ISIS PAOLINO D'AQUILEIA

DI CIVIDALE DEL FRIULI

istituto tecnico – settore tecnologico

indirizzo "Agraria, agroalimentare e agroindustria" – articolazione "viticoltura ed enologia"

TESI DEL CORSO DI SPECIALIZZAZIONE PER ENOTECNICO

Selezione dei lieviti aziendali: un compromesso tra fermentazioni spontanee e utilizzo di *starter*?

CANDIDATO

Dylan Marinig

Anno scolastico 2022 – 2023

INDICE

1 INTRODUZIONE 3

2 I LIEVITI INDIGENI 5

2.1 LIEVITI INDIGENI PRESENTI SULLE UVE 5
2.2 FATTORI CHE INFLUENZANO LA POPOLAZIONE MICROBICA SULLE UVE 6
2.3 LIEVITI INDIGENI PRESENTI NEL MOSTO 7
2.4 FATTORI CHE INFLUENZANO IL MICROBIOTA DEL MOSTO 8

3 LE FERMENTAZIONI SPONTANEE 9

3.1 INDIGENI O *STARTER*? PRO E CONTRO 10

4 LA "TERZA VIA": LA SELEZIONE DEI LIEVITI AZIENDALI 13

4.1 PROTOCOLLI PER LA SELEZIONE DEI LIEVITI AZIENDALI 14
4.2 PROGETTI ATTIVATI 17

5 CONCLUSIONI 20

6 BIBLIOGRAFIA 22

1 Introduzione

I lieviti indigeni sono microrganismi che sono già presenti naturalmente nell'ambiente della vigna, compresa l'uva, e di cantina. In vigneto, i generi che maggiormente influenzano il microbiota indigeno sono *Aureobasidium*, *Sporobolomyces, Rhodosporidium, Filobasidium.* Per quanto riguarda i generi presenti sulla superficie della bacca, la composizione della popolazione evolve con la maturazione. Infatti, sui grappoli non maturi possiamo trovare prevalentemente specie appartenenti al genere *Torulopsis, Cryptococcus, Rhodotorula, Candida, Aureobasidium*. Il genere *Aureobasidium* in alcuni casi prevale grazie alla sua elevata resistenza ai funghicidi e viene sfruttato come antagonista per far fronte a diverse infestazioni fungine causate da agenti indesiderati come *Aspergillus carnonarius*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*. Al contrario, sui grappoli maturi la popolazione che si riscontra è prevalentemente composta da *Hanseniaspora/Kloeckera* spp*., Metschnicowia* spp*., Candida zemplinina, Rhodotorula* spp*., Debaryomices* spp*., Pichia* spp.; i primi due generi citati possono arrivare a rappresentare fino al 75% del microbiota. Il genere *Saccharomyces* è poco o non presente sui grappoli. La qualità e quantità della popolazione di lieviti indigeni in vigneto può variare di anno in anno perché influenzata da diversi fattori. Ad esempio, i parametri che influenzano la microflora presente sulle uve sono le pratiche agronomiche (nella viticoltura biologica il microbiota superficiale della bacca è più ricco, in termini di numero e biodiversità, rispetto alla viticoltura tradizionale). Altri fattori influenzanti i lieviti presenti sulle uve sono quelli climatici (es. temperatura, l'esposizione ai raggi UV, pioggia, luce solare, vento) e biologici (es. insetti).

Le fermentazioni spontanee sono le fermentazioni che vengono eseguite senza ricorrere all'inoculo di lieviti *starter* e vengono quindi svolte solo dai lieviti presenti sulla buccia all'arrivo delle uve in cantina e quelli presenti sulle attrezzature di cantina in cui è prevalentemente, ma non esclusivamente, presente il genere *Saccharomyces*. Ci sono vari fattori che influenzano il microbiota iniziale di un mosto come il metodo di raccolta dell'uva, il loro trasporto, le caratteristiche pre-diraspartura delle uve e i pre-trattamenti effettuati sul mosto. Inoltre, ovviamente, le caratteristiche metaboliche dei diversi lieviti influenzano la composizione del microbiota durante la fermentazione acolica. Generi come *Candida, Hanseniaspora, Pichia, Rhodotorula, Issatchenkia, Kuyveromyces e Metschnikowia* sono poco alcoligeni quindi prevalgono durante le fasi iniziali della fermentazione e producono prodotti secondari che influenzano la qualità dei vini. Con l'aumentare del grado alcolico questi ceppi lasciano il posto a *Saccharomyces cerevisiae*. Se le fermentazioni "spontanee" non

vengono ben gestite, esiste il rischio che la microflora indigena, anche a causa della presenza di fattori avversi sia ambientali che tecnologici, non porti a termine la fermentazione alcolica o possa produrre limitati aromi fermentativi o addirittura off- flavours. A compromettere il prosieguo del processo di vinificazione sono in particolare la scarsa resistenza all' alcol dei lieviti indigeni, le esigenze nutrizionali e la produzione di composti secondari come l'anidride solforosa (Guzzon *et al.,* 2011).

Per questo motivo l'uso di lieviti selezionati, prevalentemente *Saccharomyces cerevisiae*, per la gestione della fermentazione alcolica è una pratica ormai consolidata che ha soppiantato la fermentazione alcolica spontanea attuata da lieviti indigeni. Dal punto di vista enologico, i lieviti *starter* riducono i rischi di arresti di fermentazione e più in generale consentono fermentazioni regolari e dai risultati prevedibili (Guzzon *et al*., 2010), con produzione di prodotti con caratteristiche organolettiche riproducibili e costanti nel tempo (Domizio *et al*., 2011). Tuttavia, è opinione di diversi autori Domizio *et al*., 2011; Suzzi e Toffolo 2018) e produttori che l'utilizzo di un ridotto numero di ceppi nelle diverse realtà produttive possa contribuire all'omologazione dei prodotti ottenuti.

Per questo, ultimamente l'attenzione dei produttori di starter commerciali include la selezione di lieviti *non-Saccharomyce*s per migliorare la qualità sensoriale, la complessità aromatica, la stabilità e la freschezza del vino (Domizio *et al*., 2011; Morata, Bañuelos, *et al*. 2019) e la produzione di vini maggiormente legati al territorio Guzzon *et al*., 2011).

La selezione e il conseguente utilizzo di lieviti aziendali può essere un approccio interessante per cercare di far fronte alle difficoltà di una fermentazione condotta da lieviti indigeni senza però ricorrere all'uso di prodotti puramente commerciali. L ' evoluzione della tecnologia analitica ha ridotto l'onerosità del processo di isolamento, caratterizzazione e conservazione dei microrganismi enologici, mettendo a disposizione anche di piccole cantine strumenti che fino a ieri erano ad esclusivo appannaggio di realtà economicamente importanti.

Esistono già diverse compagnie ed istituti di ricerca che propongono il prelievo dei lieviti aziendali, la loro selezione, replicazione e la produzione di preparati ad esclusivo uso delle aziende da cui sono stati isolati. Questo elaborato, dopo aver descritto brevemente le caratteristiche dei lieviti indigeni e il contributo che essi possono dare al prodotto finale, tratterà le tecnologie e le riflessioni alla base della selezione dei lieviti aziendali, prendendo come caso di studio alcune compagnie che già offrono questo servizio.

2 I LIEVITI INDIGENI

I lieviti indigeni, o autoctoni, sono lieviti che si trovano naturalmente in un determinato ambiente, come le uve e il mosto d'uva, senza l'aggiunta di ceppi selezionati. Queste popolazioni sono presenti in tutte le aziende, e la loro composizione e concentrazione sul substrato varia a seconda della regione geografica e delle condizioni ambientali. I lieviti indigeni presenti nel mosto d'uva possono provenire dalla superficie delle uve, dal suolo, dalle foglie, dalle radici della vite ma anche dalle attrezzature di cantina.

2.1 Lieviti indigeni presenti sulle uve

Nell'uva c'è una popolazione microbica di circa 10^3-10^5 UFC/g, composta per la maggior parte da lieviti ma sono presenti anche batteri e funghi filamentosi; sui grappoli che non hanno ancora raggiunto la maturità la popolazione di lieviti è di circa 10-10^3 UFC/g mentre con la maturazione la popolazione aumenterà fino a 10^4-10^6 UFC/g.

I principali generi che troviamo sugli acini non maturi sono *Torulopsis, Cryptococcus, Rhodotorula, Candida, Aureobasidium, Sporobolomyces, Rhodosporidium, Filobasidium*. Questi lieviti sono presenti, oltre che sull'uva, anche in altre aree del vigneto come il suolo, le foglie, la corteccia. Un genere di lieviti molto presente sulle uve immature è *Aureobasidium*, il quale non ha alcun interesse enologico in quanto incapace di fermentare gli zuccheri fermentescibili presenti nel mosto (glucosio e fruttosio); questo lievito non sopravvive nel vino, tuttavia è una presenza dominante sulle uve perché ha un elevata resistenza hai fungicidi ed è in grado di svolgere un'azione detossificante nei confronti del solfato di rame. Inoltre, *Aureobasidium* entra in competizione con altri funghi. Come già enunciato precedentemente, col progredire della maturazione, sugli acini si affermano altri lieviti quali *Hanseniaspora/Kloeckera* spp., *Metschnicowia* spp., *Candida zemplinina*, *Rhodotorula* spp; *Debaryomices* spp., *Pichia* spp.; i primi due generi sono quelli che prevalgono sulla superfice della bacca costituendo dal 50 al 75% del microbiota. Sull'uva, ceppi di *S. cerevisiae* sono poco presenti o talvolta assenti, la loro concentrazione varia di anno in anno nello stesso vigneto come mostra il Grafico 1 che mostra la distribuzione di ceppi di *S. cerevisiae* nello stesso vigneto durante 4 vendemmie differenti.

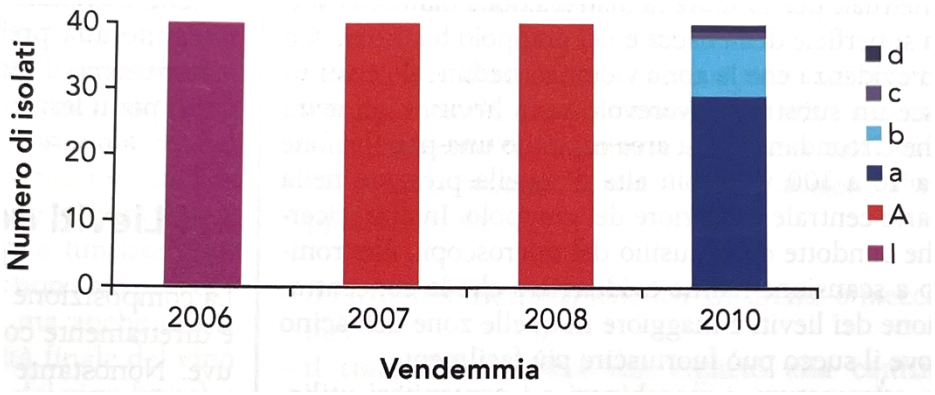

Grafico 1: distribuzione di ceppi diversi di Saccharomyces cerevisiae isolati dallo stesso vigneto in quattro vendemmie (Suzzi e Toffalo, 2018)

2.2 Fattori che influenzano la popolazione microbica sulle uve

I principali fattori che incidono sulla popolazione di lieviti sulle uve sono le condizioni climatiche, i trattamenti che vengono effettuati in vigneto e i fattori biotici.

CONDIZIONI CLIMATICHE: La concentrazione di lieviti varia all'interno del vigneto, a causa dei microclimi che si creano nelle varie zone e, dunque, la presenza di microrganismi differisce da pianta a pianta in seguito alla sua posizione nel vigneto, dell'irraggiamento solare che riceve e dalla posizione dell'acino che può essere più o meno esposto ai raggi UV. Inoltre, è stato rilevato che in annate con piogge molto abbondanti, la popolazione microbica in vigneto cresce grazie alla maggior quantità di sostanze nutritive a disposizione dei lieviti che fuoriescono dall'acino grazie ai meccanismi di esosmosi. Altri ricercatori, al contrario, affermano che in annate con piogge molto abbondati la microflora sia minore anche di dieci volte mentre, in annate molto calde e secche, la popolazione indigena in vigneto sia più alta.

TRATTAMENTI E ATTREZZATURE: l'impiego di prodotti chimici come insetticidi e fungicidi diminuiscono notevolmente la biodiversità del vigneto e quindi influenzano negativamente i lieviti che prendono parte alle fermentazioni. È stato dimostrato che nella viticoltura biologica, in cui, sono ammessi solo trattamenti a base di rame e zolfo la popolazione microbica del vigneto sarà maggiore e diversificata sia in termini di ceppi di *S. cerevisiae* che di generi di non-*Saccharomyces*.

FATTORI BIOTICI: gli insetti e le interazioni tra popolazioni microbiche sono alcuni dei fattori più importanti. Infatti, gli insetti giocano un ruolo fondamentale sulla popolazione microbica di un

vigneto, è risaputo che possono attaccare gli acini e quindi provocare delle fuoriuscite di sostanze nutritive disponibili per i microrganismi, causando così un notevole aumento della popolazione di lieviti indigeni. Inoltre, insetti come la Drosophila, o moscerino della frutta, possono trasportare i microrganismi in diverse aree del vigneto; solitamente vengono trasportati lieviti apiculati, *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens*, *Metschnikowia pulcherrima,* batteri lattici che sono responsabili della fermentazione malolattica e batteri acetici che producono lo spunto acetico nel vino. Alcuni studi hanno riscontrato nel becco e nella prima parte del tratto digestivo degli uccelli presenza di diversi lieviti come *Hanseniaspora uvarum* dovuto molto probabilmente all'ingerimento di acini d'uva.

La popolazione di lieviti indigeni può anche essere influenzata dalle interazioni tra lieviti o tra lieviti e altri microrganismi, ad esempio il lievito M. *pulcherrima* svolge un'azione inibitoria nei confronti di molti microrganismi come i funghi filamentosi, lieviti e batteri in quanto produce un pigmento insolubile chiamato pulcherrimina che impoverisce il mezzo di ferro. Tuttavia, la produzione di pulcherrimina non arreca danno a S*. cerevisiae*.

Altri fattori che possono influenzare la composizione e la concentrazione del microbiota sono la maturazione dell'uva, la posizione dell'acino all'interno del grappolo: ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato che sugli acini vicini al peduncolo si possono trovare cariche di lievito da 10 a 100 volte maggiori rispetto alla parte mediana e finale dell'acino. Anche la composizione della pruina, che aiuta l'adesione degli organismi contribuisce alla composizione del microbiota.

2.3 Lieviti indigeni presenti nel mosto

La presenza di lieviti indigeni del mosto è collegata alla presenza di microrganismi sulle uve; tuttavia, il numero di specie presenti nel mosto è maggiore di quelle presenti sulle uve poiché anche le attrezzature di cantina fungono da serbatoio per questi microrganismi. In cantina si trovano soprattutto *Wickerhamomyces anomalus, Pichia membranifaciens, Candida* spp., *Cryptococcus* spp*.,* ma specie prevalente è S. *cerevisiae* . Le pratiche di sanificazione sulle attrezzature di cantina dovrebbero essere attuate con lo scopo di ridurre al minimo le contaminazioni del mosto; tuttavia, queste pratiche non riescono a eliminare del tutto la microflora presente sulle attrezzature di cantina, per cui i lieviti residenti entrano a far parte del processo di vinificazio i lieviti presenti nel mosto sono divisi in 3 categorie in base al loro metabolismo:

- LIEVITI CON METABOLISMO OSSIDATIVO: *Pichia spp, Debaryomyces spp., Rhodotorula spp., Candida spp., M. pulcherrima* e *Cryptococcus albidus;*
- LIEVITI APICULATI CON ATTIVITÀ FERMENTATIVA DEBOLE in cui possiamo trovare specie come *K. apiculata/H. uvarum*
- LIEVITI CON METABOLISMO FERMENTATIVO: *Kluyveromyces marxianus, Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp.

Alcuni lieviti come *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus hansenii*, A. *pullulans* che sono aerobi obbligati quindi essendo che necessitano la presenza di ossigeno per svilupparsi non prendono parte alla fermentazione alcolica.Altri lieviti come P. *membranifaciens*, W. *anomalus* e *Candida* spp. presentano scarsa attività fermentativa se non vengono bloccati tramite una solfitazione possono prendere parte alla fermentazione e determinare delle alterazioni alla qualità del vino finito.

2.4 Fattori che influenzano il microbiota del mosto

Il mosto contiene tutti gli elementi necessari alla sopravvivenza dei lieviti: zuccheri monosaccaridi fermentescibili (glucosio e fruttosio), fosfati, solfati, composti del potassio, del magnesio, del calcio, vitamine idrosolubili. Alcuni fattori come il pH (3-3,5 nel mosto) e l'elevata concentrazione zuccherina (230 g/L in un mosto normale) aiutano nella selezione dei microrganismi perché non tutti riescono a sopravvivere in queste condizioni; un altro fattore con grande azione selettiva nel mosto è l'anidride solforosa, in base alla quantità aggiunta otterremo specifiche azioni contro i microrganismi che vogliamo eliminare. Come già enunciato nel precedente paragrafo il microbiota nel mosto dipende strettamente dalla composizione della comunità presente sulle uve; tuttavia, il metodo di raccolta incide fortemente, ad esempio nella vedemmia a mano in cassetta il contatto dei contenitori con il terreno comporterà la contaminazione con i microrganismi lì presenti e un arricchimento della popolazione del mosto. Anche il trasporto dell'uva, le condizioni in cui questa arriva in cantina e come viene mantenuta prima della pigiatura, i pretrattamenti che vengono eseguiti sul mosto (areazione, trattamenti enzimatici, chiarifiche, temperatura, inoculo di ceppi *starter*) sono fattori che impattano sulla microflora del mosto.

3 LE FERMENTAZIONI SPONTANEE

Le fermentazioni spontanee, a differenza delle fermentazioni controllate, in cui vengono utilizzati ceppi di lievito selezionati, sono processi di fermentazione in cui i lieviti e gli altri microorganismi coinvolti provengono dall'ambiente circostante.

Nei processi di fermentazione spontanea, i ceppi di lievito coinvolti sono spesso una popolazione mista di specie del genere *Saccharomyces* e di lieviti non-*Saccharomyces*, come *Brettanomyces* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp. e altri. Questi lieviti possono variare da cantina a cantina e possono influenzare il profilo aromatico e gustativo del prodotto finale.

La cinetica nelle fermentazioni spontanee può essere più complessa rispetto a quelle controllate. Poiché la popolazione di lieviti è eterogenea, con diversi ceppi che competono tra loro, il processo risultare più lento e meno prevedibile. Inoltre, la presenza di altri microorganismi come batteri lattici-acetici può influenzare ulteriormente la cinetica.

Le problematiche associate alle fermentazioni spontanee includono:

1. CONTAMINAZIONE INDESIDERATA: poiché i lieviti e altri microorganismi provengono dall'ambiente circostante, c'è sempre il rischio di contaminazione da parte di microrganismi indesiderati. Questo può portare a difetti di gusto, odori sgradevoli o anche alla rovina del prodotto finale.
2. VARIABILITÀ DEL PRODOTTO: a causa della variabilità della popolazione e delle condizioni ambientali, le fermentazioni spontanee possono produrre risultati molto diversi. Il profilo aromatico e gustativo può differire da lotto a lotto, rendendo difficile ottenere una coerenza nel prodotto finale.
3. FERMENTAZIONE DIFFICILMENTE CONTROLLABILE: poiché le fermentazioni spontanee dipendono da ceppi di lievito indigeni e altri microorganismi presenti nell'ambiente, il controllo del processo fermentativo è limitato. È difficile prevedere esattamente come si svilupperà la fermentazione e mantenerla sotto controllo.
4. FERMENTAZIONI LUNGHE: le fermentazioni spontanee possono richiedere più tempo rispetto alle fermentazioni controllate. Poiché i lieviti indigeni possono essere meno vigorosi e la competizione con altri microorganismi può rallentare il processo, la fermentazione può richiedere settimane o addirittura mesi per completarsi.

Nonostante queste problematiche, le fermentazioni spontanee sono apprezzate da molti produttori e consumatori per la loro complessità e carattere unico. Tra gli aspetti positivi della fermentazione spontanea troviamo:

1. VALORIZZAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEI LIEVITI INDIGENI
2. ERMENTAZIONI DI MOSTI MOLTO ZUCCHERINI: ad esempio, *T. delbruekii* è capace di fermentare mosti con alta pressione osmotica
3. TEMPERATURE DI FERMENTAZIONE BASSE: alcuni ceppi di lieviti indigeni come Zygosaccharomyces spp. sono criotolleranti quindi si può tenere le temperature di fermentazione molto basse.
4. COMPLESSITA' DEL PRODOTTO FINALE: i lieviti indigeni producono sostanze secondarie diverse da quelle di *Saccharomyces* come acetaldeide, esteri fermentativi, acidi grassi e alcoli superiori che possono andare a rendere il vino molto più complesso di un vino ottenuto dalla fermentazione fatta con uno *starter*.
5. LIBERAZIONE DI AROMI PRIMARI: alcuni lieviti indigeni riescono a liberare alcuni aromi primari come tioli o terpeni che *S. cerevisiae* non riesce a liberare (Guzzon *et al*., 2020)

Vista la complessità del processo, l'ottenimento di risultati di alta qualità presuppone una buona conoscenza e gestione della fermentazione

3.1 Indigeni o *starter*? Pro e contro

Sia l'uso di lieviti indigeni che di *starter* convenzionali (*S. cerevisiae*) presentano degli aspetti positivi e negativi (Tabella 1). Gli *starter* selezionati vantano una grande velocità di fermentazione, con un avvio rapido grazie anche alla grande concentrazione di cellule, si parla di milioni di cell/ml. Essendo così numerosi riescono a prendere il controllo della fermentazione alcolica molto velocemente e alzare il livello di etanolo senza permettere ad altre specie di svilupparsi; questo fa si che le contaminazioni nei mosti in fermentazione in cui sono stati inoculati *starter* siano minori. Un'altra qualità degli *starter* è l'elevata tolleranza agli stress ambientali provocati da alto grado alcolico, alle basse temperature e ai mosti con pressione osmotica elevata. Dall'altra parte, i lieviti indigeni contribuiscono all'unicità del prodotto finale in quanto la popolazione in azienda varia da aera ad area e anche nel tempo, causando inoltre una variabilità del prodotto di anno in anno. Alcuni indigeni come *T. delbruekii* o *Zygosaccharomyces spp*. presentano tolleranza molto elevata agli *stressor*. I lieviti indigeni sono capaci di rilasciare anche sostanze aromatiche come quelle citate in precedenza

che rendono il vino molto più complesso, questi lieviti contribuiscono al rilascio di aromi primari come tioli e terpeni e sono in grado di produrre tossine killer che contrastano microrganismi che potrebbero risultare indesiderati (Figura 1). (Comitini *et al.,* 2017)

	LIEVITI INDIGENI (fermentazione spontanea)	**LIEVITI SELEZIONATI** (*Starter* convenzionali *S. cerevisiae* in fermentazione controllata)
PRO	• Variabilità e unicità del prodotto • Adattabilità al tipo di mosto • Decremento della produzione di sostanze indesiderate • Rilascio di sostanze positive • Produzione di metaboliti che stabilizzano e valorizzano la qualità del vino	• Avvio e cinetica di fermentazione veloci • Basso rischio di contaminazioni • Basso rischio di rallentamenti/arresti • Alta concentrazione di cell/ml di mosto • Tolleranza allo stress • Standardizzazione del prodotto
CONTRO	• Fermentazioni lente • Possibili contaminazioni • Possibili arresti o rallentamenti fermentativi • Possibile deviazione organolettica a causa del rilascio di sostanze indesiderate	• Nessun contributo di microrganismi provenienti dal *terroir* • Prodotti omologati

Tabella 1: confronto tra vantaggi e svantaggi nella vinificazione con lieviti indigeni in fermentazione spontanea e lieviti starter in fermentazione controllata

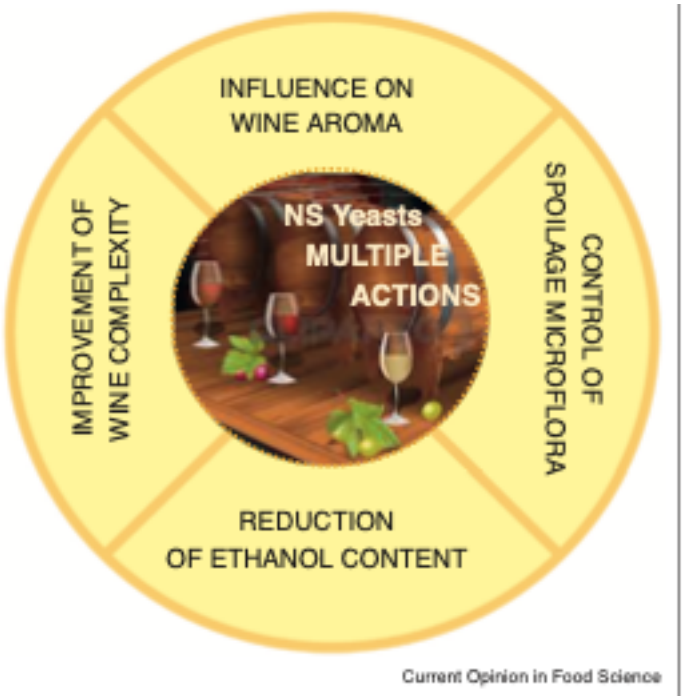

Figura 1: contributo dei lieviti non-Saccharomyces al miglioramento del prodotto (Comitini et al., 2017)

Di contro, i ceppi *starter* non conferiscono nessun contributo proveniente dal *terroir* in quanto vengono prodotti su larga scala da aziende e vengono selezionati in diverse aree; il secondo punto a sfavore di questi lieviti è sicuramente la standardizzazione del prodotto, con l'uso di *Saccharomyces cerevisiae* selezionato si ottiene ogni anno un vino con le stesse proprietà organolettiche dell'anno precedente. Tra gli svantaggi di utilizzare lieviti indigeni troviamo la lentezza delle fermentazioni e i possibili arresti o blocchi fermentativi oppure possibili contaminazioni.

4 La “terza via”: la selezione dei lieviti aziendali

A causa dell’opinione che l’uso di lieviti selezionati stia omologando il vino e dell’imprevedibilità della fermentazione spontanea, negli ultimi anni sta attirando sempre più interesse una “terza via” cioè la selezione di lieviti d’azienda; è una pratica oggi piuttosto diffusa e condotta da Università, centri di ricerca, laboratori di consulenza enologica, compagnie produttrici di lieviti enologici, che consiste nel prelievo di lieviti dal vigneto e dalle attrezzature di cantina, l’isolamento di questi ceppi, l’identificazione e la prova di fermentazione su mosti sintetici e su mosti naturali per verificarne le caratteristiche e procedere con la produzione di *starter* unici da azienda ad azienda. Nella Figura 2 vengono illustrati i vantaggi di questa selezione: il conferimento di unicità al prodotto in quanto la popolazione di lieviti è propria dell’azienda produttrice e quindi impossibile da riprodurre. L’uso di questi lieviti aumenta la correlazione tra le caratteristiche del vino e del territorio, beneficiando però dei vantaggi sia della diversità tra i generi che della selezione. Viene sì standardizzata la produzione ma non in modo negativo rischiando di avere un vino molto simile a quello delle cantine nelle zone limitrofe, ma bensì, avendo un vino unico.

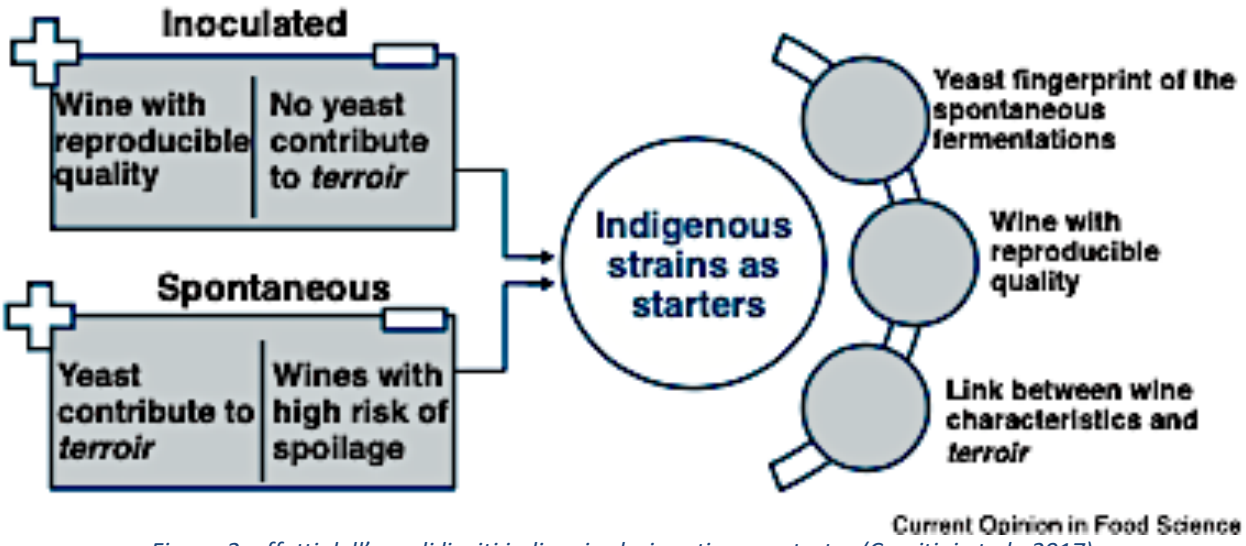

Figura 2: effetti dell’uso di lieviti indigeni selezionati come starter (Comitini et al., 2017)

4.1 Protocolli per la selezione dei lieviti aziendali

La selezione dei lieviti in azienda e la produzione degli *starter* richiede la messa a punto di protocolli operativi; in bibliografia è possibile rintracciare protocolli molto differenti tra loro, si seguito ne verranno presentati alcuni.

A. PROTOCOLLO FONDAZIONE EDMUND MACH

Figura 3. Diagramma del protocollo di selezione di lieviti aziendali messo a punto dal laboratorio di microbiologia della fondazione Edmund Mach (Guzzon et al., 2020)

Il protocollo sviluppato dalla fondazione E. Mach (Figura3) ha come tratto distintivo la selezione di ceppi di *S. cerevisiae* ma provenienti dalla specifica azienda del richiedente. Il campionamento avviene campionamento sul mosto in avanzato stato di fermentazione, non da uve in quanto questo lievito è meno presente su questo substrato. Successivamentevengono svolte le analisi microbiologiche: i lieviti vengono coltivati su diversi terreni selettivi che permettono una prima scrematura tra lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* e in seguito contati. Le tecniche molecolari aiutano poi nell'identificazione del lievito sia a livello di specie che di ceppi, che verranno poi conservati in purezza. Prima dell'effettivo utilizzo in cantina, i ceppi selezionati vengono sottoposti, in laboratorio, a prove fisiologiche di attitudine enologica (potere alcoligeno, produzione di acido acetico, produzione di anidride solforosa, comportamento a differenti temperature o livelli di acidità), di resistenza agli inquinanti come il rame, ai tannini presenti nei vini rossi da affinamento, di produzione di acido solfidrico, di risposta a differenti protocolli nutrizionali e di sviluppo aromatico. I ceppi di lieviti risultati più performanti vengono conservati in condizioni controllate e utilizzati in azienda nella vendemmia successiva. (Guzzon *et al*., 2020)

B. PROTOCOLLO SOCIETA' COMMERCIALE 1

Il protocollo sviluppato da una società specializzata nella fornitura di servizi analitici nel comparto agroalimentare, con sede a Poggibonsi (SI), offre alle aziende la possibilità di identificare la flora più interessante tra quella che *caratterizza* il territorio e ne garantiscee la disponibilità esclusiva. La selezione può risultare lunga da uno a tre anni e risulta sufficientemente sostenibile dal punto di vista economico.

Il protocollo prevede 4 *step* sequenziali:

1. PRE-SELEZIONE: vengono seguite alcune fermentazioni spontanee che consentono di caratterizzare gran parte della varietà delle popolazioni di lievito presenti in azienda ed individuare già quali ceppi possono avere caratteristiche fermentative e qualitative interessanti.
2. ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE GENETICA: i lieviti vengono isolati singolarmente identificati geneticamente. Al termine di questa fase si hanno a disposizione molti ceppi che vengono conservati vivi da ISVEA fino al termine del lavoro di selezione.
3. SCREENING DI BASE: utilizzando terreni colturali selettivi e test di fermentescibilità dei mosti, vengono determinate le caratteristiche fermentative essenziali di tutti i ceppi e vengono valutate le tendenze a produrre sostanze deleterie per la qualità del vino. Al termine di questa fase, insieme ai responsabili dell'Azienda, vengono scelti i ceppi migliori che passeranno alle successive fasi di selezione.
4. SCREENING ENOLOGICO: i ceppi di lievito che hanno superato lo screening di base vengono sottoposti, all'interno di una cantina sperimentale, a fermentazioni in condizioni enologiche e su mosto reale e confrontati con alcuni ceppi di lievito del commercio. Seppure condotte in volumi contenuti, queste prove danno la possibilità di ottenere vini reali, da poter analizzare chimicamente e soprattutto degustare insieme ai responsabili dell'Azienda.

Al termine di questa fasi si ottengono i ceppi aziendali, di cui l'azienda committente è esclusiva proprietaria e che vengono conservati presso ISVEA. (ISVEA srl, https://www.isvea.it/laboratorio-analisi/)

C. PROTOCOLLO SOCIETA' COMMERCIALE 2

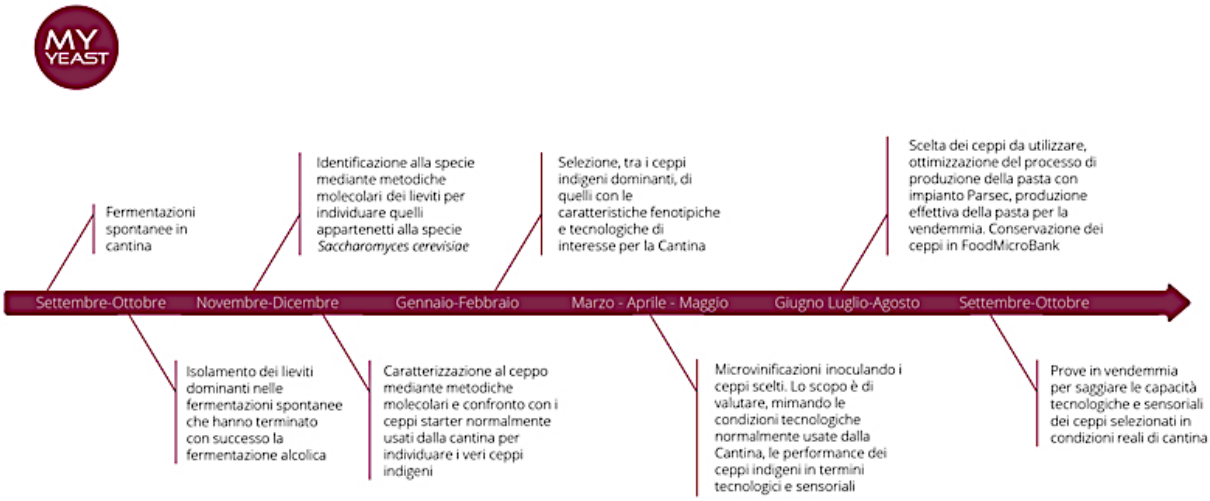

Figura 3. Diagramma del processo MyYeast, protocollo di selezione di lieviti aziendali messo a punto da Parsec srl in collaborazione con Università di Firenze e dello Spin Off Accademico Food Micro team

Anche nel protocollo (Figura 3) elaborato da una società con sede a Osmannoro Sesto F.no, (Firenze), il primo passaggio è l'isolamento, in corso di fermentazione spontanea, dei i ceppi presenti, la loro caratterizzazione genetica e la valutazione delle attitudini metaboliche e tecnologiche per escludere ceppi corrispondenti ai commerciali più diffusi eventualmente presenti nell'ambiente. I ceppi autoctoni della cantina che hanno dominato le fermentazioni spontanee dando prodotti di buona qualità vengono indirizzati allo step successivo, in cui vengono testate le caratteristiche tecnologiche e ricercato lo stile organolettico desiderato. La verifica delle prestazioni del ceppo o dei ceppi selezionati, in comparazione con i ceppi commerciali utilizzati dall'azienda, avviene nel corso della primavera successiva su mosto congelato stoccato dall'azienda committente, con la realizzazione di una serie di prove in piccolo presso una cantina sperimentale. I lieviti scelti e selezionati da un'azienda sono di suo uso esclusivo e vengono depositati in una ceppoteca che ne garantisce lo stoccaggio a -80°C, la conservazione e il mantenimento della purezza genetica e microbiologica. È da lì che sarà prelevato l'inoculo destinato alla produzione di lievito in pasta per ogni vendemmia (Parsec srl https://www.parsecsrl.net/selezionare-e-produrre-il-proprio-lievito-direttamente-in-cantina-si-puo-fare/)

D. PROTOCOLLO SOCIETA' COMMERCIALE 3

Rispetto ai protocolli presi in esame fino ad ora, quello messo a punto dalla terza azienda, con sede a Oderzo (Treviso), prevede una differenza sostanziale nella primissima fase. Infatti, questo protocollo prevede il campionamento in vigneto e non, come le precedenti, in fase di fermentazione. Le fasi successive rispecchiano grossomodo i protocolli già illustrati. (Bioenologia 2.0 https://www.bioenologia.com/lieviti-autoctoni)

4.2 Progetti attivati

I protocolli descritti nel paragrafo precedente sono il frutto di diversi progetti che hanno visto il coinvolgimento e la collaborazione di enti di ricerca pubblici e privati e società commerciali, con lo scopo di valorizzare la biodiversità microbica dei mosti legata al vigneto e alla cantina senza trascurare la sicurezza e il controllo delle fermentazioni. Ad esempio, l'azienda Parsec srl, in collaborazione con i ricercatori dell'Università di Firenze e dello Spin Off Accademico Food Micro team hanno sviluppato My Yeast, il processo descritto precedentemente e che comprende alcune fasi svolte direttamente in cantina, grazie alla tecnologia degli impianti Cellar Mate Plus My Yeast (Figura 4) e My Yeast Reactor. Questi impianti consentono la moltiplicazione della biomassa nelle condizioni fisiologiche più adatte a un avvio e a un decorso regolare e ottimale della fermentazione. L'impianto è semi-automatico e consente la produzione di lievito liquido o in pasta che, rispetto a quella del lievito secco attivo, risulta più semplice e meno costosa e oltre a permettere di moltiplicare qualsiasi ceppo, indipendentemente dalla sua sensibilità all'essiccazione e non espone le cellule a uno stress inutile. Il processo e il primo prototipo sono stati messi a punto qualche anno fa nell'ambito del progetto VICAStart (http://vicastart.it) progetto sotto misura 16.2 PSR 2014-2020 della Regione Toscana, al quale hanno partecipato la cantina VI.C.A.S., Viticoltori delle Colline Arno e Sieve, il Dipartimento GESAAF dell'Università di Firenze con il team di ricerca della sezione di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche e della sezione di Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi, Food MicroTeam srl e Parsec srl come partner tecnico. Il sistema di produzione garantisce una fermentazione regolare ed efficace, prima dell'inoculo la concentrazione del preparato si aggira attorno 1-2 milioni di cellule/ml; Cellar Mate Plus MyYeast ha un uso molto semplice in cantina, dopo la preparazione del mezzo e avvenuta l'aggiunta manuale dei lieviti la macchina gestirà tutte le operazioni come l'aggiunta di zuccheri e di nutrienti usando tempi e modalità opportune per i diversi ceppi di lievito, questa macchina consente anche la preparazione del Pied de cuve per aiutare il ievito ad entrare nelle

condizioni di fermentare (Parsec srl, https://www.parsecsrl.net/selezionare-e-produrre-il-proprio-lievito-direttamente-in-cantina-si-puo-fare/)

Figura 4. Cellar Mate Plus My Yeast

L'azienda Bioenologia 2.0, già Già a partire dalla vendemmia 2015 sono stati attivati diversi progetti che hanno visto coinvolte cantine e territori di varie regioni d'Italia: Veneto (uve Marzemino, Malbech, Merlot, Moscato Giallo, Cabernet, Glera, Pinot grigio, Lambrusco foglia tonda e Lambrusco a foglia frastagliata), Trentino Alto Adige (uve Solaris, Sauvignon, Moscato giallo, Moscato rosa e Pinot nero), Piemonte (uve Timorasso, Citronino), Marche (uve Passerina), Abruzzo (uve Passerina, Pecorino, Cococciola), Puglia (uve Fiano Minutolo), Sicilia (uve Nerello Mascalese, Nero d'Avola), Emilia Romagna (Malvasia, Bonarda, Barbera, San Giovese, Merlot e Petit Verdot) Toscana (Vermentino, Alicante, Viognier, Merlot e Sangiovese) Lazio (Malvasia di Candia, Malvasia puntinata).

in altri stati molto famosi per la produzione di vino sono state coinvolte in vari progetti per la selezione di lieviti indigeni per la produzione di starter. ad esempio c'è un progetto che è stato fatto nella penisola iberica che è andato a selezione sia ceppi di *Saccharomyces* che di non-*Saccharomyces.* Questo progetto punta a sviluppare degli starter personalizzati che si adeguino ad ogni zona in cui è stato svolto. Ad esempio nella DO Ribera del Guadiana sono stati selezionati dei ceppi di *Saccharomyces* molto interessanti, nella D.O.Ca. Rioja invece sono stati selezionati sia dei ceppi di *Saccharomyces* e di non-*Saccharomyces* che vengono utilizzati per deacetificare i mosti e i vini; inoltre vengon utilizzati sui mosti acidi; in questa zona i ceppi selezionati sono stati testati sia su vini bianchi che su vini rossi. Un altro studio ha preso parte nella zona del DOURO in Portogalli e

come nella D.O.Ca. Riojia sono stati selezionati sia ceppi di *Saccharomyces* che di non-*Saccharomyces* usati per la deacidificazione dei mosti e per ridurre l'acidità volatile nei vini. Questo programma ha toccato anche la zona di Madrid nella denominazione di origine Vinos de Madrid i lieviti selezionati in questa zona presentano alta resistenza all'etanolo e degli aromi fruttati. Questo progetto punta a fornire lieviti personalizzati alle cantine in cui è stato effettuato per migliorare gli armoni, la complessità e la stabilità dei vini. (Morata *et al.,* 2022)

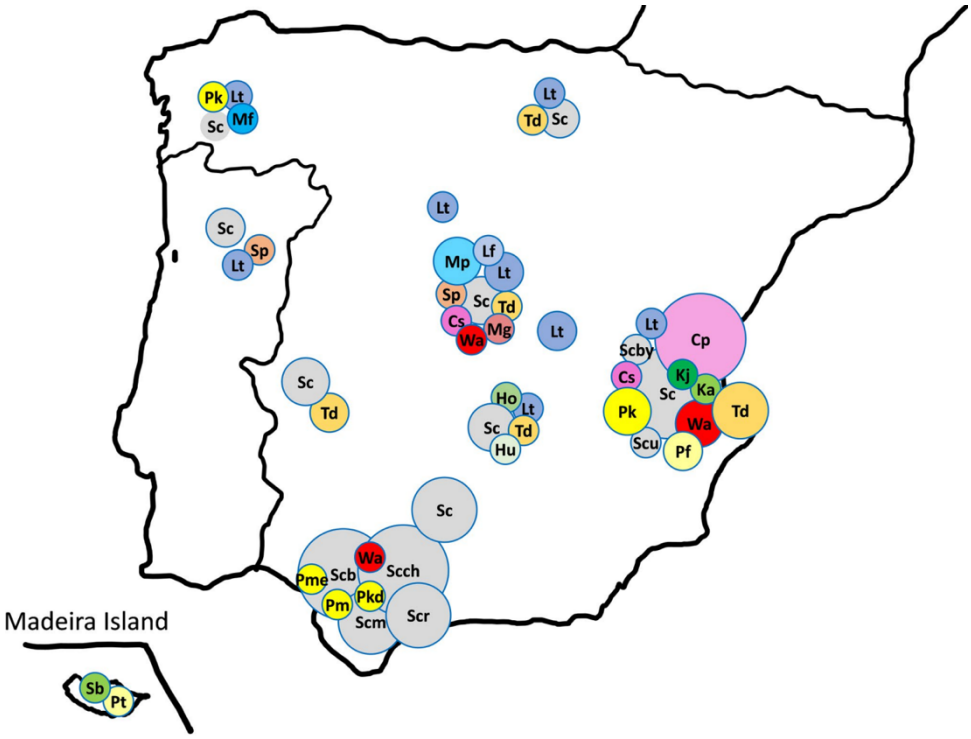

Grafico 2. Selezioni di ceppi di lievito in diverse regioni vinicole iberiche. L'area dei cerchi è proporzionale al numero di ceppi selezionati. Sc: Saccharomyces cerevisiae, Scby: Saccharomyces cerevisiae var. bayanus, Scb: Saccharomyces cerevisiae var beticus, Scm: Saccharomyces cerevisiae var montuliensis, Scch: Saccharomyces cerevisiae var cheresiensis, Scr: Saccharomyces cerevisiae var rouxii, Scu: Saccharomyces uvarum, Cp: Candida pulcherrima, Cs: Candida stellata, Ho: Hanseniaspora opuntiae, Hu: Hanseniaspora uvarum, Ka: Kloeckera apis, Kj: Kloeckera japonica, Lf: Lachancea fermentati, Lt: Lachancea thermotolerans, Mf: Metschnikowia fructicola, Mp: Metschnikowia pulcherrima, Mg: Meyerozyma guilliermondii, Pf: Pichia fermentans, Pk: Pichia kluyveri, Pkd: Pichia kudriavzevii, Pm: Pichia manshurica, Pme: Pichia membranaefaciens, Pt: Pichia terricola Sp: Schizosaccharomyces pombe, Sb: Starmerella bacillaris, Td: Torulaspora delbrueckii, Wa: Wickerhamomyces anomalus. (Morata et al., 2022)

5 Discussione e conclusioni

E' opinione comune che l'uso di lieviti selezionati stia omologando il vino e vi sia la necessità di un più forte legame con il territori di produzione. Molte delle colture *starter* disponibili in commercio sono descritte e promosse facendo riferimento alla zona geografica d'isolamento, suggerendo ai tecnici l'idea che sia possibile trasferire ai vini, i cui mosti fossero stati inoculati con tali colture, caratteristiche qualitative riconducibili dell'areale di origine. Tuttavia, questo approccio suscita dubbi perché non sempre le caratteristiche fisiologiche, ed in particolare la produzione di metaboliti secondari, sono facilmente monitorabili e, in ogni caso, il loro grado d'espressione dipende fortemente dal mosto in cui il lievito secco attivo si trova a fermentare (Guzzon *et al*., 2010). Le fermentazioni spontanee condotte da una popolazione mista sequenziale di lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* provenienti direttamente dall'ambiente circostante rispondo bene all'esigenza di valorizzare il terroir, tuttavia la sua evoluzione risulta imprevedibile. Quindi, negli ultimi anni i ricercatori e i produttori dell'ambito enologico stanno focalizzando sempre di più l'attenzione sulla ricerca di pratiche che possano essere, in un certo senso, il giusto compromesso tra le due strade. Una valida alternativa sembra essere la selezione dei lieviti aziendali. E' una pratica, ad oggi piuttosto diffusa e condotta da Università, centri di ricerca, laboratori di consulenza enologica, compagnie produttrici di lieviti enologici, che consiste nel prelievo di lieviti dal vigneto, dalle attrezzature di cantina o direttamente durante la fermentazione, l'isolamento di questi ceppi, l'identificazione e la prova di fermentazione su mosti sintetici e su mosti naturali per verificarne le caratteristiche e procedere con la produzione di *starter* unici da azienda ad azienda. Questa pratica apporta numerosi vantaggi quali il conferimento di unicità al prodotto in quanto la popolazione di lieviti è propria dell'azienda produttrice e quindi impossibile da riprodurre. L'uso di questi lieviti aumenta la correlazione tra le caratteristiche del vino e del territorio, beneficiando però dei vantaggi sia della diversità tra i generi che della selezione. Viene sì standardizzata la produzione ma non in modo negativo rischiando di avere un vino molto simile a quello delle cantine nelle zone limitrofe, ma bensì, avendo un vino unico. La selezione non può comunque prescindere dalla ricerca di ceppi che dimostrano le migliori attitudini fermentative e questi risultano appartenere, nella maggior parte dei casi, alla specie *S. cerevisie*, il lievito vinario per eccellenza. Tuttavia, nella selezione dei lieviti aziendali vengono esclusi tutti i ceppi più diffusi e commercializzati come *starter* e vengono scelti e portati avanti i ceppi più rappresentativi di ogni diversa azienda (Guzzon et al., 2020, Guzzon *et al.,* 2011)

Ragionando in termini di sostenibilità economica, la selezione dei lieviti aziendali può essere svolta, attualmente in tempi e con costi limitati grazie all' sviluppo che alcune tecniche hanno avuto negli ultimi anni: l'identificazione genetica non è più appannaggio esclusivo dei grandi centri di ricerca; l'ecologia delle popolazioni durante la fermentazione alcolica è ormai approfonditamente conosciuta e permette di sapere come e quando prelevare i campioni di mosto per avere buone probabilità di isolare i ceppi migliori; le migliori conoscenze delle esigenze nutrizionali del lievito e dell'influenza delle condizioni di fermentazione consentono oggi di mettere in opera protocolli di screening molto più veloci, efficienti e sicuri che nel passato; la disponibilità di metodiche di analisi sensoriali codificate ed utilizzabili per la caratterizzazione contemporanea di un numero elevato di campioni, permette oggi di effettuare le valutazioni di screening in modo più oggettivo e veloce (Ferrari, ISVEA srl). Questi avanzamenti hanno permesso di mettere a disposizione anche di piccole cantine strumenti che fino ad ieri erano ad esclusivo appannaggio di realtà economicamentepiù forti (Guzzon *et al*., 2011).

6 Bibliografia

Francesca Comitini, Angela Capece, Maurizio Ciani e Patrizia Romano, 2017, New insights on the use of wine yeasts, www.sciencedirect.com

Guzzon R., Facchinelli G., Malacarne M., Larcher R., Nicolini G., 2011. Selezione di lieviti aziendali per il mantenimento della biodiversità naturale. L'enologo, p. 89-94.

Guzzon R., Nicolini G., Nardin T., Larcher R., Malacarne M., 2010. Qualità microbiologica e prestazioni enologiche di starter per la fermentazione alcolica. L'enologo, p. 87-92.

R. Guzzon, 21/10/2020, Selezione lieviti aziendali: protocollo per evitare errori, Vite&vino n.5/2020

A. Morata, T. Arroyo, M. A. Bañuelos, P. Blanco, A. Briones, J. M. Cantoral, D. Castrillo, G. Cordero-Bueso, J. M. del Fresno, C. Escott, R. Escribano-Viana, M. Fernández-González, S. Ferrer, M. García, C. González, A. R. Gutiérrez, I. Loira, M. Malfeito-Ferreira, A. Martínez, I. Pardo, M. Ramírez, M. Ruiz-Muñoz, P. Santamaría, J. A. Suárez-Lepe, A. Vilela & V. Capozzi, 10/06/2022, Wine yeast selection in the Iberian Peninsula: *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* as drivers of innovation in Spanish and Portuguese wine industries, tandfonline.

Parsec, 02/03, Selezionare e produrre il proprio lievito direttamente in cantina: si può fare, *parsecsrl*.

Suzzi G. Tofalo R. settembre 2018, *Microbiologia enologica,* 2^ edizione, edagricole, Bologna, p. 101-116

Stefano Ferrari, ISEVA, Lieviti autoctoni: obiettivi del loro impiego, metodi di isolamento e selezione, *iseva.*