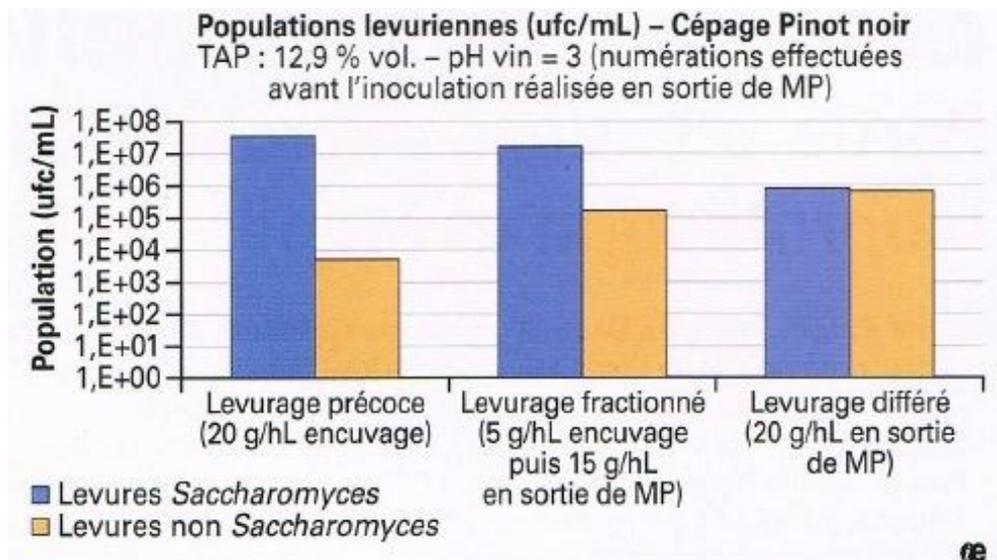


Figura 1: Popolazioni lievitiformi numerate su mezzo gelosato al termine della macerazione pre-fermentativa (MP) di uve nere in funzione del momento di inoculo dei lieviti.

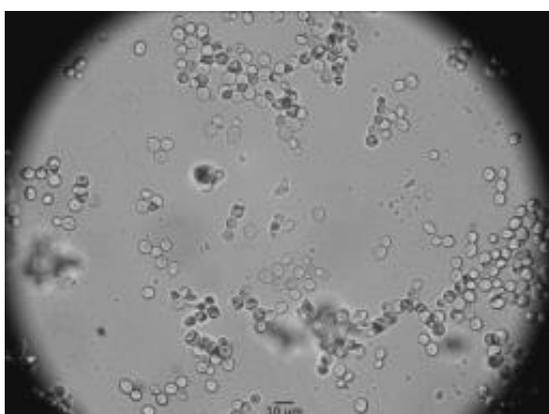
Impiego di *Torulaspota delbrueckii* nelle operazioni pre-fermentative di mosti bianchi.

È stato fatto uno studio riguardante un approccio di bioprotezione dei mosti bianchi per mezzo di un lievito non *Saccharomyces* proveniente dalla specie *Torulaspota delbrueckii* naturalmente presente nel mosto, anche se non maggioritaria. Il lievito considerato per l'esperienza, presenta effettivamente alcune caratteristiche interessanti: debole produzione di acidità volatile ed altri metabolismi indesiderati, criotolleranza. Questo ceppo di *T. delbrueckii* può quindi impiantarsi senza subire grosse perdite in mosti a bassa temperatura (a partire da 5°C) ma necessita di temperature elevate (superiori a 15°C) per avviare la FA. In questo modo si può assicurare un controllo microbiologico precoce (già inoculando all'uscita della pressa) senza innescare la fermentazione alcolica in presenza dei fondi di decantazione.

La sperimentazione è stata così realizzata su mosto di Sauvignon Blanc nella cantina sperimentale dell'IFV Sud-Ouest, a Lisle-sur-Tarn, confrontando le tre seguenti modalità:

- Il testimone viene solfitato con 5 g/hl al riempimento del serbatoio di decantazione;
- Lo stesso mosto, non solfitato, viene addizionato di un preparato antiossidante a base di lieviti inattivi;
- Lo stesso mosto, non solfitato, viene addizionato di un preparato antiossidante a base di lieviti inattivi ed inoculato con Biodiva™ (7 g/hl – $3,5 \cdot 10^6$ cellule/ml)

Le tre modalità sono state lasciate in decantazione a 5°C per 15 giorni, con enzima (Inozyme Clear, 4 g/hl). Sono state quindi numerate le popolazioni di lievito sui fondi di decantazione, dopo spillatura del pulito (figura 2). La solfitazione mostra chiaramente la sua efficacia per limitare lo sviluppo dei lieviti potenzialmente contaminanti, *Saccharomyces* o non-*Saccharomyces*. Inoculo con Biodiva™ ha ugualmente mostrato una forte propensione a controllare lo sviluppo di lieviti del genere *Saccharomyces* equivalente a quella della solfitazione, mentre la flora non-*Saccharomyces* ritrovata corrisponde alla popolazione di *T. delbrueckii* che era stata inoculata. Questo lievito rappresenta quindi uno strumento certo per la bioprotezione pre-fermentativa dei mosti, necessita tuttavia di un controllo della temperatura del mosto (inferiore a 12°C) al fine di evitare l'avvio di FA precoci.



Torulaspota delbrueckii vista al microscopio.

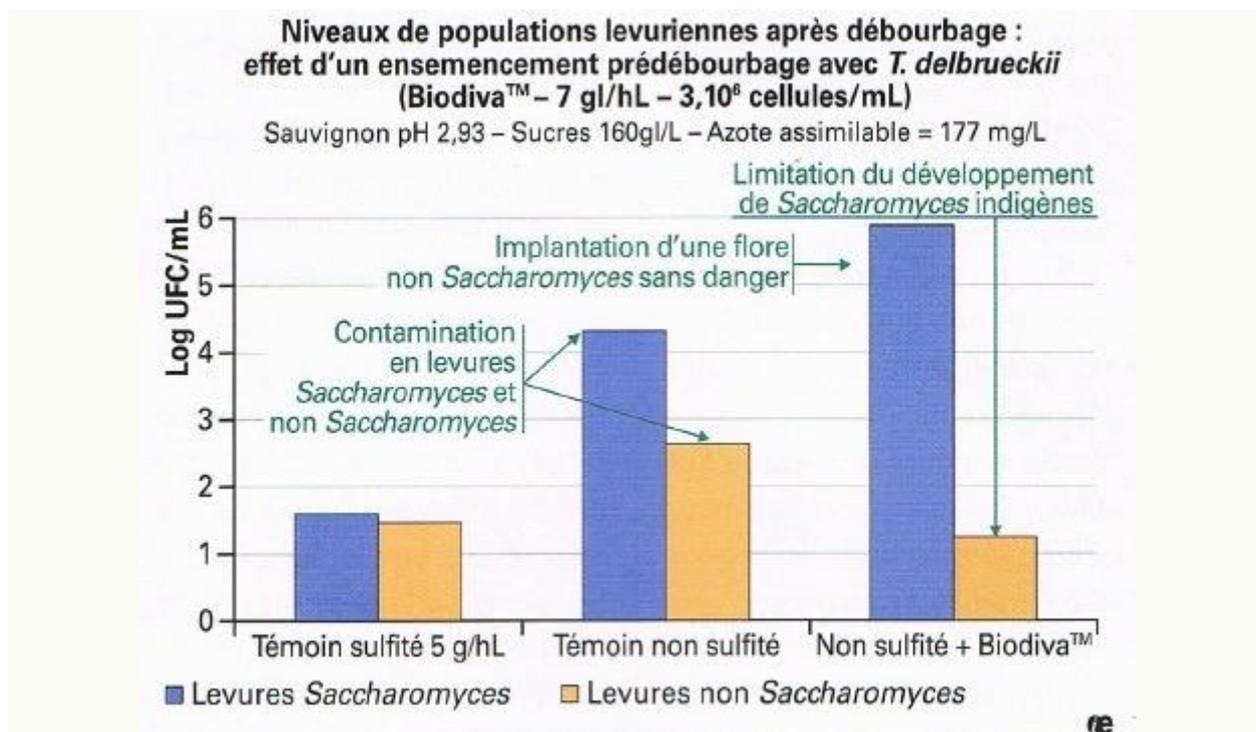


Figura 2: Biocontrollo delle popolazioni lievitriformi su mosto bianco trattato con *Torulaspora delbrueckii*. Conta su mezzo YPD con cloroamfenicolo. Lieviti totali: 25°C per 5 giorni. Lieviti *Saccharomyces*: 35°C per 2 giorni.

Impiego di *Metschnikowia fructicola* nelle operazioni pre-fermentative di mosti rossi: macerazione pre-fermentativa a freddo.

In alcune situazioni di macerazioni pre-fermentative dette “a freddo”, le temperature sono talvolta mal gestite e si avvicinano più ai 12-16°C rispetto agli 8°C previsti. Per questa ragione, IFV Beaune ha selezionato un lievito *Metschnikowia fructicola* senza potere fermentativo, Gaïa™, al fine di offrire un biocontrollo massiccio, con un forte dosaggio (20 g/hl, popolazione dell'ordine di 9.10⁶ cell/ml), limitando però il rischio di avvio precoce di FA.

La specie di lievito *M. fructicola*, isolata recentemente sull'uva (kurzman e Droby, 2001) era già nota per l'inibizione che questa esercita nei fruttai nei confronti delle muffe (liu et al., 2011) e su *Botrytis*. L'utilizzo di Gaïa™ in enologia nel caso di macerazione pre-fermentativa delle uve nere era già stata descritta da Gerbaux et al. (2015) e vale la pena di ricordare alcune sue qualità:

- Eccellente potere di impianto e di moltiplicazione, senza potere fermentativo;
- Repressione dello sviluppo dei lieviti *Kloeckera apiculata*, responsabili frequenti degli aumenti di acidità volatile durante la macerazione pre-fermentativa – *Kloeckera* può produrre circa dieci volte più acetato di etile che *Saccharomyces* (Blondin, 2011);
- Limitazione dell'acidità volatile in situazioni di contaminazione di *Kloeckera* (tabella 1);
- Assenza di metaboliti indesiderati e migliore attitudine sensoriale rispetto ad altri lieviti *Metschnikowia* testati nel programma di selezione.

L'esperimento è stato condotto su piccoli lotti di 3 kg di Syrah presso Vaucluse. Si sono confrontate le seguenti modalità:

- Il testimone viene solfitato con 6 g/hl sulle uve, prima della diraspa-pigiatura;
- Il mosto subisce una doppia solfitazione, oltre quella iniziale, un'aggiunta supplementare di 6 g/hl di SO₂ dopo un giorno di macerazione a 10°C;
- Modalità Gaïa™: nessuna solfitazione, inoculo con Gaïa™ (20 g/hl sulle uve prima della diraspa-pigiatura).

Acide acétique (g/L)	T. 7 j. (fin MP)	T. 14 j. (fin FA)
Témoin non contaminé	0,02	0,35
Contamination en <i>Kloeckera</i>	0,31	0,67
Contamination en <i>Kloeckera</i> + biocontrôle avec Gaïa™	0,10	0,36

Tabella 1: Attività di *Kloeckera apiculata* nel mosto di Pinot nero con e senza biocontrollo con Gaïa™ (secondo Gerbaux et al., 2015). Mosto pastorizzato: zuccheri 230 g/l, pH 3,20, no SO₂ – macerazione pre-fermentativa per 7 giorni a 15°C, poi inoculo con *Saccharomyces cerevisiae* – FA a 20°-24°C.

Dopo la macerazione pre-fermentativa a 10°C per 48 ore sono state eseguite le conte dei lieviti totali e non-*Saccharomyces*, grazie all'ausilio del laboratorio tecnico d'Inter- Rhône, in seguito i lotti sono stati inoculati con il lievito *Saccharomyces cerevisiae* IOC 18-2007 (20 g/hl). La popolazione riscontrata corrisponde essenzialmente a dei lieviti non-*Saccharomyces* (tabella 2).

Modalité	Levures totales (ufc/mL)	Levures non <i>Saccharomyces</i> (ufc/mL)	Type des levures non <i>Saccharomyces</i> observées au microscope
Vendange initiale	4,9 x 10 ³	7,3 x 10 ³	
Témoin simple sulfitage 6 g/hL	2,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	<i>Hanseniaspora</i>
Témoin double sulfitage 6 + 6 g/hL	1,5 x 10 ⁵	9,4 x 10 ⁴	<i>Hanseniaspora</i>
Non sulfité Gaïa™	3,5 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	97 % <i>Metschnikowia</i> – 8,5 x 10 ⁵ autres

Tabella 2: Conta delle popolazioni lievitiformenti effettuata dopo macerazione pre-fermentativa (10°C per 48 ore) – Syrah – Vaucluse – Zuccheri = 203 g/l.

La doppia solfitazione consente una caduta importante di questa popolazione potenzialmente contaminante. Si osserva una popolazione importante di lieviti non-*Saccharomyces* nella modalità Gaïa™, il che è coerente con un eccellente impianto e moltiplicazione del lievito *Metschnikowia fructicola* inoculato, poiché è essenzialmente questo genere di lievito che è stato identificato attraverso l'osservazione morfologica al microscopio. Sui due testimoni solfitati, al contrario, si nota una presenza importante di lieviti identificati con il genere *Hanseniaspora*, noto per produrre potenzialmente acido acetico ed acetaldeide (Lonvaud-Funel et al., 2010). In questo caso, la repressione operata da *Metschnikowia fructicola* sembra essere migliore o almeno equivalente alla solfitazione iniziale con 6 g/hl.

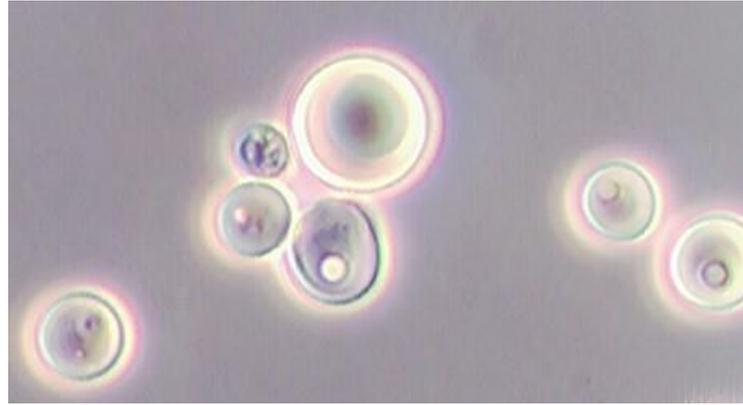
Biocontrollo delle uve al momento della raccolta.

Un secondo studio riguarda invece un utilizzo più precoce realizzando due sperimentazioni in campo, utilizzando Gaïa™ sulle uve e sul mosto fresco nei rimorchi della vendemmia. L'aggiunta del lievito alla dose di 20 g/q di vendemmia, preferibilmente reidratato in acqua a 20°-30°C è stato effettuato durante il riempimento dei rimorchi. Questa pratica è stata confrontata con dei testimoni solfitati e non. Per assicurare l'omogeneità delle uve, tanto analitica quanto microbiologica, la vendemmia è stata effettuata a filari alterni. In tutte le modalità è stato inoculato un lievito *S. cerevisiae* (IOC R 9008), alla dose di 20 g/hl, dopo una macerazione pre-fermentativa di una notte, al fine di innescare la FA.

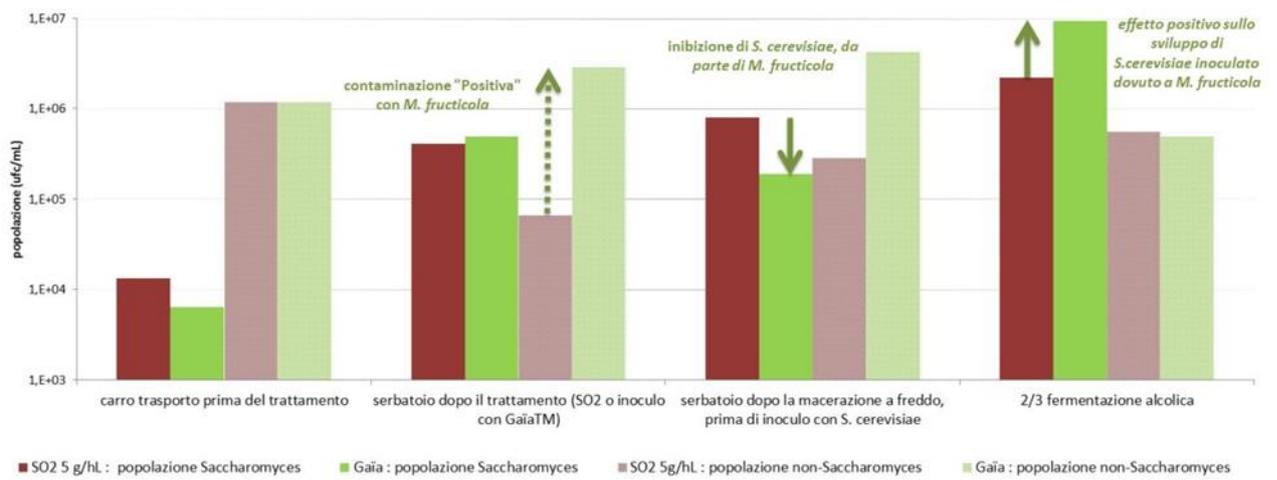
La prima prova, realizzata su Merlot in Gironda, coadiuvata dal gruppo Euralis ha consentito di confrontare il percorso tradizionale con solfitazione ad una modalità senza solfitazione ma con aggiunta di Gaïa™. Su questa seconda modalità, è stata impiegata una leggera solfitazione (2 g/hl) a 2/3 della FA. Il controllo delle popolazioni lievitiformenti (figura 3A) ha consentito di osservare una forte attività di biocontrollo operata da *Metschnikowia fructicola*. Si sottolinea che al riempimento del vinificatore si è osservata una forte popolazione non-*Saccharomyces*, testimonianza del buon impianto di Gaïa™, mentre al termine della macerazione, i lieviti *S. cerevisiae* contaminanti sembrano essere repressi da Gaïa™. Questo determina che ai 2/3 della FA si osserva un migliore sviluppo del lievito *S. cerevisiae* selezionato in questa modalità.

La seconda prova, realizzata sul Cabernet Franc, coadiuvata dalla Chambre d'Agriculture d'Indre-et-Loire ha consentito di confrontare quattro modalità: un testimone solfitato in maniera classica, un testimone non solfitato, una modalità senza solfitazione ma con l'aggiunta di Gaïa™ nei rimorchi di vendemmia ed infine una modalità identica alla precedente, fino a questo stadio, ma differente in seguito attraverso l'aggiunta di batteri enologici all'avvio della FA.

Come già visto in precedenza (figura 3B), si osserva, al riempimento del vinificatore, un buon impianto di lieviti non-*Saccharomyces*, ascrivibile a *Metschnikowia fructicola* mentre il testimone non solfitato mostra una contaminazione potenzialmente negativa, rappresentata da una popolazione non-*Saccharomyces* che si è oltremodo sviluppata rispetto al testimone con solfiti. Ai 2/3 della FA, è interessante constatare nelle due prove con Gaïa™ che questa permette un rapporto nello sviluppo *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces* favorevole al primo, in particolare il ceppo scelto ed inoculato dal vinificatore (figura 4). Questa osservazione tende a dimostrare che esercitando una repressione sulla flora indigena contaminante, *Metschnikowia fructicola* consente indirettamente un migliore sviluppo del lievito selezionato per la fermentazione, mettendo in sicurezza così questo stadio della vinificazione.



Metschnikowia fructicola a microscopio.



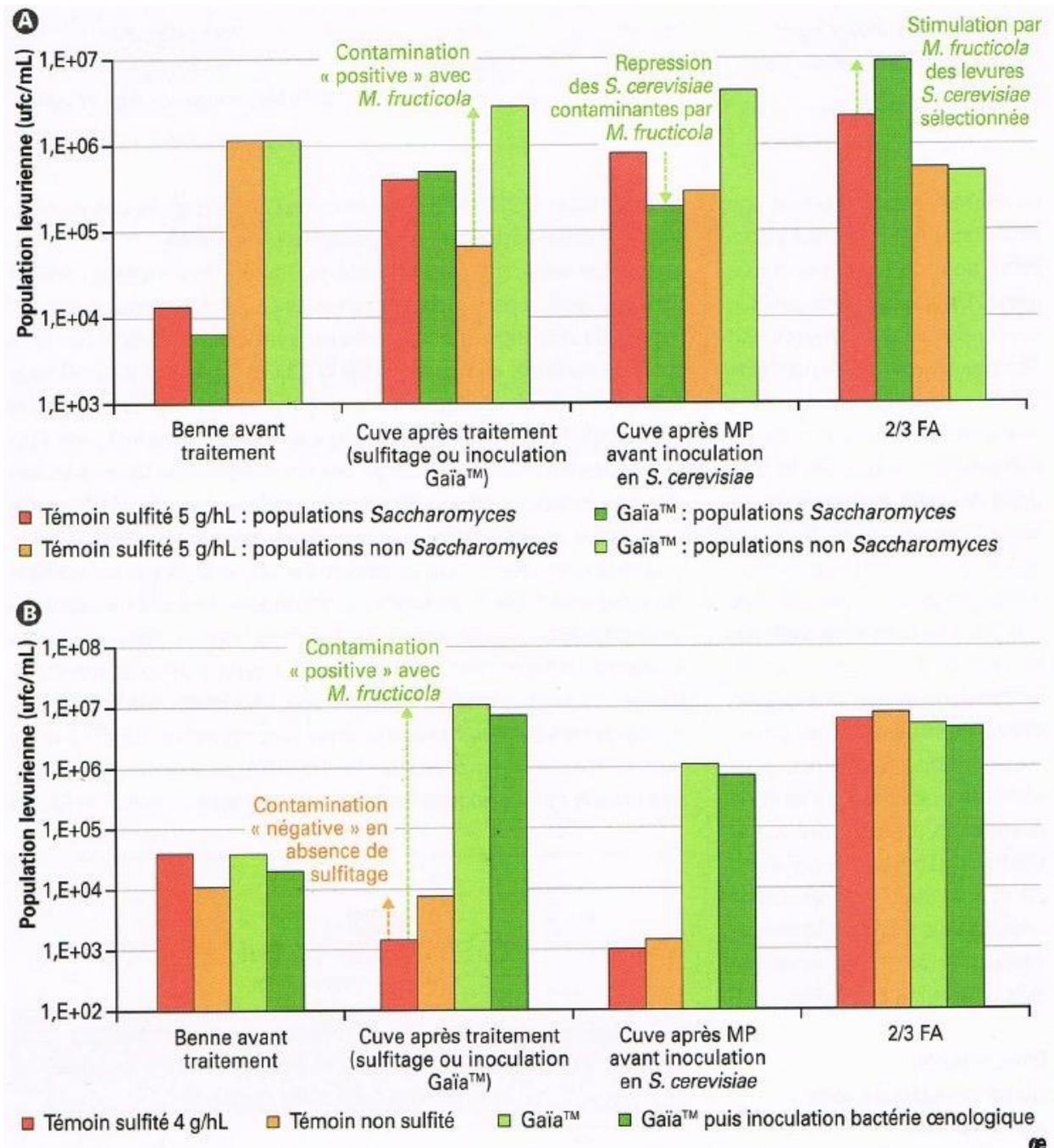


Figura 3: Biocontrollo con *M. fructicola* delle popolazioni lievitriformi in situazione pre-fermentativa. **A:** test effettuato su Merlot – Gironda – TAV 14,3%vol. – pH 3,50 – Conta non-*Saccharomyces* su mezzo gelosato, *Saccharomyces* mediante qPCR realizzato da Microflora. **B:** test effettuato su Cabernet Franc – Indre-et-Loire – TAV 12,1%vol. – pH 3,25 – Conta lieviti totali su mezzo gelosato (25°C per 5 giorni), realizzato dal laboratorio di Touraine.

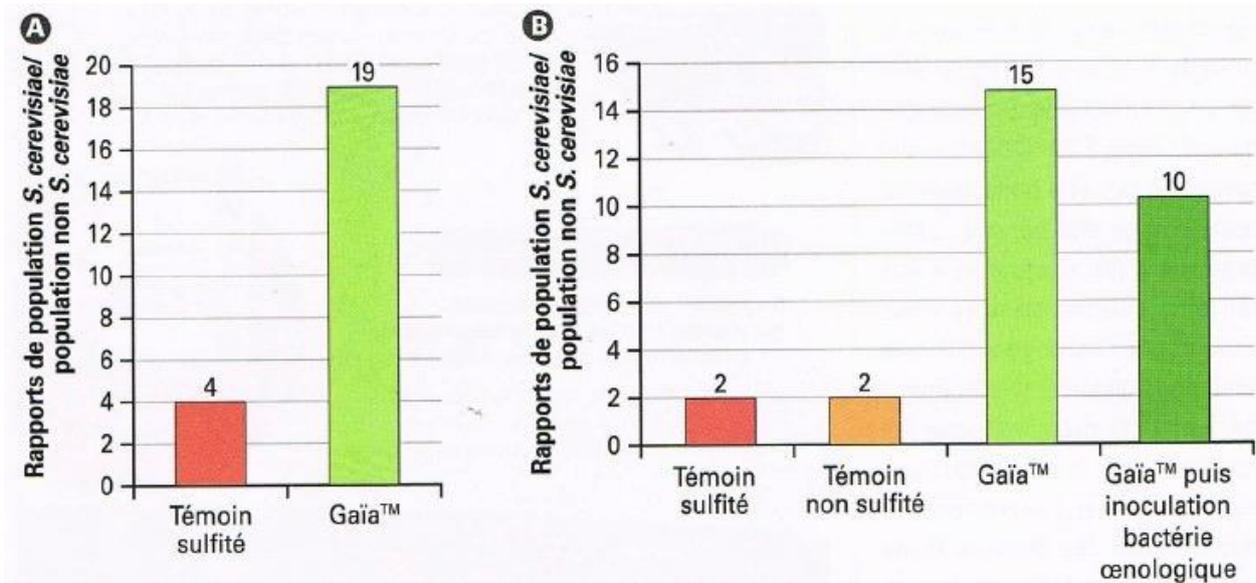


Figura 4: Rapporto delle popolazioni di lievito *Saccharomyces*/non-*Saccharomyces*, conta ai 2/3 della FA, su entrambe le prove. **A:** test effettuato su Merlot – Gironda – TAV 14,3%vol. – pH 3,50 – Conta non-*Saccharomyces* su mezzo gelosato, *Saccharomyces* mediante qPCR, realizzato da Microflora. **B:** test effettuato su Cabernet Franc – Indre-et-Loire – TAV 12,1%vol. – pH 3,25 – Conta lieviti totali su mezzo gelosato (25°C per 5 giorni), realizzato dal laboratorio di Touraine.

Conclusioni:

Rispetto al potere antifungino della solfitazione nello stadio pre-fermentativo, alcuni lieviti non-*Saccharomyces* rappresentano un'interessante alternativa per controllare la flora microbiologica che popola il mosto e le uve, già a partire dalla raccolta. A questo proposito, il lievito Gaia™, una *Metschnikowia fructicola*, impiegato in macerazione pre-fermentativa o in vigna sulle uve, ha dimostrato in diverse occasioni la sua efficacia volta a controllare una parte della microflora potenzialmente contaminante delle uve, così da poter rimpiazzare parzialmente o totalmente l'anidride solforosa.

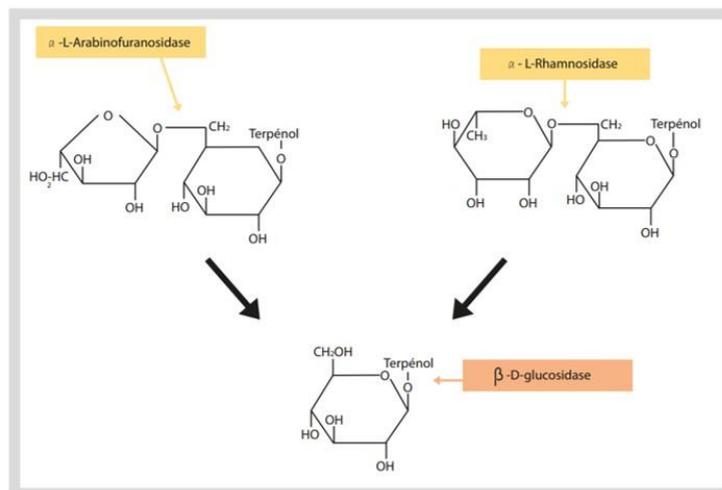
AEB – Ricerca continua per una vinificazione mirata.

Un altro passo in avanti nell'ambito della bioprotezione, è stato possibile grazie all'invenzione di **Primaflora**[®], un lievito biologico *non-Saccharomyces* presente naturalmente nelle uve. Questo prodotto inibisce la flora microbica indesiderata, che causa la produzione di ammine biogene e di odori di acetamide. La sua azione contribuisce quindi al mantenimento della complessità gustativa e aromatica dei vini, preservando la purezza espressiva del territorio.

Oenolia Conseil, società francese del Gruppo AEB, azienda leader nel settore dell'enologia e delle biotecnologie, ha recentemente pubblicato (2016) uno studio riguardante proprio la Bioprotezione in enologia per ridurre l'utilizzo di diossido di zolfo nella produzione dei vini, specialmente quelli biologici.

Il contesto del progetto si divide in più parti:

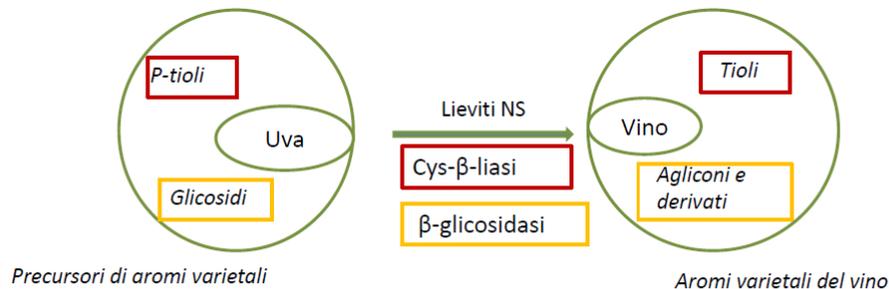
- a) Definito il ruolo dell'anidride solforosa (SO₂): agente antimicrobico, antiossidante e antiossidasico. Additivo alimentare ma prodotto allergenico, nocivo per la salute dell'uomo;
- b) Definite le alternative all'utilizzo della SO₂:
 - Antiossidasico: trattamento termico, tannini enologici;
 - Antiossidante: additivi chimici (ac. Ascorbico), lieviti inattivati arricchiti di glutazione;
 - Antimicrobico: tecniche specifiche (microfiltrazione tangenziale, pastorizzazione flash), metodi enzimatici (lisozima), additivo chimico (dimetildicarbonato DMDC, acido sorbico), additivo naturale (chitosano), lieviti non *Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *K. thermotolerans*, *P. kluyveri*);
- c) Studio dei non-*Saccharomyces* (NS): inizialmente considerati una flora di alterazione, associati ad elevate concentrazioni di acido acetico ed odori sgradevoli (Fleet and Heard, 1993), dopo gli anni 2000 vengono evidenziati contributi positivi.
 1. Effetti positivi sulle caratteristiche enologiche e sul profilo aromatico del vino (Viana et al., 2008)



Meccanismo di rilascio dei monoterpenoli dai loro precursori glicosidici (Günata *et al*, 1990).

Attività specifiche dei non-*Saccharomyces*:

- Attività Cys- β -Liasi (Zott, 2009)
- Attività β -glicosidasi (Günata et al, 1990)



In co-inoculo con *Saccharomyces cerevisiae*:

- *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima* : diminuzione dell'acidità volatile (Gonzalezroyo et al., 2015) ;
- *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima* : cambiamento del profilo aromatico del vino (Thèse, Sadoudi, 2013).

1. Proprietà antimicrobiche:

- Produzione di tossine killer prodotte da *P. membranifaciens*, *K. wickerhamii*, *M. pulcherrima* e *W. anomalus* contro *B. bruxellensis*;
- Effetto competitivo per substrati e ossigeno.

2. Studio di due ceppi attualmente commercializzati:

I. **Primaflora VB**[®] per vinificazione in bianco:

- Lieviti naturali non-*Saccharomyces* della specie *Torulaspora delbrueckii* e preparati a base di scorze di lievito;
- Popolazione vitale > 1.10^{10} cellule/grammo
- Umidità < 6%
- Non OGM, non è stato sottoposto a trattamenti ionizzanti
- Dose d'impiego su mosto bianco o rosè: da 3 a 5 g/hl in pressatura, o prima della torchiatura, o su vendemmiatrici.

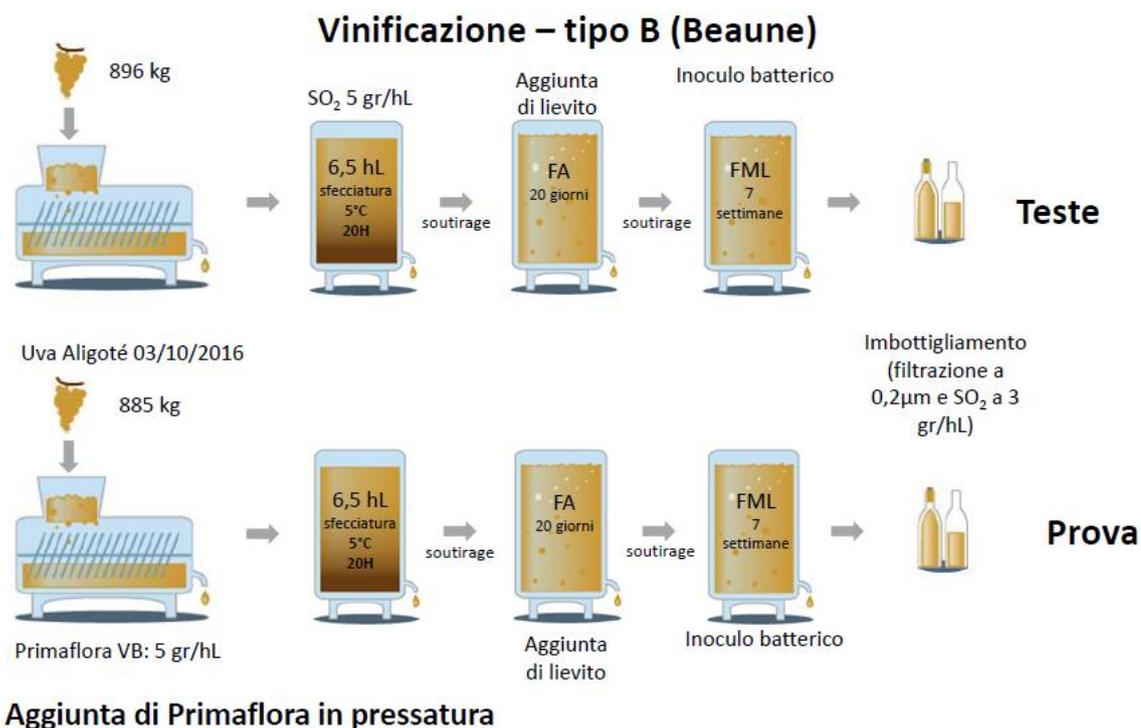
II. **Primaflora VR**[®] per vinificazione in rosso:

- Lieviti naturali non-*Saccharomyces* della specie *Metschnikowia pulcherrima*, lieviti *Saccharomyces* e preparati a base di scorze di lievito;
- Popolazione vitale > 1.10^{10} cellule/grammo
- Umidità < 6%
- Non OGM, non è stato sottoposto a trattamenti ionizzanti
- Dose d'impiego su mosti rossi: 4 g/hl su vendemmiatrici o in macerazione e fino a 8 g/hl per uve calde o con pH maggiore di 3,8.

Primaflora, quindi, è un mix complesso di microflora di lieviti delle migliori selezioni; contiene ceppi di lievito non-*Saccharomyces* presenti naturalmente sulle uve che sono in grado di impiantarsi nel mosto fin dal primo momento, cioè alla raccolta o in pigiatura. Essi occupano il mezzo e non lasciano posto alla flora indesiderata come i *Brettanomyces* o i batteri lattici che producono ammine biogene o anche odori butirrici.

- d) L'obiettivo del progetto è quello di fornire risposte sull'effetto antisettico e antiossidante del preparato a base di lievito Primaflora. Per quanto riguarda l'asse microbiologico si voleva capire l'effetto sulla biodiversità di mosti e vini e il monitoraggio dei vari parametri enologici. Mentre, per quanto riguarda l'asse chimico, era interessante vedere l'effetto di Primaflora sui composti fenolici e sull'analisi sensoriale.
- e) È stata effettuata quindi una prova di vinificazione in bianco con uva Aligoté e Primaflora VB[®], e una prova di vinificazione in rosso con uva Cabernet Sauvignon e Primaflora VR[®]. In entrambi i casi le condizioni testate sono 2: un Teste (solfitato) e una Prova (Primaflora). I campionamenti per le analisi sono stati effettuati in diversi momenti della vinificazione.

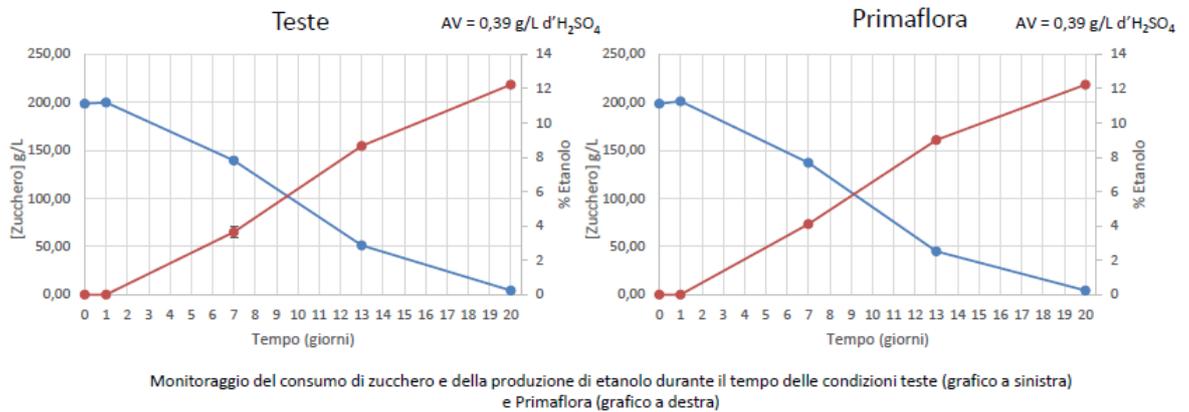
PROVA DI VINIFICAZIONE IN BIANCO:



All'analisi della biodiversità prima della fermentazione con pirosequenziamento, è stata riscontrata una maggior percentuale di *Saccharomycetales* nella prova Primaflora rispetto al teste; abbiamo quindi una minore biodiversità nella modalità Primaflora rispetto al teste.

È stato evidenziato un maggiore consumo di ossigeno disciolto nella condizione di prova con Primaflora, questo può essere una protezione contro l'ossidazione dei polifenoli del mosto, o un consumo di ossigeno disciolto da parte della tirosinasi. C'è un'elevata probabilità di impianto di *T. delbrueckii* contenuto in Primaflora.

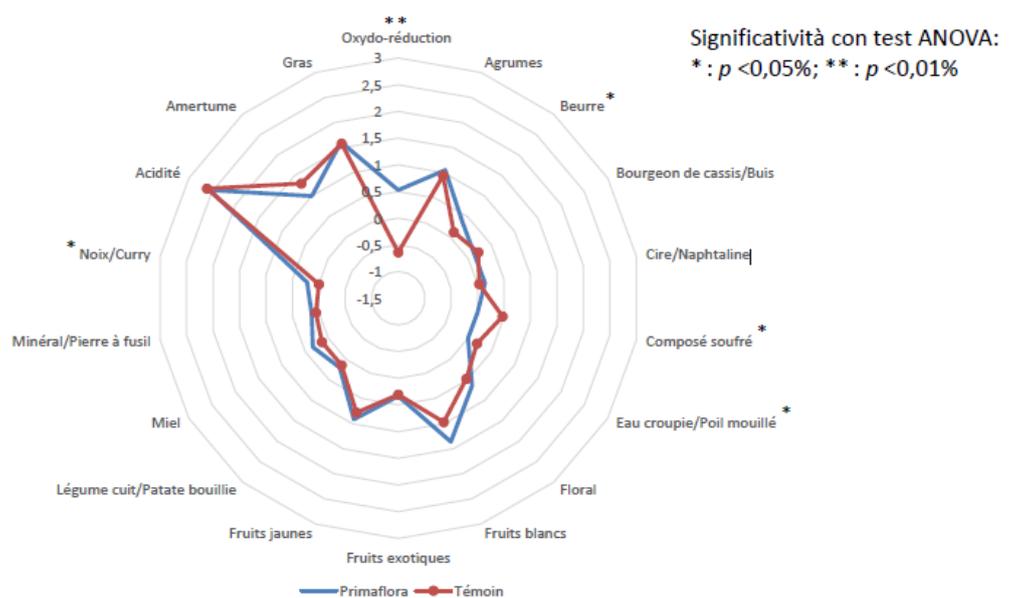
La cinetica di fermentazione è anch'essa molto simile tra le due condizioni e per entrambe le due condizioni il contenuto finale di etanolo è di 12,2% v/v. Non c'è stata nessuna differenza significativa nei livelli di acidità volatile alla fine della FA tra le due modalità.



Un'altra differenza sostanziale è stata riscontrata all'analisi colorimetrica: il mosto Primaflora sfecciato è risultato molto più marrone del mosto Teste sfecciato; la stessa cosa si è riscontrata anche a fine fermentazione, dove il vino con Primaflora si presenta molto più marrone rispetto al vino di controllo.

Colorimetria	L	a	b	Differenza significativa
Mosto sfecciato Primaflora	48,59	30,97	70,67	Si
Mosto sfecciato Teste	88,94	-0,03	46,10	

Al test dell'analisi sensoriale invece, 20/22 persone preferiscono il vino Primaflora, con una nota di burro e una leggera nota di ossidazione rispetto al teste.

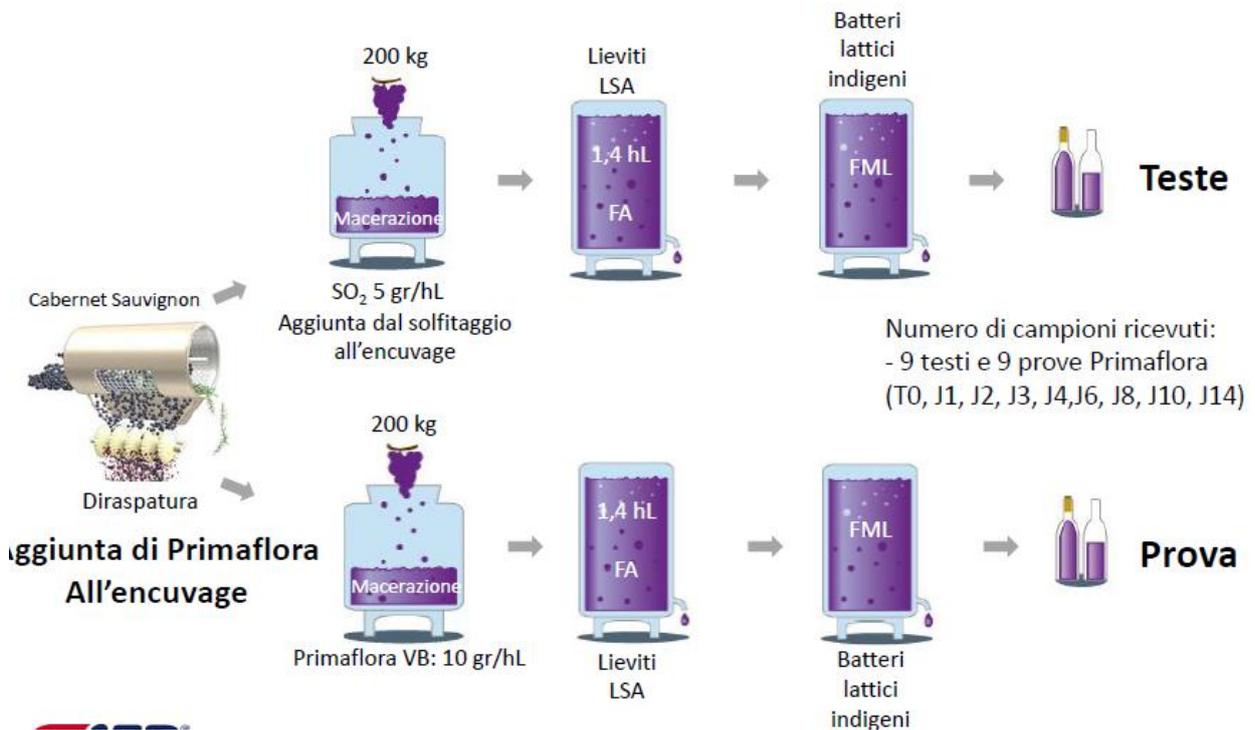


Confronto fra condizione Teste e Prova:

Tipo B (Beaune)	
Non-Saccharomyces	Maggiore frequenza di presenza del <i>T. delbrueckii</i> su mosto sfecciato e a metà FA per la condizione prova rispetto alla condizione teste.
Biodiversità	Meno biodiversità nella condizione prova Primaflora
Brettanomyces	A metà FA, popolazione maggiore nella condizione teste
Batteri acetici	A metà FA, popolazione maggiore nella condizione teste
Batteri lattici	A metà FA, popolazione maggiore nella condizione teste
Probabilità di impianto Primaflora	Elevata

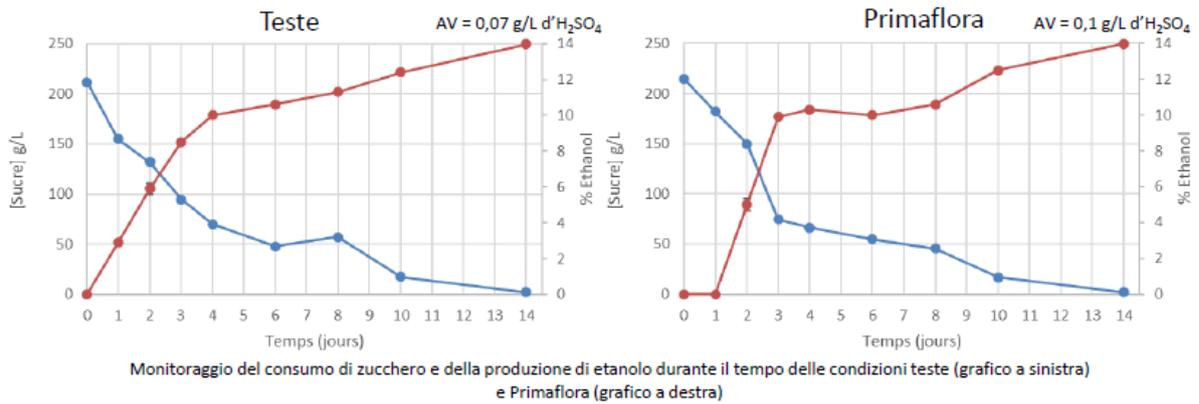
PROVA DI VINIFICAZIONE IN ROSSO

Vinificazione - Château D (Vignoble Bordelais)



Per quanto riguarda la biodiversità è stata riscontrata un'elevata presenza della specie *M. pulcherrima* durante il processo di vinificazione per la condizione Prova. C'è quindi un'elevata probabilità d'impianto della specie *M. pulcherrima* contenuta in Primaflora.

Per quanto riguarda la cinetica fermentativa c'è una leggera differenza tra le due condizioni: nessuna produzione di etanolo all'analisi J1 per la modalità Primaflora, tuttavia la concentrazione finale di etanolo è la stessa per entrambe le modalità (14% etanolo v/v). Non si riscontra nessuna differenza nei livelli di acidità volatile alla fine della fermentazione tra le due modalità.



Confronto fra condizione Teste e Prova:

Château D	
Non-Saccharomyces	Livello di popolazione elevato a T0 (problema di campionamento) Elevata frequenza di presenza di <i>M. pulcherrima</i> da T0 a J2 nella condizione di prova
Biodiversità	A J3, assenza di <i>Brettanomyces</i> nella prova con Primaflora
Brettanomyces	Efficacia uguale a Primaflora e solfitaggio
Batteri acetici	Efficacia uguale a Primaflora e solfitaggio
Batteri lattici	Forte

Conclusioni:

È stato effettuato l'impianto di Primaflora in 3 prove su 4 e le sperimentazioni sono riuscite in 3 prove su 4. In tutte le prove sul mosto si è riscontrato un aumento del consumo di ossigeno disciolto.

Le prove possono considerarsi quindi riuscite: c'è stata una diminuzione di biodiversità, nessuno sviluppo di *Brettanomyces*, di batteri lattici o acetici nei vini Primaflora.

PROVA DI VINIFICAZIONE CON LIEVITI PRIMAFLORA VB[®]

Dal 28 agosto al 30 settembre 2017 ho svolto lo stage presso la Società Agricola “47 Anno Domini” Società Semplice in Via Treviso Mare, 2 Roncade (TV). La “47 Anno Domini” è parte delle attività della Famiglia Tombacco, le altre sono: la Azienda Agricola Trevisana Società Semplice di Paese (TV) e la Vinicola Tombacco srl di Trebaseleghe (PD).

L'azienda produce vini biologici tranquilli e spumanti, bianchi e rossi. È stato proprio durante questo stage che sono venuta a conoscenza dei lieviti Primaflora e del concetto di bioprotezione.

Insieme all'Enologo Franco Zuccarello abbiamo portato avanti una prova di vinificazione di Pinot Grigio biologico atto a dare Pinot Grigio DOC “delle Venezie” utilizzando i lieviti Primaflora VB[®] della AEB.

RAPPORTO DI VINIFICAZIONE:

Data	29/08/2017
Vitigno	Pinot Grigio
Tipo vinificazione	Bianco
Tipologia prodotto	Uva intera
Vendemmia	Meccanica
Stato sanitario	Buono
Designazione categoria, denominazione di vendita, provenienza	Pinot Grigio DOC delle Venezie Roncade, TV
Operazioni iniziali	Diraspigiatura

Prodotti enologici	Principio attivo (p. a.)	Prodotto commerciale (p.c.)	Dose g/hl g/100 kg
Antiossidanti	Tannino di galla	Gallovin	3 g/ql
Altri	Lieviti NS <i>T. delbrueckii</i>	Primaflora VB	1 kg su 10 l (circa) di acqua tiepida, in carro vendemmia o allo scarico della vendemm.

Inizio fermentazione alcolica: 30/08/2017

Preparazione inoculo			
	Nome commerciale - ceppo	Dose/hl	Quantità
Lievito LSA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		4 kg
Attivante (idratazione)	Scorze di lievito – Auxilia	¼ del lievito	1 kg

Operazioni successive alla FA		
Operazione	Prodotto enologico aggiunto	Dose/hl
Chiarifica	Bentonite	30 g/hl

BILANCIO DI VINIFICAZIONE:

Vitigno	Pinot Grigio
Superficie ha	00.9835
Resa massima ql/ha	180
Uva ottenibile kg	172,85
Vino ottenibile litri	120,99
Data Vendemmia	29/08/2017

Uve prodotte	Raspi		Vinaccia		Mosto torbido	Fecce mosto		Mosto limpido	Mosto P.F.
kg	%	kg	%	kg	kg	%	kg	kg	Litri
16.800	/	/		2.300	14.500	2,7	400	14.100	13.000

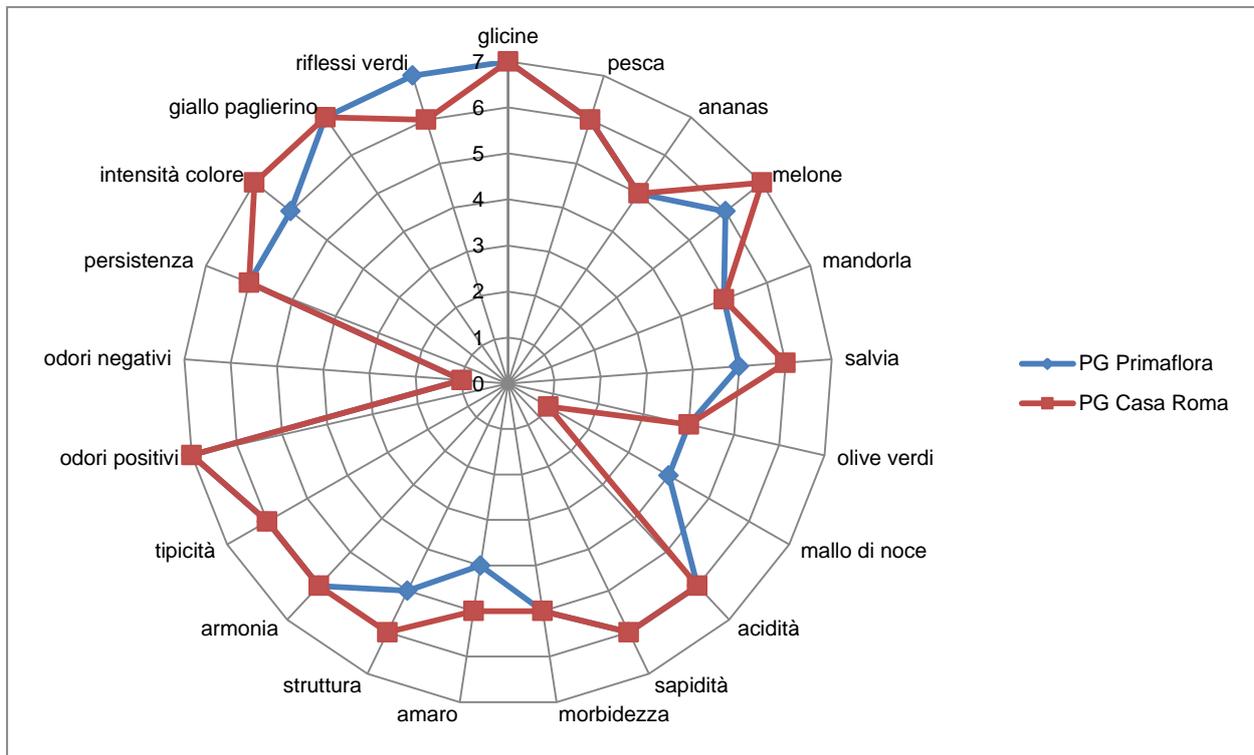
Totali di vinificazione		
Raspi	Kg	0
Vinacce	Kg	2300
Fecce	Kg	400
Mosto	Kg	14500
Mosto parzialmente fermentato	Litri	13000
Vino totale	Litri	13000
Cali e perdite	Litri	130 (1%)
Vino finito	Litri	12470
Resa uva/vino	% 74,22	12100 di Atto DOC 370 di Bianco IGT

Il prodotto è stato poi imbottigliato in data 27/12/2017 da me e dall'enologo Franco Zuccarello. Prima dell'imbottigliamento sono state effettuate delle correzioni: l'acidità è stata corretta con acido citrico e acido malico. È stata aggiunta della gomma arabica come stabilizzante contro le precipitazioni di colore e le casse metalliche. Per la stabilizzazione tartarica abbiamo usato invece lo Zenith perlage, soluzione acquosa a base di K poliaspartato al 10% e mannoproteine completamente solubili. Il K poliaspartato (o KPA) è un poliaminoacido prodotto a partire dall'acido L-aspartico, aminoacido presente nell'uva in concentrazione variabile in base alla varietà. L'uso enologico del poliaspartato di potassio è stato approvato dall'OIV con la risoluzione Oeno 543/2016 che stabilisce un dosaggio massimo di 10 g/hl. L'autorizzazione all'uso da parte dell'Unione Europea è arrivata a fine 2017.

Il vino prodotto con lieviti Primaflora è stato sottoposto ad una commissione di 16 degustatori, ed è stato chiesto loro di assegnare per ogni categoria e descrittore una valutazione oggettiva in una scala da 1 a 9.

Il confronto è stato fatto poi con un altro Pinot Grigio prodotto da Casa Roma, annata 2016. Il confronto ovviamente non può essere attendibile al 100% in quanto i due vini sono di due annate diverse e la zona di produzione è anch'essa diversa; inoltre il Pinot Grigio fatto con i lieviti Primaflora non è ancora un vino "finito".

È stata poi fatta una media e il valore che si è ripetuto più volte per ogni descrittore è stato preso come valore effettivo.



Dal grafico si può comunque notare come i sentori si equivalgono come punteggio, nel PG Primaflora sono leggermente inferiori i sentori di melone e di salvia, ed è più accentuato il mallo di noce. Al gusto, invece, risulta più morbido, meno amaro e leggermente meno strutturato rispetto al PG Casa Roma. Per quanto riguarda la parte visiva notiamo come l'intensità colorante sia leggermente inferiore, mentre i riflessi verdognoli sono più marcati.

CONCLUSIONI:

Dopo aver analizzato diversi studi sulla bioprotezione e aver confrontato i risultati possiamo affermare quindi che l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* e preparati a base di scorze di lievito, come il Primaflora VB[®], siano un'ottima alternativa all'utilizzo dell'anidride solforosa nelle prime fasi della lavorazione dell'uva, garantendo lo stesso risultato in termini di qualità, se non addirittura migliorando la stessa specialmente dal punto di vista organolettico (complessità aromatica del prodotto finale).

Infine, vorrei ringraziare l'enologo dell'Azienda Agricola "47 Anno Domini", Franco Zuccarello, e il sig. Giuliano Tombacco per avermi dato la possibilità di attuare e sviluppare questa tesi anche attraverso la sperimentazione e la partecipazione attiva alle attività di vinificazione e di analisi.

Sitografia e bibliografia:

- www.winemak-in.com
- www.perdomini-ioc.com
- www.infowine.com
- <https://vigneviniequalita.edagricole.it/>
- www.aeb-group.com
- www.sciencedirect.com