



REGIONE CAMPANIA

Assessorato Agricoltura



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO
DIP. SAF

I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.: la tipicità attraverso le biotecnologie

I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.: la tipicità attraverso le biotecnologie



A cura di:
Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca



Assessorato Agricoltura



I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.:

la tipicità attraverso le biotecnologie

a cura di
Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca

Studio realizzato nell'ambito del progetto: "Miglioramento Qualitativo dei vini Campani – selezione di ceppi autoctoni di lieviti vinari e loro utilizzo in microvinificazioni di uve "Fiano" in provincia di Avellino, finanziato dall'Assessorato Agricoltura della Regione Campania:

Coordinamento Assessorato all'Agricoltura:

- Dott.ssa Maria Passari - Dirigente SeSIRCA
- Dott. Alfonso Tartaglia - Dirigente Stapa-Cepica di Avellino
- Funzionario STAPA-CePICA di Avellino: dott. Luca Branca
- Dott. Luciano D'Aponte - Responsabile Viticoltura SeSIRCA
- Funzionari SeSIRCA: Antonio Capuano, Andrea Moro

Disegni:

Gianni Gentile - gianni_gentile@alice.it

Progetto grafico e layout:

Emanuele Pistola - emanuele@graphicartweb.it

Revisione del testo:

Gerardo Perrotta - info@sulromanzo.it

Stampa:

Imago Editrice s.r.l. - www.imagoedipack.it

Copyright © 2013

1ª edizione: anno 2013

Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte di questa pubblicazione può essere riprodotta, archiviata, memorizzata o trasmessa in qualsiasi forma o mezzo elettronico, meccanico, repertografico, digitale, se non nei termini previsti dalla legge che tutela il Diritto d'Autore.

La stampa è stata realizzata nell'ambito delle attività di informazione previste dalla misura 111 del PSR Campania 2007/2013



ISBN: 978-88-95230-20-7



Indice

	pag.
Presentazione Daniela Nugnes	5
1. La microbiologia fra tradizione e innovazione Alfonso Tartaglia e Luca Branca	7
2. I microrganismi: protagonisti invisibili dell'enologia nel mondo antico Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni	13
3. Il vino e la fermentazione alcolica Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Raimondo Gaglio	21
3.1. Cenni storici sulla fermentazione alcolica	24
3.2. Biochimismo della fermentazione alcolica	25
4. I lieviti vinari: tassonomia e fattori di crescita Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni	29
4.1. I lieviti del genere <i>Saccharomyces</i>	33
4.2. I lieviti apiculati	36
5. Fermentazione spontanea e fermentazione in purezza Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni	41
6. Lievito autoctono o lievito commerciale? Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni	47
6.1. Lieviti autoctoni, selezionati	53
6.1.1. Criteri di selezione di uno starter autoctono	53
7. A ciascuna cantina il proprio lievito autoctono Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni	59





8. Lavoro sperimentale: fasi per l'ottenimento di uno starter autoctono per il vino Fiano di Avellino D.O.C.G.	63
Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca, Ciro Sannino, Luca Settanni, Raffaele Romano e Laura Le Grottaglie	
8.1. Campionamento dei grappoli ed acini d'uva Fiano di Avellino	66
8.2. Allestimento delle microfermentazioni spontanee	69
8.3. Conta ed isolamento dei lieviti	70
8.4. Identificazione fenotipica e molecolare dei lieviti	72
8.5. Tipizzazione degli isolati appartenenti alla specie <i>S. cerevisiae</i>	75
8.6. Screening tecnologico dei ceppi di <i>S. cerevisiae</i>	79
8.7. Test di microfermentazione e saggi enzimatici	81
8.8. Vinificazioni sperimentali su scala aziendale di uve Fiano di Avellino con il lievito autoctono STAPA-CEPICA/1	85
8.8.1. Analisi sensoriale dei vini sperimentali Fiano di Avellino	90
8.9. Promozione e diffusione aziendale del ceppo STAPA-CEPICA/1 nell'areale di produzione del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.	91
9. Conclusioni	97
Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca	



Presentazione

Com'è noto, per ottenere un buon vino è necessaria una buona fermentazione. L'esito di una buona fermentazione è determinato dalle specie di lieviti naturalmente presenti nel mosto o opportunamente inoculati. I lieviti, infatti, sono responsabili della trasformazione del mosto in vino. Un processo complesso e, per anni, misterioso. È evidente, dunque, l'importanza di questi microrganismi unicellulari nel processo di vinificazione.

Nelle cantine in cui vi è una produzione su larga scala, dove sono essenziali una fermentazione rapida e una qualità costante del prodotto, è normalmente preferito l'utilizzo di lieviti commerciali: solo pochissime cantine si assumono il rischio di una fermentazione spontanea.

Rafforzare le note comuni fra vini appartenenti allo stesso areale viticolo, attraverso caratteri non solo varietali ma anche microbiologici, può rappresentare un vantaggio per i vini a denominazione d'origine. Un vantaggio, soprattutto, in termini di riconoscibilità sul mercato.

Questo lavoro tecnico-scientifico è, quindi, dedicato proprio ai lieviti, con particolare riferimento ai lieviti autoctoni selezionati per il Fiano di Avellino Dop e vuole diventare un contributo autorevole volto alla conoscenza di questa branca dell'enologia così importante e significativa per l'ottenimento di una migliore qualità delle produzioni.

Non risulterà superfluo ricordare in tale contesto, che le tradizioni enoiche della Campania affondano radici in epoche lontanissime: negli affreschi di Ercolano e Pompei Bacco trova dimora ai piedi del Vesuvio. In realtà, già allora era tale l'abbondanza di vitigni autoctoni che i romani elessero queste terre a vigneto dell'impero.

Si comprende, quindi, come il vino sia divenuto elemento imprescindibile della cultura e delle tradizioni di un popolo e di una terra caratterizzata, in gran parte, da suoli vulcanici e condizioni microclimatiche esclusive.



Rossi generosi, bianchi raffinati: la vitienologia moderna campana ha fatto passi importanti in termini di qualità e, quindi, di competitività, grazie anche ai numerosi contributi scientifici curati da appassionati cattedratici del mondo universitario non solo campano. Con questo volume la letteratura in materia di enologia si arricchisce ulteriormente.

Sono convinta, infatti, che questo prezioso lavoro, curato dai professori Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca dell'Università degli Studi di Palermo, rappresenti - per gli "addetti ai lavori" - un momento conoscitivo e di approfondimento importante nel quadro di una complessiva politica di valorizzazione della filiera vitivinicola. Una filiera strategica e che realmente può incidere sulle economie locali.

on. Daniela Nuges
*Consigliere delegato all'Agricoltura
del Presidente della Giunta Regionale della Campania*





Capitolo 1

La microbiologia fra tradizione e innovazione



La microbiologia alimentare come strumento di valorizzazione delle produzioni tipiche e tradizionali.







1. La microbiologia fra tradizione e innovazione

Alfonso Tartaglia e Luca Branca
Dirigenti STAPA-cePICA di Avellino

Negli ultimi anni, si è assistito all'intensificarsi della richiesta di prodotti alimentari tradizionali, accompagnata da un'accentuata contraddizione nei consumi: se, da un lato, l'innovazione tecnologica ha permesso la produzione di alimenti sicuri e dotati di *shelf-life* molto lunghe, dall'altro, la sempre maggiore affermazione del *green consumerism* ha determinato una grande riscoperta dei prodotti tradizionali e tipici. In questo contesto, grazie anche alle politiche alimentari intraprese a tutela delle piccole produzioni, il consumatore sta diventando più sensibile ai cibi processati in maniera tradizionale, la cui valorizzazione è sostenuta da una forte immagine di naturalezza.

Con l'avvento del turismo enogastronomico, si è consolidata l'abitudine di consumare prodotti locali, anche se, spesso, i prodotti di nicchia, tipici di una ristretta area geografica, stimolano l'interesse anche di consumatori che vivono in aree geografiche distanti da quelle di produzione, incoraggiando un aumento dei volumi delle produzioni. Tuttavia, gli alimenti tipici privi di un marchio di tutela, ottenuti, quindi, senza un vero disciplinare di trasformazione vincolante per i produttori, sono facilmente soggetti a variazioni del sistema produttivo. I prodotti con marchi di tutela, soprattutto D.O.P. (Denominazione di Origine Protetta) e D.O.C.G. (Denominazione di Origine Controllata e Garantita), invece, sono ben caratterizzati rispetto all'origine e alla qualità delle materie prime, la tecnologia di trasformazione applicata, l'ambiente e le attrezzature di produzione e tutti quei fattori che legano la qualità del prodotto finito al pieno rispetto del disciplinare di produzione. I microrganismi caratteristici di un prodotto tipico fermentato come il vino, dai quali dipendono molte delle proprietà organolettiche, riflettono, in molti casi, le caratteristiche dell'ambiente e dei sistemi di produzione. Infatti, i prodotti alimentari di nicchia legano la loro storia alla zona di produzione non solo per le tradizioni che si tramandano nel tempo, ma anche e soprattutto per la presenza di specie e ceppi di micror-



ganismi che colonizzano la materia prima, nonché gli ambienti e le attrezzature di lavorazione, contribuendo in maniera decisiva a caratterizzare la tipicità del prodotto finale.

Negli ultimi venti o trent'anni, i nuovi criteri produttivi, atti a soddisfare maggiori volumi di richieste, hanno comportato, in molti casi, modificazioni anche profonde del rapporto tra ambiente di produzione e caratteristiche del prodotto. Il passaggio, in tutta la filiera agro-alimentare, da lavorazioni di tipo essenzialmente artigianale a lavorazioni che prevedono differenti livelli di automazione del processo ha indubbiamente inciso, sebbene in modo variabile, sui diversi prodotti, modificando, in alcuni casi, quei caratteristici legami con il territorio che erano più facilmente rintracciabili nelle produzioni artigianali.

Nello spirito delle "Denominazioni d'Origine", particolare importanza deve essere ancora attribuita a tutti quegli elementi che creano il "legame" tra un determinato prodotto e una particolare zona geografica, la cultura della popolazione e tutti quegli aspetti che possono essere sintetizzati nell'insieme dei fattori storico-sociali nei quali risiedono i motivi dello sviluppo di un prodotto in una data area antropizzata. I microrganismi rientrano sicuramente tra questi fattori e costituiscono, anzi, uno dei "segreti" dei produttori artigianali che, nel tempo, sono stati svelati e convertiti in moderna tecnologia di trasformazione. Allo stesso modo, però, non si può negare l'influenza dell'innovazione nell'evoluzione di questi prodotti di pregio. L'evoluzione tecnologica ha accompagnato da sempre lo sviluppo dei prodotti con marchi di tutela che non possono restare immutati nel tempo all'interno di uno scenario ecologico, ambientale, tecnico e sociale che, invece, muta continuamente. L'agricoltura di oggi non è più l'agricoltura dell'inizio del Novecento: materia prima e prodotti non possono essere rimasti indenni a tali cambiamenti.

Quella che oggi chiamiamo tradizione comprende l'innovazione del passato e l'innovazione di oggi sarà probabilmente tradizione nel futuro prossimo.

La necessità di raggiungere mercati sempre più lontani, economicamente rilevanti per la sopravvivenza di alcune produzioni tradizionali e con marchi di tutela, ci impone di sviluppare nuovi criteri produttivi.

Anche l'impiego di ceppi "autoctoni", selezionati durante la trasformazione di prodotti tradizionali e legati allo sviluppo di componenti aromatiche desiderate, al prolungamento della shelf-life, agli aspetti salutistici dei prodotti finiti e così via, può richiedere l'adattamento di protocolli produttivi già esistenti per migliorare le performance del(i) microrganismo(i). Tuttavia, tale innovazione non può essere "selvaggia", bensì dovrebbe essere rispettosa degli aspetti essenziali e peculiari della tradizione di un prodotto. Il riferimento alla zona di produzione



deve essere considerato un aspetto culturale di legame con la tradizione locale, ma anche di garanzia di rispetto delle regole produttive dei disciplinari. In questo modo, è anche possibile offrire informazioni trasparenti e garanzie al consumatore sulla reale origine di un prodotto e sui metodi di produzione.

Per tutelare il patrimonio dei nostri prodotti con marchi di tutela, per contribuire alla loro affermazione nei mercati internazionali e per conquistare e mantenere la fiducia dei consumatori occorre accettare un'innovazione progettata e attuata in modo da non compromettere il legame con la tradizione, che, per molti consumatori, rappresenta un vero e proprio stile di vita.







Capitolo 2

I microrganismi: protagonisti invisibili dell'enologia nel mondo antico



«...Ma quando per difetto, o della contrada, o delle vigne novelle, sarà debile il mosto, si dovrà scegliere una parte...che dia il vino più prelibato, e che insieme sia la più vecchia e niente umidiccia... ed in un giorno asciutto e sereno correremo le uve più mature che mai...» (Lucio Giunio Moderato Columella)







2. I microrganismi: protagonisti invisibili dell'enologia nel mondo antico

Tratto da: Nicola Francesca e Giancarlo Moschetti in *Ager Pompeianus et Ager Stabianus - L'agricoltura tra ieri e oggi*, Istituto per la Diffusione delle Scienze Naturali, in press.

Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca

Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Nel passato, produrre e consumare vino significava occuparsi di un alimento la cui qualità dipendeva da numerosi fattori, che andavano dalla gestione del vigneto alle tecniche di conservazione del prodotto finito. Nei secoli, l'attenzione per la produzione di materie prime di qualità, ovvero uve sane e mature, è risultata poco costante e, spesso, è stata subordinata ad una variabile di tipo economico, connessa al valore e al peso ricoperti dal vino sul mercato.

Va detto, però, che l'enologia, nell'antichità, non ha prediletto sempre ed esclusivamente la quantità. Quando i Romani iniziarono ad abbandonare l'agricoltura basata essenzialmente sui cereali, orientandosi verso un intenso commercio del vino (circa 200 a.C.), il quadro produttivo cambiò radicalmente. In alcuni territori, si raggiungevano livelli di specializzazione viticola abbastanza elevati e le produzioni agricole erano interamente orientate al settore enologico. Ecco, quindi, che la corretta gestione del vigneto iniziava a restituire uve in buono stato fitosanitario e, di conseguenza, vini di qualità.

«...Ma quando per difetto, o della contrada, o delle vigne novelle, sarà debile il mosto, si dovrà scegliere una parte, se si può averla, di vigna Aminea, o altrimenti, che dia il vino più prelibato, e che insieme sia la più vecchia e niente umidiccia...ed in un giorno asciutto e sereno corremo le uve più mature che mai...» (Lucio Giunio Moderato Columella, *L'agricoltura*, traduzione di Benedetto Del Bene, 1808).

Le operazioni in vigna a sostegno della qualità erano eseguite anche attraverso specifici trattamenti fitosanitari, la cui composizione chimica ricorda molto l'attuale poltiglia bordolese, particolarmente usata in agricoltura biologica.

Le pratiche agricole messe in atto nel passato erano caratterizzate sicuramente da un basso impatto ambientale e seguivano i principi che sono stati recepiti



interamente dall'agricoltura biologica. Grazie al minore grado di inquinamento, la biodiversità vegetale, animale (microfauna) e microbica risultava senza dubbio meno alterata. Il mantenimento dei delicati equilibri fra i microrganismi e i fattori ambientali può essere, infatti, determinante per garantire un adeguato stato fitosanitario delle uve.

Inoltre, tali equilibri risultano essenziali ai fini di un corretto processo fermentativo, soprattutto se quest'ultimo si realizza grazie ai microrganismi "autoctoni" presenti naturalmente sulle uve e nei mosti. Sostanzialmente, i microrganismi che si sviluppano nel mosto e nel vino provengono dalle uve (fermentazioni spontanee) o sono inoculati dall'uomo (fermentazione guidata) sotto forma di lieviti selezionati commerciali (starter).

Ovviamente, l'enologia del mondo antico non prevedeva il ricorso a lieviti commerciali, ma, per la trasformazione del mosto in vino, faceva sempre ricorso alla fermentazione spontanea ad opera di lieviti "indigeni", cioè presenti naturalmente sulle uve.

In generale, per fermentazione alcolica s'intende il processo di trasformazione degli zuccheri in alcol (etanolo), anidride carbonica e numerosi altri prodotti secondari.

Diverse variabili, come le condizioni climatiche, l'età dei vigneti e le pratiche enologiche, influenzano fortemente la composizione della microflora dei mosti e, conseguentemente, la qualità dei vini ottenuti (Regueiro et al., 1993; Santamaria et al., 2005; Zott et al., 2008). Oggi, come nel passato, la rapidità con cui il processo fermentativo viene avviato, la regolarità del suo andamento e il suo completamento sono influenzati dalle popolazioni di lieviti presenti nel mosto (Zambonelli, 1998). Inoltre, le attività metaboliche dei lieviti, come la produzione di alcuni composti o la trasformazione di specifiche componenti del mosto o del vino, possono contribuire in maniera significativa alla definizione dell'aroma e delle caratteristiche del flavour del prodotto finito (Pretorius, 2000).

Dunque, è chiaro che, nell'enologia dell'antichità, in cui solo la fermentazione spontanea consentiva la produzione dei vini, gli equilibri che regolavano la biodiversità nella vigna, o più in generale, nell'ambiente, esercitavano un peso rilevante sulla qualità finale del prodotto. Paradossalmente, una tecnologia a bassissimo impatto ambientale, come quella del passato, ma, soprattutto, l'assenza di trattamenti fitosanitari "invasivi" e il non impiego di coadiuvanti (additivi) chimici per la fermentazione e la stabilizzazione dei vini garantivano, allora più di oggi, la possibilità di un'ampia ed equilibrata biodiversità microbica in vigna e, forse, una maggiore "stabilità" delle stesse fermentazioni spontanee.

Sulla base di queste considerazioni, potremmo definire l'agricoltura del passato come un'agricoltura "biodinamica" *ante litteram* più che biologica. L'agricoltura biodinamica è, infatti, un particolare tipo di coltivazione biologica che enfatizza le relazioni tra suolo, piante ed animali in un sistema di auto-sussistenza senza *input* esterni (Lorand, 1996) ed esclude o almeno minimizza l'uso di sostanze chimiche come fertilizzanti, pesticidi, anidride solforosa e acido sorbico (Regolamento CE 2007).

L'uso di colture microbiche commerciali è evitato, al fine di permettere ai lieviti e ai batteri lattici indigeni di guidare rispettivamente la fermentazione alcolica e malo-lattica (trasformazione dell'acido malico in acido lattico, che genera un "ammorbidimento" dei vini). Numerose ricerche hanno dimostrato che la stabilità dell'agro-ecosistema dipende dalla diversificazione vegetale, la quale favorisce un aumento della biodiversità (microfauna) e della capacità del vigneto di "autoregolarsi" (Andow, 1991; Van Emden, 1990; Landis, 2000), comportando una riduzione degli attacchi di insetti e microrganismi nocivi per la vite. Di sicuro, i viticoltori del passato non erano a conoscenza di tali equilibri, ma, probabilmente, ne traevano vantaggi in modo inconsapevole, grazie ad un'agricoltura che, di per sé, era più sensibile all'ambiente e implicitamente "sostenibile". Considerati i presenti livelli d'inquinamento "poco sostenibili", di sicuro appare possibile parlare di viticoltura e vini "biologici e biodinamici" più riferendosi al passato che all'oggi. Attualmente, esiste, infatti, un chiaro ritorno al passato, considerata la forte attenzione all'"agro-ecologia", i cui interventi garantiscono un impatto positivo sotto vari punti di vista e a diversi livelli, in riferimento al campo (riduzione del numero dell'intensità e frequenza delle lavorazioni), all'azienda nel suo complesso (gestione delle aree di compensazione ecologica) e al paesaggio (diversificazione vegetale anche delle aree non coltivate).

La moderna enologia spesso etichetta impropriamente numerose tipologie di vini come "naturali", come se fossero state ottenute attraverso una rigida agricoltura e vinificazione biologica/biodinamica. In molti casi, tutto ciò risponde solo a logiche commerciali ed è ben lontano da un'attenta e severa applicazione delle norme e procedure di agricoltura biologica, specialmente se si prende in considerazione la realtà produttiva della maggior parte dei viticoltori che dedicano all'agricoltura biologica o biodinamica solo una parte ridotta dei propri appezzamenti, la maggior parte dei quali continua ad essere coltivata seguendo metodi convenzionali. Questa soluzione comporta un'accentuata limitazione degli effetti benefici derivabili dall'adozione di pratiche di agricoltura biologica o biodinamica.



La sensibilità dei Romani verso la selezione dei vini, invece, si è sviluppata di pari passo con la capacità di elaborare vini molto diversi fra loro, sia per modalità di trattamento delle uve (vini da uve appassite) sia per modalità di conservazione mediante complesse addizioni (concia dei vini). Oltre alla concia, i prodotti dell'enologia del passato si diversificavano grazie alla manipolazione, anche se inconsapevole, dei lieviti e dei batteri naturalmente presenti nei mosti e nei vini:

«per conservar il mosto dolce» Columella consigliava di trasferire il mosto appena ottenuto in "fiasco nuovo" e "poscia in una peschiera d'acqua fredda e dolce affonda tutto il fiasco per modo, che nessuna parte ne sporga indi, passati quaranta giorni, tranello fuori. Così per anno resterà il mosto dolce» (Columella, op. cit.).

Il raffreddamento del mosto è in grado di rallentare lo sviluppo di lieviti e batteri (almeno le specie mesofile, comunemente presenti nel mosto) e, quindi, rallentare o bloccare la fermentazione alcolica, ovvero impedire la completa trasformazione degli zuccheri in alcol. Il mosto, dunque, risultava a lungo ricco di zuccheri e, quindi, dolce. D'altra parte, è difficile pensare che il mosto conservi tale proprietà per tempi molto lunghi, soprattutto dopo un travaso, che comporta inevitabilmente un aumento della temperatura di conservazione. La qualità del vino è sempre stata strettamente legata al rispetto delle condizioni igieniche in cantina. Sin dai tempi dei Romani, infatti, era molto radicata l'attenzione verso quella che potremmo definire una "arcaica gestione della corretta prassi igienica" in cantina. Esistevano una fase di preparazione del luogo destinato alla vinificazione e una fase di pulizia degli attrezzi impiegati per la lavorazione del mosto e del vino. La sanitizzazione dei vasi vinari, il lavaggio delle attrezzature nonché la rimozione di qualsiasi fonte di sporcizia erano operazioni eseguite scrupolosamente prima della vinificazione:

«i tini da vino e da torchio, e le bigonce e i vasi tutti, se il mare è d'appresso, con acqua marina, o altrimenti con acqua dolce, si deggion lavare e nettare, ed asciugare diligentemente, sicché non abbiano umidità. Vuolsi altresì sgombrar la cantina d'ogni immondizia» (Columella, op. cit.).

In ogni caso, sia che si parli di qualità igienica che di conservazione dei vini, il ruolo dei microrganismi, in particolare dei lieviti, non è da sottovalutare nell'enologia del passato, in quanto essa era basata esclusivamente su fermenta-



zioni spontanee. Questi microrganismi, infatti, sono presenti sulle uve, ma, durante la fase di vinificazione, sono in grado di contaminare l'intero ambiente di lavorazione, incluse le attrezzature e gli operatori. È possibile, quindi, parlare di microrganismi indigeni adattati all'ambiente di cantina e, perciò, in grado di colonizzare spontaneamente il mosto e accompagnare i processi fermentativi. Anche nell'antica Roma specifici locali venivano adibiti alla trasformazione e alla conservazione dei vini e, quindi, è ipotizzabile che esistessero ceppi di lieviti, adattati negli anni a specifici ambienti di lavorazione, in grado influenzare la qualità del prodotto finito.

In ogni caso, non è da escludere che molte delle zone viticole del passato siano state associate alla produzione di vini di elevata qualità grazie alla proliferazione di lieviti indigeni selezionati naturalmente in vigna piuttosto che in cantina.

Con la moderna enologia, si è passati ad un uso massiccio dei lieviti selezionati perché in grado di garantire un processo fermentativo controllato, causando, però, un'elevata standardizzazione dei prodotti legata al limitato numero di ceppi presenti in commercio (Valero et al., 2005).

Probabilmente, ad oggi, un uso spregiudicato di cultivar alloctone impiantate nelle regioni viticole più svariate, così come un utilizzo del tutto incontrollato di starter commerciali, sta deformando l'espressione "territoriale" di molti vini. Le attuali strategie di mercato obbligano i produttori ad orientare la qualità dei vini verso un gusto decisamente "internazionale" in grado di soddisfare un'ampia platea di consumatori.

La moderna enologia, forse, non ha bisogno di attingere alle conoscenze sviluppate nel passato, ma di sicuro avrebbe bisogno di ristabilire un legame più chiaro fra vini e territorio a tutela delle proprie origini.

Bibliografia

Andow, D.A.. Vegetation diversity and arthropod population response. *Annual Review of Entomology*. 36, 561-586, 1991.

Columella, Lucio Giunio Moderato. *L'agricoltura di Lucio Giunio Moderato Columella volgarizzata da Benedetto del Bene*. Giovanni Gambaretti. Verona, 1808.

Landis D.A., Wratten S.D., Gurr S.M.. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology*. 45, 175-201, 2000.

Lorand A.C.. *A Paradigmatic Analysis. Biodynamic Agriculture* Pennsylvania State University, Department of Agricultural and Extension Education. PhD Dissertation, 1996.

Pretorius I.S.. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16, 675-729, 2000.

Regueiro L.A., Costas C.L., Rubio J.E.L.. Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44, 405-408, 1993.

Santamaria P., Garijo P., Lopez R., Tenorio C., Gutierrez A.R.. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*. 103, 49-56, 2005.

Valero E., Schuller D., Cambon B., Casal M., Dequin S.. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Research*. 5, 959-969, 2005.

Van Hemdem H.F.. Plant diversity and natural enemy efficiency in agroecosystems. In: *Critical issues in Biological Control*, Intercept Ltd, 63-80, 1990.

Vincenzini M., Romano P., Farris G.A.. *Microbiologia del vino*. Casa Editrice Ambrosiana. Milano, 2005.

Zambonelli C. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole-Edizioni Agricole, 1998.

Zott K., Miot-Sertier C., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Masneuf-Pomarede I.. Dynamics and diversity of non *Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 197-203, 2008.



Capitolo 3

Il vino e la fermentazione alcolica



Storia e biochimismo della fermentazione alcolica







3. Il vino e la fermentazione alcolica

Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Raimondo Gaglio
Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Il consumo di bevande alcoliche ha da sempre accompagnato la storia dell'uomo, riscontrandosi in tutte le civiltà, dalle meno evolute a quelle più progredite. Le scoperte scientifiche del XV secolo hanno messo in luce come tutti i popoli abbiano ampiamente sfruttato il fenomeno della fermentazione di cereali per produrre bevande. Lo stesso vino, inoltre, aveva assunto fin dai tempi più antichi un valore liturgico presso tutte le civiltà che si erano affacciate al Mediterraneo. Anche oggi, e in misura maggiore rispetto al passato, si fa largo uso di bevande alcoliche ottenute sia da fermentazione che da distillazione di liquidi zuccherini. Le bevande alcoliche fermentate sono caratterizzate dalla presenza di concentrazioni variabili di alcol, ottenute da frutta, semi di cereali e tuberi, mediante la fermentazione di soluzioni zuccherine. Nelle bevande alcoliche fermentate, la presenza di alcol etilico è dovuta ad un processo naturale denominato "fermentazione alcolica", operato da lieviti, mediante il quale le sostanze zuccherine si trasformano in alcol etilico e anidride carbonica. Per la legislazione italiana (D.P.R. n. 162), può essere denominato "vino" esclusivamente il prodotto ottenuto attraverso la fermentazione alcolica spontanea, totale o parziale, dell'uva fresca, dell'uva ammostata o del mosto d'uva con gradazione alcolica non inferiore ai tre quinti della gradazione complessiva. Pertanto, con il termine "vino" si indica il prodotto finale di una lunga catena biotecnologica articolata nelle fasi di preparazione del mosto, di fermentazione, di maturazione e di invecchiamento. Ciascuna delle fasi appena menzionate investe fenomeni chimici, chimico-fisici e biologici che si cerca di regolare con tecniche atte a conservare i caratteri della materia prima e a migliorare la qualità dei vini che ne derivano, anche in considerazione della crescente domanda e del maggiore interesse dei consumatori per un vino di qualità. Sicuramente, la svolta microbiologica ha rappresentato una delle innovazioni tecniche più importanti nella storia dell'enologia, insieme alle osservazioni sugli effetti dell'ossigeno, sui costituenti fenolici e





dell'aroma, grazie alla capacità di incidere sul processo di fermentazione. I principali agenti responsabili della fermentazione alcolica sono i lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* (in particolare *Saccharomyces cerevisiae*), mentre i batteri lattici sono determinanti per la fermentazione malolattica. Tali microrganismi guidano la vinificazione del succo d'uva e, per questa ragione, osservare e comprendere il loro comportamento in ambiente enologico è di elevata importanza per l'ottenimento di prodotti finiti con caratteristiche organolettiche ottimali. Le interazioni microbiche, infatti, sono di notevole rilevanza in quanto lo sviluppo di microrganismi indesiderati può generare alterazioni e difetti di natura organolettica.

3.1. Cenni storici sulla fermentazione alcolica

Il termine fermentazione (dal latino *fervere*, bollire), nel senso più ristretto, preferito dai biochimici, è riservato ai processi metabolici ossidoriduttivi nei quali tanto i donatori che gli accettori di elettroni sono composti organici. In senso lato, e nell'accezione più comune, per fermentazione, s'intende un qualunque processo tecnologico che sfrutti le molteplici attività enzimatiche dei microrganismi per la produzione di metaboliti utili all'uomo, a partire da sostanze organiche di varia natura (Sciancalepore, 1998).

Numerosi studi scientifici, sostenuti da altrettante osservazioni sul campo, hanno permesso di giungere all'attuale livello di conoscenze relative alla fermentazione alcolica. Tralasciando quanto fu detto e scritto prima del 1600, va ricordato anzitutto il nome di Van Helmont, un attento studioso della prima metà del secolo XVII, che, in uno scritto pubblicato postumo nel 1648, considerò i processi fermentativi come trasformazioni di natura chimica provocati da "fermenti" di non ben definita natura. Il suo merito consiste soprattutto nell'aver dimostrato che nella formazione del vino è prodotto un gas da lui definito *gas vinorum*, riconosciuto, più tardi, come anidride carbonica da Wren e Mac Bride. Nella seconda metà del secolo XVII, grazie al microscopio, vennero osservate e descritte le cellule di lievito presenti nel mosto in fermentazione. Il merito di avere osservato, per la prima volta, i "fermenti" nel mosto fermentato con un rudimentale microscopio, capace di un ingrandimento di 150 volte, spetta all'olandese Antoni van Leeuwenhoek (1685), che li chiamò "animalicula". Questa scoperta, però, non fu sufficientemente apprezzata dalla comunità scientifica e fu, pertanto, archiviata come di scarsa importanza. Infatti, poco più tardi, nel 1697, Stahl considerava la fermentazione come conseguenza del moto vibratorio del "fer-



mento" per azione del quale le sostanze fermentescibili, costituite da particelle elementari legate labilmente fra loro, si scompongono per poi riunirsi in modo diverso a produrre sostanze diverse (Sciancalepore, 1998).

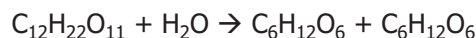
Fu necessario attendere ancora un secolo per giungere alla dimostrazione di Spallanzani (1783), secondo la quale il mosto bollito perde la capacità fermentativa. Questa osservazione, assieme all'altra, dovuta anch'essa a Spallanzani, che il succo gastrico dissolve la carne, segnò l'inizio di un nuovo periodo nella storia dello studio dei processi fermentativi. Le indagini quantitative sulla fermentazione alcolica ebbero inizio con gli studi di Lavoisier (1789) che, applicando il metodo ponderale, da lui introdotto nella tecnica sperimentale, dimostrò che, nel corso della fermentazione, lo zucchero veniva decomposto in alcol e anidride carbonica. Più tardi, Gay-Lussac (1813) rappresentava il processo fermentativo con l'equazione $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$, senza considerare i prodotti secondari della fermentazione, all'epoca sconosciuti. Queste risultanze, di natura strettamente chimica, allontanano, però, le ricerche sulla natura del fenomeno fermentativo; nel 1837, il francese Caignard Latour e i tedeschi Schwann e Kützing, sebbene lavorando indipendentemente, collegarono il fenomeno della fermentazione alla presenza di lieviti vivi, dimostrando, quindi, l'origine biologica del processo. Questa teoria vitalistica della fermentazione trovò subito altri sostenitori, tra i quali va ricordato il Turpin, che attribuiva la fermentazione del mosto alla presenza dei microbi e al loro sviluppo. Questa teoria si affermò definitivamente con gli studi di Pasteur (1860), il fondatore della microbiologia e della chimica microbiologica. Secondo Pasteur, i lieviti, che si trovano nell'aria, arrivano nei liquidi zuccherini, dove si moltiplicano e determinano la fermentazione (Sciancalepore, 1998).

3.2. Biochimismo della fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica, sostanzialmente, si svolge in 2 fasi.

Nella prima, il lievito scinde, tramite l'enzima *invertasi*, gli zuccheri complessi (disaccaridi, come il saccarosio), mentre, nella seconda fase, avviene la formazione di etanolo (o alcol etilico) a partire dagli zuccheri semplici (ad esempio, il fruttosio).

La reazione che caratterizza la prima fase è:



con formazione di glucosio e fruttosio (2 isomeri).

Nella seconda (che distingue la vera e propria fermentazione), a partire dal glucosio nel citoplasma dell'organismo anaerobico si verifica la glicolisi, ovvero la molecola di glucosio, difosforilata da 2 molecole di ATP, si scinde in 2 molecole di acido piruvico. L'assenza di ossigeno impedisce il verificarsi del normale ciclo di Krebs e della respirazione cellulare aerobica implicante il trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. È per tale ragione che la cellula passa ai processi caratteristici della fermentazione. L'acido viene privato di una molecola di anidride carbonica (liberata nell'ambiente extra-cellulare) spezzando il gruppo -COOH per formare come prodotto intermedio l'aldeide acetica, estremamente velenosa. Questa viene, infine, arricchita di 2 ioni idrogeno: la cellula ricarica, così, le molecole di NAD e forma, in qualità di sottoprodotto, l'etanolo (Fig. 1).

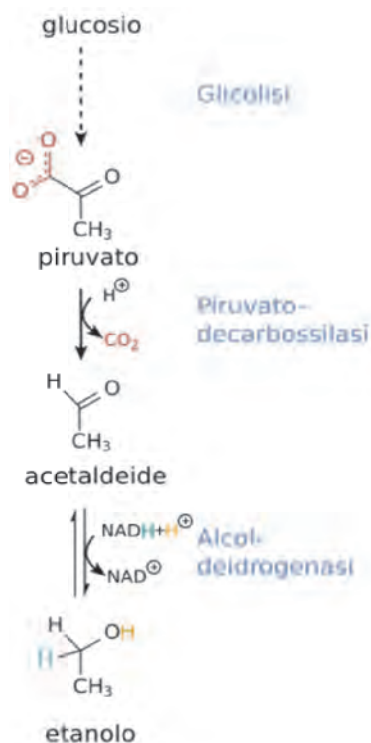


Figura 1 - Schema della fermentazione alcolica

La formula generale che sintetizza la formazione di etanolo e anidride carbonica a partire dal glucosio è quella del chimico-fisico francese Joseph Louis Gay-Lussac: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$.



Bibliografia

D.P.R., n. 162. Norme per la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei mosti, vini ed aceti. Suppl. Ord. Gazz. Uff. n. 73 23 marzo 1965.

Sciancalepore, V. Industrie agrarie. Olearia, enologica, lattiero-casearia. Utet. 1998.





Capitolo 4

I lieviti vinari: tassonomia e fattori di crescita



Classificazione e attività metaboliche dei lieviti (*Saccharomyces* e non) coinvolti nel processo di vinificazione







4. I lieviti vinari: tassonomia e fattori di crescita

Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni
Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

I lieviti sono microrganismi unicellulari appartenenti al gruppo dei funghi e si moltiplicano per gemmazione o scissione; hanno forma sferica, ovale o ellittica; talvolta, possono essere caratterizzati da ife filamentose (pseudomicelio) e hanno dimensioni comprese fra 5-30 μm di lunghezza e 1-5 μm di larghezza. Tali microrganismi si riproducono sia per via vegetativa (gemmazione o scissione binaria) che per via sessuata (processo meiotico).

I lieviti, pur essendo un gruppo omogeneo di organismi, sono classificabili secondo le stesse suddivisioni usate per classificare i funghi. La classificazione di Kreger van Rij del 1984 comprendeva 500 specie e quella di Kurtzman e Fell (1998) comprendeva circa 700 specie (Zambonelli et al., 2000). Tuttavia, quelli che intervengono concretamente, in modo fondamentale o anche solo marginale, nella fermentazione cosiddetta spontanea sono relativamente pochi, cosicché il quadro microbiologico che ne consegue è piuttosto semplice.

Classe:	<i>Ascomycetes</i>
Sottoclasse:	<i>Protoascomycetes</i>
Ordine:	<i>Endomycetales</i>
Famiglia:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Generi:	<i>Saccharomyces</i> specie: <i>cerevisiae</i> , <i>paradoxus</i> , <i>pastorianus</i> , <i>bayanus</i>
	<i>Schyzosaccharomyces</i>
	<i>Hansenula</i>
	<i>Pichia</i>
	<i>Hanseniaspora</i>
	<i>Saccharomycodes</i>
Classe:	<i>Deuteromycetes</i>
Famiglia:	<i>Criptococcaceae</i>
Generi:	<i>Candida</i>
	<i>Kloeckera</i>
	<i>Torulopsis</i>





I lieviti possono essere suddivisi in 7 tipi a seconda della forma, ma, per quanto attiene l'enologia, risultano interessanti solo 3 categorie:

- ellittici, aventi forma di ellisse, per esempio *S. cerevisiae*;
- apiculati, aventi forma di limone, per esempio *Kloeckera apiculata*;
- cocchi, aventi forma tondeggianti, per esempio *Torulopsis stellata* (Sicheri, 1986).

Il mosto d'uva è un mezzo nutritivo che contiene in forma utilizzabile tutti gli elementi necessari allo sviluppo di molte specie di lieviti che, quindi, in esso hanno la possibilità di moltiplicarsi.

Un mosto contiene:

- carbonio, utilizzato preferibilmente sotto forma di zuccheri (specialmente esosi);
- azoto, più prontamente assimilabile nella forma ammoniacale, seguita dalla forma amminoacidica e proteica (alcune specie possono utilizzare anche i nitrati);
- sali minerali, fra i quali sono particolarmente importanti quelli di fosforo, potassio, zolfo e calcio;
- vitamine o fattori di crescita, non necessarie per alcune specie che sono auxoautotrofe, possono cioè moltiplicarsi in assenza di qualsiasi vitamina essendo in grado di sintetizzarle. Le specie di lieviti auxoeterotrofe richiedono uno o più fattori di crescita quali le vitamine B1, B2, B6, PP, biotina, acido pantotenico, acido p-ammino benzoico e mesoinositolo;
- ossigeno, che è indispensabile per la riproduzione; in ambiente acido, i lieviti fermentano meglio a pH 4 che a pH 3; tuttavia, è meglio che il mosto abbia un pH acido per ostacolare lo sviluppo dei batteri.

L'attività metabolica dei lieviti, oltre che dalla composizione del mosto, è influenzata da numerosi fattori:

- la temperatura che permette la massima velocità di fermentazione è di 30°C circa, ma, al di sopra di questa, la fermentazione rallenta fino ad essere inibita se superiore a 35-40°C. Alle basse temperature (comunque superiori ai 17-20°C), la fermentazione esaurisce più facilmente tutto lo zucchero;
- la concentrazione zuccherina del mosto, se elevata, può rendere difficile l'avvio della fermentazione;
- la quantità di alcol etilico prodotto può ridurre o bloccare l'attività dei lieviti;
- l'acidità del mosto, se risulta elevata, può limitare l'attività dei lieviti; se troppo bassa, invece, può favorire la proliferazione di batteri lattici i quali possono causare alterazioni della qualità del vino;
- lo sviluppo e l'attività dei lieviti dipendono dalla presenza di numerosi macro



- e micronutrienti quali zuccheri (principale fonte di carbonio), sali di ammonio (principale fonte di azoto), vitamine (B1, B2, B6 e acido pantotenico);
- l'areazione iniziale del mosto può essere utile affinché i lieviti possano attivare un rapido metabolismo aerobico e, quindi, moltiplicarsi velocemente nel mosto;
- elevate concentrazioni nel mosto di sostanze anticrittogamiche, derivanti dai trattamenti fitosanitari effettuati in campo, e di anidride solforosa, addizionata in fase di ammostamento, possono ritardare l'avvio della fermentazione o causarne forti rallentamenti.

4.1. I lieviti del genere *Saccharomyces*

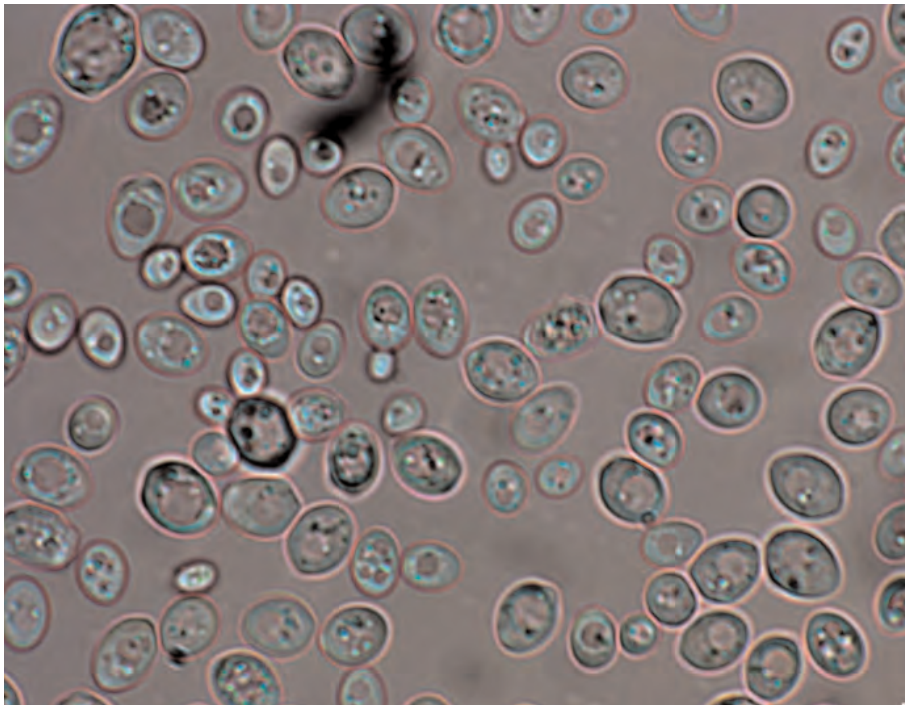


Foto di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* al microscopio ottico

Per molto tempo, è stato considerato come l'unico genere di lieviti, all'interno del quale erano compresi tutti i fermenti alcolici; poi, sulla base di numerose caratteristiche, ne sono stati proposti altri, cosicché la classificazione è diventata sempre più articolata e complessa. Il genere *Saccharomyces* comprende

i lieviti più vigorosi e alcoltolleranti, quelli che più di tutti gli altri possono essere considerati "fermenti alcolici", titolo che spetta, senza alcun dubbio, alla specie *S. cerevisiae*, il tipico lievito del pane, della birra e del vino, che viene prodotto industrialmente in grandi quantità e trova impiego nei più differenti settori.

Il genere *Saccharomyces* è molto compatto e ben caratterizzato e, per questo motivo, si potrebbe pensare che i suoi confini siano netti e che la sua suddivisione in specie sia semplice, ma, in realtà, non è così (Zambonelli et al., 2000). Nel corso degli ultimi 100 anni, il genere è stato oggetto di continue revisioni sotto l'aspetto tassonomico: i suoi confini sono stati spostati con l'annessione di altri generi per poi ritornare sulle posizioni originarie ed il numero di specie si è alternativamente ampliato fino a diverse decine, per poi ridursi fino al minimo di 8.

Di conseguenza, ci sono dei nomi di specie che sono stati riconosciuti, poi depennati, poi ricomparsi, talvolta, anche come varietà di altre specie, oppure con un significato differente da quello che avevano precedentemente: tutto questo è stato indubbiamente fonte di qualche confusione.

Attualmente, il genere *Saccharomyces* è, sia pure non formalmente, suddiviso in 2 gruppi, quello dei *Saccharomyces sensu stricto* e quello dei *Saccharomyces sensu lato* (Zambonelli et al., 2000).

I *Saccharomyces sensu lato* sono rappresentati da alcune specie che, ovviamente, hanno tutte le caratteristiche proprie del genere, ma che hanno habitat o prerogative particolari e, in generale, scarso vigore fermentativo: non sono, insomma, degli ottimi "fermenti alcolici" (Zambonelli et al., 2000).

Il gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* è formato da 4 specie che si differenziano a 2 a 2 in base alla loro capacità di crescita a differenti temperature: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus*, dotate di capacità di sviluppo oltre i 37°C e che hanno temperatura ottimale superiore a 30°C; *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces pastorianus*, che non sviluppano oltre i 37°C ed hanno temperatura ottimale inferiore a 30°C (Ummarino et al., 1997). Recentemente al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* sono state aggiunte altre tre specie: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* (Naumov et al., 1996). Questi lieviti sono simili agli altri per caratteristiche fenotipiche, in particolare la capacità di fermentazione, e genotipiche. Sono stati isolati il primo in Brasile e gli altri in Giappone.

S. bayanus e *S. pastorianus*, sulla base dei punti cardinali di temperatura (temperatura massima, ottimale e minima) che presentano a livelli più bassi rispetto a quelli di *S. cerevisiae*, possono essere definiti criotolleranti o freddo-fermentanti. All'interno della specie *S. cerevisiae*, organismo tipicamente mesofilo,



sono reperibili anche ceppi che hanno la capacità di fermentare bene a temperature fino ad oltre i 40°C e che fermentano, invece, con difficoltà alle temperature di maggior interesse enologico, cioè inferiori a 30°C. Questi ceppi di lievito, in virtù dei punti cardinali di temperatura più alti rispetto a quelli tipici di *S. cerevisiae*, sono detti termotolleranti. Tali ceppi non sono rari, ma sono isolabili da mosti di uva, di zucchero o di melasso di canna soltanto con il metodo dell'arricchimento selettivo o da mezzi incubati ad alta temperatura.

I ceppi di "*Saccharomyces sensu stricto*" criotolleranti e quelli termotolleranti differiscono dai normali ceppi mesofili non soltanto per il loro comportamento *temperatura*, ma anche per i prodotti minoritari della fermentazione e per l'azione che svolgono sull'acido malico.

I saccaromiceti criotolleranti danno luogo a buone fermentazioni nell'intervallo di temperatura tra 6°C e 30°C, a differenza dei mesofili tipici che danno buone fermentazioni nell'intervallo tra 12°C e 36°C.

Delle due specie criotolleranti, solo *S. bayanus*, classificato in passato come *S. uvarum*, è considerato valido sotto il profilo enologico, mentre *S. pastorianus*, capace di sviluppare molto bene a temperature basse, inferiori a 10°C, ha importanza esclusivamente nella produzione della birra. L'interesse degli enologi verso *S. bayanus* è legato, da una parte, alla capacità posseduta da questa specie di operare buone fermentazioni a basse temperature, dall'altra, al fatto che essa presenta, in stretta associazione al carattere criotolleranza, un bilancio chimico di fermentazione differente rispetto a quello dei ceppi tipicamente mesofili di *S. cerevisiae* (Castellari et al., 1992a). Le caratteristiche enologiche dei ceppi criotolleranti della specie *S. bayanus*, originariamente identificati come *S. cerevisiae* r.f. *uvarum*, risultano numerose.

Alle temperature di interesse enologico, pur dando origine a pronte e rapide fermentazioni dei mosti, hanno un vigore fermentativo ed una alcol-tolleranza inferiori rispetto a quelli dei ceppi mesofili di *S. cerevisiae*.

Spesso, non portano a termine la fermentazione, lasciando residui di zuccheri, sia pure di limitata entità, pari a circa 5 – 10 g/L. Hanno, tuttavia, la capacità di fermentare bene a temperature basse, circa 6 – 10°C, alle quali l'attività dei ceppi mesofili di *S. cerevisiae* è molto rallentata. Buona è la resistenza all'anidride solforosa, anche se, in genere, è inferiore a quella dei ceppi mesofili; lo sviluppo è, spesso, di tipo pulverulento, cioè a cellule disperse, ma non mancano ceppi dotati di capacità di flocculazione, così come quelli schiumogeni. Da questi punti di vista, l'idoneità enologica della specie è ottima. L'entità di produzione di composti minoritari della fermentazione da parte di *S. bayanus* fornisce, inoltre, un quadro molto interessante da un punto di vista enologico.





Tale specie si distingue particolarmente per alcuni importanti caratteri di qualità, ovvero per la quantità di produzione di glicerolo, acido succinico, acido acetico, alcoli superiori e β -feniletanolo e per il tipo di azione metabolica sull'acido malico (Castellari et al., 1992b). Nello specifico, il glicerolo viene prodotto in grande quantità, variabile in funzione del ceppo, ma, in genere, superiore di circa il 50% rispetto a *S. cerevisiae*.

Elevata è anche la produzione di acido succinico, da 0,7 ad 1,3 g/100 mL di etanolo; produzione che, risultando pressoché doppia rispetto a quella di *S. cerevisiae*, concorre in maniera decisiva all'aumento di acidità fissa dei vini. Come conseguenza dei livelli prodotti di glicerolo e di acido succinico, il rendimento in etanolo è generalmente più basso di circa il 5% rispetto a quello di *S. cerevisiae*. L'acido acetico è prodotto a livelli molto bassi, generalmente inferiori a 0,1 g/100mL di etanolo, il che rende questi ceppi particolarmente interessanti. Gli alcoli superiori, attraverso il catabolismo degli aminoacidi, sono prodotti complessivamente a livelli superiori rispetto a *S. cerevisiae*, ma non in modo uniforme.

La produzione di n-propanolo è di poco inferiore, mentre quelle di isobutanolo, di alcol amilico ed isoamilico sono di poco più alte; è prodotto invece a livelli 5 – 10 volte più alti (fino a 400 mg/100 mL di etanolo) il β -feniletanolo, composto che, impartendo un profumo gradevole di rosa, è da considerare positivo per la qualità dei vini se, ovviamente, non raggiunge concentrazioni eccessive, tali da generare squilibri gusto-olfattivi nel profilo sensoriale del prodotto finito.

I ceppi criotolleranti di *S. bayanus* sono caratterizzati, inoltre, dalla capacità di sintetizzare l'acido malico anziché di fermentarlo come tutti i ceppi di *S. cerevisiae*. Questa caratteristica è di notevole interesse enologico, in quanto, poter disporre in cantina di ceppi che sintetizzano l'acido malico può agevolare la risoluzione di molti problemi connessi alla ridotta acidità dei vini, soprattutto nelle regioni a clima caldo temperato dell'Italia meridionale.

Molto spesso, i vini prodotti con ceppi criotolleranti di *S. bayanus* hanno un contenuto in acido malico superiore rispetto a quello dei vini prodotti con ceppi di *S. cerevisiae* o addirittura superiore a quello dei relativi mosti d'origine. La sintesi di acido malico avviene se tale composto è presente nel mosto in quantità inferiore a 3,0 g/L e diminuisce con l'aumentare della sua concentrazione. Al di sopra di 4,0 g/L anche i ceppi di *S. bayanus* lo fermentano parzialmente. In definitiva, i *Saccharomyces* criotolleranti producono vini la cui concentrazione di acido malico è tendenzialmente costante, da 2,5 g/L a 3,5 g/L, qualunque sia quella dei mosti e la decisione di affidare le fermentazioni a ceppi di *S. bayanus* o *S. cerevisiae* è frutto di una ben precisa scelta tecnologica.



4.2. I lieviti apiculati

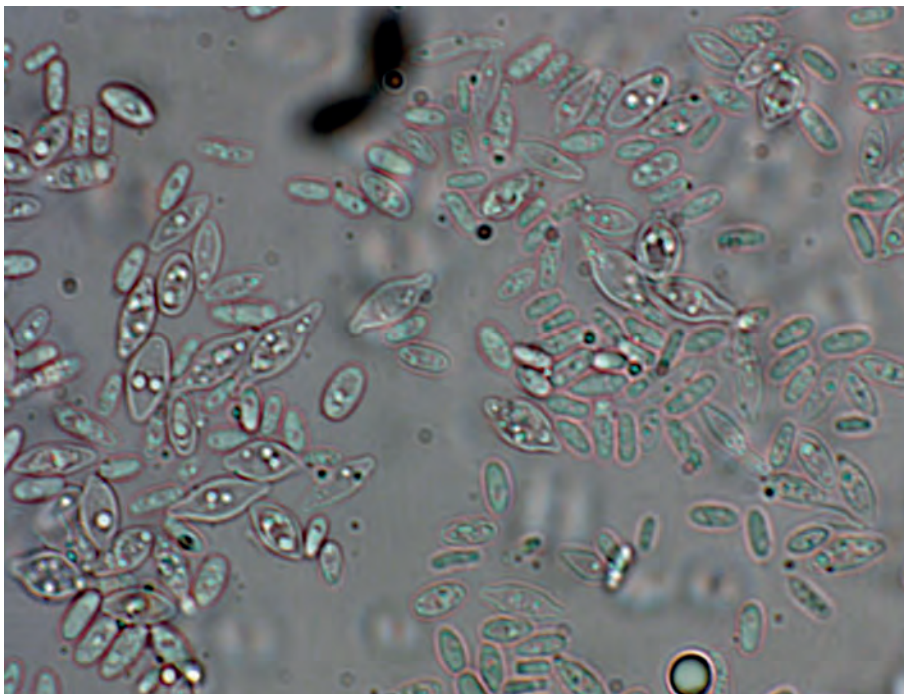


Foto di cellule di *Hanseniaspora uvarum* al microscopio ottico

Gli apiculati sono così chiamati perché la loro moltiplicazione avviene sempre per formazione di gemme alle estremità delle cellule. Gli anelli cicatriziali, che rimangono dopo il distacco delle gemme, provocano l'appuntimento ed il progressivo allungamento degli apici delle cellule, le quali assumono la caratteristica forma "apiculata" (Zambonelli et al., 2000).

I più importanti, dal punto di vista enologico, sono i generi *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes* e *Wickerhamiella*, i lieviti apiculati asporigeni comprendono il genere *Kloeckera* (Zambonelli et al., 2000).

Il lievito apiculato più noto è *Hanseniaspora uvarum* (forma imperfetta *Kloeckera apiculata*) che, essendo sempre presente, in gran numero, in tutti i mosti, è il primo ad innescare la fermentazione alcolica. Esso è poco alcoligeno, e, molto spesso, si arresta quando la concentrazione di etanolo arriva a 4-5 gradi di alcol e può generare quantità elevate di acido acetico, tali da compromettere la qualità del vino. È molto sensibile all'anidride solforosa e può essere facilmente eliminato con l'uso di questo antisettico (Zambonelli et al., 2000). Altri generi di lieviti d'interesse enologico ascrivibili al gruppo degli apiculati risultano

essere *Issatchenkia* spp., *Candida* spp., anch'essi in grado di partecipare in modo attivo al processo fermentativo, soprattutto in condizioni di fermentazione spontanea e in presenza di basse concentrazioni di anidride solforosa.

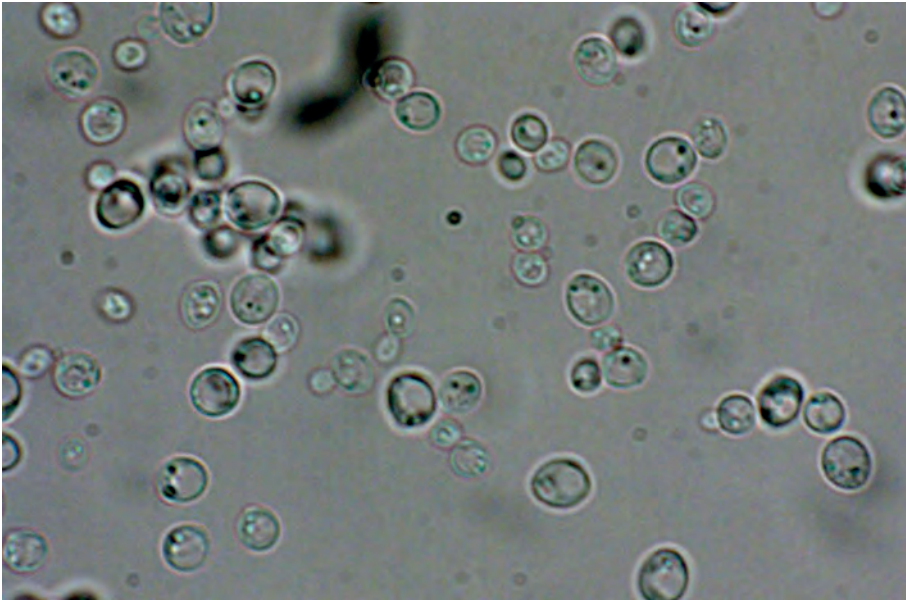


Foto di cellule di *Metschnikowia pulcherrima* al microscopio ottico

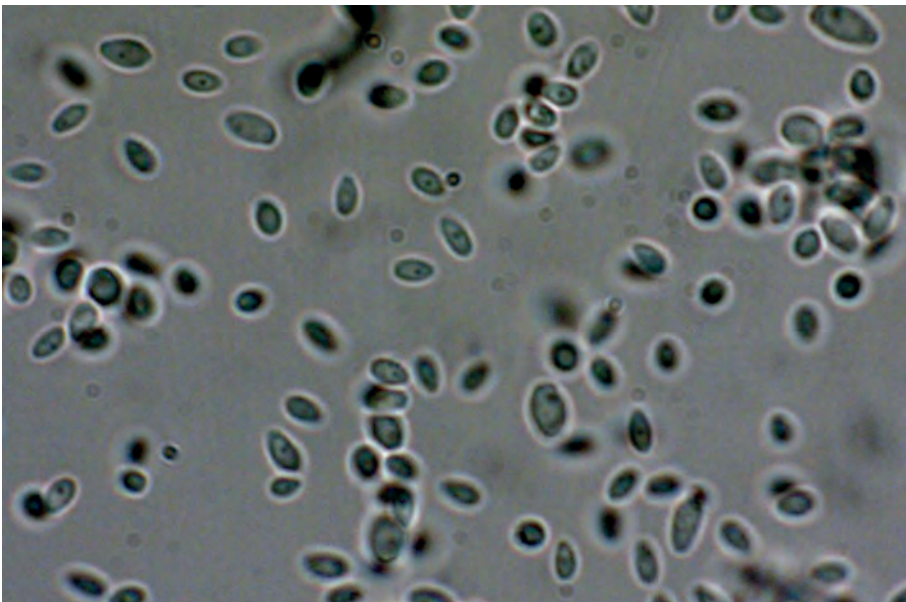


Foto di cellule di *Candida zemplinina* al microscopio ottico



Bibliografia

Castellari L., Giudici P., Grazia L., Passarelli P. Azione dei ceppi di *Saccharomyces* criotolleranti sul contenuto in acido malico dei vini. *Industrie delle bevande*. 21, 509, 1992b.

Castellari L., Pachioli G., Zambonelli C., Tini V., Grazia L.. Isolation and initial characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Italian Journal of Food Science*. 3, 179, 1992.

Kreger van Rij N.J.W.. *The yeast: a taxonomy study*, Elsevier. 1984.

Kurtzman C.P., Fell J.W.. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam. 1998.

Naumov G.I.. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology*. 17, 295-302, 1996.

Sicheri G.. *Industrie agrarie*. Ed. Ulrico Hoepli. Milano, 1986.

Ummarino I., Gentilizi N., Di Stefano R.. Alcuni aspetti del controllo di qualità nel campo enologico. Lo stato di combinazione degli antociani. *Analisi ISE*, XXVII, 105-121, 1997.

Zambonelli C.. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole-Edizioni Agricole, 1998.







Capitolo 5

Fermentazione spontanea e fermentazione in purezza



Vantaggi e svantaggi di una fermentazione alcolica naturale rispetto alla fermentazione alcolica guidata dai lieviti selezionati commerciali







5. Fermentazione spontanea e fermentazione in purezza

Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni

Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

La fermentazione del vino, tradizionalmente, è stata quasi sempre condotta in modo "spontaneo", ovvero affidando la fermentazione alcolica ai lieviti presenti naturalmente sugli acini d'uva e/o associati alle superfici ed attrezzature di cantina.

Lo studio ecologico delle specie di lievito dell'uva e del vino è stato affrontato in un considerevole numero di lavori, a partire, in Italia, dalle ricerche di De Rossi (1935). In Francia, i primi risultati sull'ecologia dei lieviti enologici sono stati quelli di Peynaud e Domercq (1953), che descrivono i lieviti trovati sulle uve e durante la fermentazione alcolica. Negli anni, si sono susseguite numerose ricerche che hanno dimostrato che i lieviti sono presenti nei suoli, sulla superficie dei vegetali, nel tratto digerente degli animali. La loro disseminazione è sostenuta dal vento, dagli insetti e, ovviamente, dall'uomo. I lieviti sono irregolarmente ripartiti sulla superficie della vite; poco numerosi su foglie, raspi ed acini verdi, una volta raggiunta la maturazione, colonizzano, invece, la buccia del frutto e, più precisamente, si dispongono sugli essudati liberati da microlesioni in prossimità degli stomi.

Il numero di lieviti passa da circa mille cellule in raccolta a diverse decine di milioni di cellule per millilitro di pigiato.

È noto ormai da molto tempo che la fermentazione comincia con l'azione di lieviti di forma apiculata e che, in un secondo tempo, appaiono delle cellule di forma ovale, ellittiche o allungate, le quali prendono il sopravvento sulle prime portando a termine il processo fermentativo. I lieviti dei generi *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* predominano nelle prime fasi, seguiti da diverse specie di *Metschnikowia* e *Pichia* e, a volte, di *Issatchenkia* e *Kluyveromyces* nelle fasi centrali, quando la concentrazione dell'etanolo arriva al 3-4 % (Fleet e Heard, 1993). In questa fase, le specie di lievito appena menzionate hanno utilizzato parte degli zuccheri ed amminoacidi del mosto, in quantità sufficienti per pro-



durire una serie di composti secondari, che influenzano fortemente la qualità finale del vino. I lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono in maniera significativa alla fermentazione, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a 10^6 - 10^7 cellule/mL (Fleet et al. 1984; Heard e Fleet, 1986). Con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consentendo, in tal modo, ai lieviti *Saccharomyces*, generalmente dotati di un maggiore potere alcoligeno, di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo (Amerine et al. 1982; Lafon-Lafourcade, 1983; Querol et al. 1990). Tuttavia, gli stessi lieviti apiculati hanno dimostrato, in alcuni casi, di sostenere da soli e in modo soddisfacente la vinificazione (Garoglio, 1981). Inoltre, basse temperature di fermentazione (10-15°C) sono considerate favorevoli ad uno sviluppo preferenziale dei lieviti apiculati; in particolare, incrementano la tolleranza all'etanolo delle specie *Hanseniaspora* e *Candida*, al punto che questi lieviti non scompaiono e diventano specie dominanti accanto a *S. cerevisiae* per un tempo più lungo (Heard e Fleet, 1988; Erten, 2002).

Oltre a *S. cerevisiae*, poche altre specie hanno la possibilità di intervenire nelle ultime fasi della fermentazione e in quelle centrali, in quanto dotate di un discreto potere alcoligeno. Si tratta di *Torulasporea delbrueckii* (già *Torulasporea rosei* o *Saccharomyces rosei*) e *Zygosaccharomyces bailii* (già *Saccharomyces bailii*), che occasionalmente possono anche sostituire lo stesso *S. cerevisiae*, e di varie specie del genere *Schizosaccharomyces* (*Schiz. pombe*, *Schiz. japonicus*). Altri lieviti non rari, ma il cui intervento è del tutto marginale, sono rappresentati da *Saccharomycodes ludwigii*, *M. pulcherrima* e alcune specie del genere *Brettanomyces*. Al termine della fermentazione, se non viene impedito il contatto con l'aria atmosferica, è inevitabile lo sviluppo dei lieviti della fioretta, rappresentati principalmente da *Pichia membranaefaciens*, *Candida vini* e *Hansenula anomala*. Questi, come è ben noto, sono privi di attività fermentativa, formano veli superficiali spessi e fragili, si moltiplicano respirando l'alcool etilico e provocano una netta diminuzione del grado alcolico. Tuttavia, le possibili varianti, soprattutto in termini quantitativi, al quadro microbiologico sopra delineato sono innumerevoli in quanto lo sviluppo e l'attività di ogni specie dipendono da numerosi fattori di natura chimica, fisica e biologica, tra loro interattivi. È, dunque, facile intuire che la tipologia delle specie presenti e la loro abbondanza relativa all'inizio del processo fermentativo, la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna popolazione, grazie alle peculiarità metaboliche che in prima istanza possono essere considerate specie-

specifiche, siano tutti elementi in grado di incidere anche fortemente sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finale, nel bene e nel male (Lambrechts e Pretorius, 2000).

Dunque, la fermentazione spontanea è un processo non facilmente controllabile che può essere responsabile della formazione di *off-odour and off-flavour*, ovvero di note aromatiche non desiderate generando anche alterazioni, quindi difetti organolettici nel prodotto finito. Per tali motivi, fra i produttori di vino ed enologi è ormai opinione diffusa che il ricorso ad una fermentazione in purezza, cioè impiegando lieviti commerciali selezionati da inoculare in modo massivo nel mosto, sia la scelta migliore al fine di una qualità costante del vino.

A tale scopo, generalmente, il mosto, prima di essere inoculato con il ceppo selezionato, è soggetto all'aggiunta di anidride solforosa (circa 20-120 mg/L) così da inibire lo sviluppo dei lieviti naturalmente presenti sulle uve e quindi nel mosto. Quindi, si passa all'inoculo nel mosto di decine di miliardi di cellule vive di ceppo selezionato, che, in tale condizioni, riesce ad avviare rapidamente la fermentazione assicurandone, quasi sempre, il corretto svolgimento.

Bibliografia

Amerine M.A., Berg H.W., Kunkee R.E., Ough C.S., Singleton V.L.U.L., Webb A.D.. The Technology of Wine Making, 4th edn. AVI Publishing Company, Westport, Conn., 1982.

De Rossi G.. I lieviti della fermentazione nella regione umbra. 4° Congres international de la vigne e du vin. Lausanne, 1935.

Erten H.. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 373-378, 2002.

Fleet G.H., Heard G.M.. Yeast-growth during fermentation. In Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet, G.H. (ed). Harwoord Academic: Reading, 27-54, 1993.

Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P.. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Applied and Environmental Microbiology, 48, 1034-1038, 1984.

Garoglio P.G.. "Nuova Enologia" Enciclopedia Vitivinicola Mondiale. Edizione AEB, 1981.

Heard G.M., Fleet G.H.. Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. Food Technology Association of Australia, 38, 22-25, 1986.

Heard G.M., Fleet G.H.. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. Journal of Applied Microbiology, 65, 23-28, 1988.

Lafon-Lafourcade, S.. Wine and brandy. In: Reed G. (Ed) Biotechnology. Verlag Chemie, Heidelberg, 5, 81-161, 1983.

Lambrechts M.G., Pretorius I.S.. Yeast and its importance to wine aroma. South African Journal of Enology and Viticulture, 21, 97-129, 2000.

Peynaud E., Domercq S.. Sur les Brettanomyces isoles de raisin et du vin. Archives of Microbiology, 24, 266, 1956.

Querol A., Jiménez M., Huerta, T.. A study on microbiological and enological parameter during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). Journal of Food Science, 55, 1603-1606, 1990.



Capitolo 6

Lievito autoctono o lievito commerciale?



Diffusione, criteri di selezione e prospettive degli starter microbici in campo enologico







6. Lievito autoctono o lievito commerciale?

Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni

Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

I fattori che caratterizzano un vino sono tre: il *terroir*, termine francese riferito all'importanza che suolo e clima hanno sul profilo organolettico di un vino, il vitigno e i microrganismi (lieviti e batteri lattici). Il fattore microbiologico legato alle produzioni vinicole, può avere una forte influenza sulla tipicità e sulla qualità del prodotto finale, contribuendo, pertanto, a definire una qualità "microbiologica" nella produzione dei vini. Questa è influenzata da numerosi fattori, tra cui: lo stato fito-sanitario delle uve, gli aromi secondari prodotti dai lieviti in fermentazione alcolica, la complessità dei vini determinata dall'affinamento sulle fecce nobili dei lieviti e dall'equilibrio gustativo generato da numerose attività enzimatiche di origine microbica. L'ottenimento di un vino di qualità non può prescindere da una corretta gestione dei microrganismi (lieviti, batteri, funghi filamentosi) sia in vigna che in cantina.

Ma come siamo passati, in pochi decenni di enologia, da una fermentazione "naturale", utilizzando le popolazioni miste di lieviti di origine ambientale ad una fermentazione "in purezza", ovvero guidata da uno starter commerciale? Fino alla fine del 1800, tutte le bevande fermentate (succhi di frutta, estratti acquosi a base di cereali, etc.) erano ottenute mediante i microrganismi naturalmente associati alle relative materie prime e all'ambiente di lavorazione. Tale processo, però, aveva l'inconveniente di essere quasi del tutto incontrollabile da parte dell'uomo. Fu Müller-Thurgau, nel 1890, ad introdurre il concetto di lievito selezionato in campo enologico (Pretorius e Westhuizen, 1991), ovvero un microrganismo in grado di condurre una fermentazione dei mosti e dei vini con risultati prevedibili e programmabili. Uno starter selezionato, quindi, gode di proprietà fisiologiche, biochimiche ed enologiche ottimizzate ai fini di un corretto processo di fermentazione. I primi ad impiegare i lieviti come starter in vinificazioni industriali furono i nuovi produttori di vino del XX secolo, come Stati Uniti, Nuova Zelanda e Australia. In Europa, i lieviti selezionati venivano inizialmente



impiegati solo per correggere le "alterazioni" fermentative e, molto spesso, per riavviare le fermentazioni come nel caso della spumantizzazione. Per quanto utili ai fini della standardizzazione delle fermentazioni industriali, le colture starter ebbero poco successo, finché non divennero di facile applicazione e conservazione, cioè finché non si passò da umidi panetti di lievito concentrati ad una comoda bustina di lievito secco attivo (LSA). Nel 1965, nacquero, in California, i primi due ceppi della specie *Saccharomyces cerevisiae* in busta e sottovuoto. E fu così che *Montrachet* e *Pasteur Champagne* (è questo il nome dei due ceppi) si diffusero presto in tutto il mondo enologico, Italia compresa (D.M. 10 ottobre 1977). Ancora oggi, nelle cantine in cui vi è una produzione su larga scala, dove sono essenziali una fermentazione rapida e una qualità costante del prodotto, è normalmente preferito l'utilizzo di lieviti commerciali (Pretorius, 2000). Solo poche cantine si assumono il rischio di una fermentazione spontanea, caratterizzata dallo sviluppo in combinazione e/o successione di varie specie di lieviti naturalmente provenienti dalle uve e/o dall'ambiente di cantina. All'inizio del processo fermentativo, la concentrazione di etanolo è bassa (2-8 % v/v etanolo) e i lieviti non appartenenti al genere *Saccharomyces* (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, etc.) possono dominare tale processo, per poi essere sostituiti dai lieviti *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*), in grado di portare a termine la fermentazione degli zuccheri, in quanto dotati di un elevato potere alcoligeno.

I rischi associati alla fermentazione spontanea non sono legati solo alla possibilità di alterazioni e a difetti organolettici dei vini, ma anche, e soprattutto, all'impossibilità di ottenere una qualità del vino costante nel tempo. Ciascuna vendemmia è il risultato delle interazioni fra pedo-clima ed attività antropiche, le quali difficilmente si ripetono nello stesso modo di anno in anno. Dunque, anche il mondo microbico interagisce, di vendemmia in vendemmia, con fattori ambientali diversi per intensità e tipologia. Tutto ciò genera, nei mosti e, quindi, nei vini, profili chimico-organolettici differenti in funzione dell'annata. Molto spesso, i produttori di vini di qualità cercano di differenziarsi sul mercato attraverso un prodotto unico, nell'ottica della tipicità, ma, al tempo stesso, devono essere in grado di soddisfare i propri consumatori garantendo loro una qualità costante nel tempo, il che può trasformarsi in un valore aggiunto per il prodotto: la "riconoscibilità". Il problema, dal punto di vista industriale, è superato mediante l'impiego di lieviti commerciali *Saccharomyces* spp., tecnologicamente validi ma di origine alloctona (Australia, Francia, California, etc.), in grado di favorire la produzione di vini privi di difetti e con specifiche note sensoriali, quasi sempre in grado di ripetersi di vino in vino e di anno in anno, privando, però, il prodotto delle sue



originali caratteristiche di tipicità. Dunque, fino a che punto conviene ad un produttore sottrarre tipicità al proprio vino in nome di una "presunta" riconoscibilità? E poi, siamo sicuri di poter parlare di riconoscibilità o, forse, siamo di fronte ad una ordinaria "ripetibilità" organolettica dei vini? Insomma, un lievito commerciale isolato, ad esempio in Australia, e selezionato in base a note intense di frutta esotica può essere impiegato nella vinificazione di centinaia di vini italiani, diversi per cultivar e per origine ed essere in grado di diversificare tali vini e, al tempo stesso, renderli riconoscibili sul mercato? Nel mondo enologico, se vogliamo valutare l'effetto "lievito commerciale" nel suo insieme, dobbiamo andare oltre il rischio della perdita di tipicità organolettica dei vini e, quindi, individuare i possibili problemi anche all'esterno delle mura della cantina.

Il vino è l'espressione dell'ambiente viticolo da cui si origina e l'effetto del "lievito commerciale" incide anche sulla biodiversità microbica del vigneto. L'uso di qualsiasi starter microbico prevede l'inoculo nel mosto di massive quantità (circa 10^8 cellule/ml di mosto) di lievito. Ovviamente, la fermentazione alcolica, innescata e guidata da queste cellule, funge da moltiplicatore, generando una forte contaminazione dell'ambiente e dell'attrezzatura di cantina, operatori compresi. Tutto questo, attraverso le attrezzature e gli scarti di produzione della cantina, genera in vigna e, quindi, nell'ambiente, un'intensa immissione di cellule dei lieviti commerciali impiegati per fermentare i mosti. Studi recenti hanno dimostrato che, dopo la vendemmia, in vigneto si ritrova circa il 73% dei lieviti commerciali presenti in cantina: il 94% di questi viene disseminato dalle macchine per la raccolta e trasformazione dell'uva in un raggio di diverse centinaia di metri dalla cantina (Valero et al., 2005). Se a questo aggiungiamo il fatto che, fra tutte le colture commercializzate di ceppi microbici, sono relativamente poche quelle realmente utilizzate in tutto il mondo dai vinificatori e che l'attuale normativa europea consente l'ingresso in Italia di microrganismi geneticamente modificati, gli svantaggi legati all'uso dei lieviti commerciali, in termini di standardizzazione dei prodotti finiti, risultano per nulla trascurabili. Con la moderna enologia e grazie all'uso adeguato delle biotecnologie, è possibile superare sia i rischi legati alla fermentazione spontanea che all'omologazione sensoriale indotta dai lieviti commerciali, ovvero isolare, selezionare ed impiegare in cantina ceppi di lieviti "autoctoni". Tali microrganismi sono definiti "autoctoni" perché particolarmente adatti alla fermentazione dei mosti da cui sono stati isolati, in quanto capaci di impartire ai vini caratteri sia di qualità che di tipicità. Questi lieviti sarebbero il frutto di una selezione naturale svolta da vari fattori legati all'ambiente, alla tradizione, alle pratiche di campo e di cantina. L'origine di tali lieviti può essere diversa e i veicoli, attraverso i quali i microrganismi pos-



sono "contaminare" le uve, svilupparsi nel mosto e, quindi, influenzare la qualità del prodotto finito, sono numerosi. Molti ricercatori hanno indagato l'origine dei lieviti vinari, dimostrando che questi possono essere diffusi nell'ambiente viticolo grazie a diversi vettori, come gli uccelli (Francesca et al., 2012) o gli insetti (*Drosophila* spp., *Apis* spp. e *Vespa* spp.) (Phaff et al., 1956a; Phaff et al., 1956b, Stevic, 1962, Lachance et al., 1994) che fungono da medium nel trasporto dei lieviti. Tali microrganismi, una volta giunti sui grappoli, in prossimità di ferite e microlesioni presenti sugli acini, possono facilmente moltiplicarsi grazie ai succhi altamente zuccherini dell'uva.

Numerosi studiosi ed enologi sostengono che ogni zona pedoclimatica, così come ogni cantina, possa aver selezionato, nel tempo, un lievito indigeno che, se impiegato nel medesimo areale d'isolamento, può condurre a risultati enologici migliori rispetto all'impiego di un lievito commerciale di altra origine geografica (Francesca et al., 2010). In tal senso, altre ricerche sostengono che alcuni ceppi di lieviti possono essere legati ad uno specifico ambiente viticolo o di cantina (Lopes et al., 2002), essere stabili nel tempo (Schuller et al., 2005) e in grado di dominare, negli anni, il processo fermentativo spontaneo (Mercado et al., 2007). Tutto ciò supporta l'idea che il *terroir* possa influire sulla qualità di un vino anche a livello microbiologico (Renouf et al., 2006; Mazzei et al., 2010). D'altra parte, alcuni studiosi ritengono impossibile definire un rapporto temporale stabile fra un ceppo di lievito e una specifica area geografica, ritenendo che l'influenza, ripetuta negli anni, di un lievito indigeno sulla qualità del prodotto finito sia più facilmente legata all'ambiente di cantina che non ad una ristretta area viticola. In realtà, lo studio dei rapporti fra microrganismi e ambiente non è una novità e numerosi sono gli studi a sostegno di un legame fra lievito e ambiente viticolo, sia a livello di specie che di ceppo. Già nel 1969, Castelli dimostrò che il genere *Kloeckera*, di forma asporigena, era particolarmente presente nelle zone a clima freddo, sostituito nei mosti di zone a clima temperato dal genere *Hanseniaspora*, sporigeno. Altri studiosi (Sipiczki et al., 2003; Mills et al., 2002), hanno associato la presenza, anche a notevoli concentrazioni, della specie *Candida stellata* ai mosti ottenuti da uve bottrizzate. Inoltre, negli ultimi anni, l'interesse del mondo scientifico nei confronti della distribuzione geografica dei lieviti è andato oltre il semplice rilevamento di determinati ceppi in specifiche aree, ma sta affrontando temi quali l'adattamento a livello genomico di popolazioni microbiche strutturate in specifici gruppi in funzione della regione di origine (Gayevskiy e Goddard, 2011). Insomma, ad oggi, anche se molto deve essere ancora ricercato e dimostrato, risulterebbe davvero difficile negare l'esistenza di un mondo microbico intimamente legato al proprio *terroir*.



6.1. Lievito autoctono, selezionato

Un ceppo di lievito autoctono deve essere in grado di rafforzare le caratteristiche peculiari dei vini locali e, soprattutto, deve essere dotato di specifici caratteri enologici che lo rendono di facile applicazione ed enologicamente "sicuro" quanto una coltura commerciale selezionata. Nasce, quindi, l'esigenza di selezionare i lieviti autoctoni al fine di individuare il ceppo che meglio si adatta alla specifica varietà di uva, zona di produzione e tecnica di vinificazione. I lieviti starter per l'enologia, anche se autoctoni, sono quasi sempre selezionati all'interno del genere *Saccharomyces* e, in particolare, tra i ceppi appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *S. bayanus*.

Le strategie attraverso le quali selezionare tali ceppi sono molteplici, ma, in ogni caso, un lievito autoctono deve rispondere a caratteri sia "tecnologici", che influiscono sull'andamento dei processi fermentativi, sia "di qualità", che incidono direttamente sulla struttura chimico-organolettica dei vini.

Dunque, un lievito autoctono per risultare tecnologicamente valido deve:

- garantire un rapido avvio della fermentazione alcolica grazie ad un'elevata capacità di colonizzare il mosto;
- ridurre la possibilità di rallentamenti e/o arresti di fermentazione, tipici dei processi spontanei;
- garantire la completa trasformazione degli zuccheri in etanolo così da inibire lo sviluppo di microrganismi alterativi;
- garantire una bassa produzione di acidità volatile e l'assenza sia di *off-odour* che di *off-flavour*;
- contribuire alla stabilità del vino all'ossidazione e ad una migliore chiarificazione;
- rafforzare le caratteristiche di tipicità del vino contribuendo alla sua riconoscibilità e tipicità.

In sostanza, un lievito autoctono selezionato risponde agli stessi criteri di selezione tecnologica di uno starter commerciale, ma con una differenza: deve restituire al consumatore un vino diverso perché unico.

6.1.1. Criteri di selezione di uno starter autoctono

È noto da molto tempo che le colture selezionate devono essere in possesso di caratteristiche di vigore fermentativo, alcol-tolleranza e resistenza all'anidride solforosa, tali da originare fermentazioni rapide e complete. Il problema, per lungo tempo rimasto irrisolto, è legato alla qualità conferita al vino dal lievito



agente della fermentazione; tutto questo a causa della difficoltà di definire esattamente il concetto di qualità ed esprimerlo in termini oggettivi e, di conseguenza, per la difficoltà di precisare che cosa dovessero fare i lieviti per migliorare la qualità dei vini.

Uno dei criteri di selezione molto seguiti in passato (come anche oggi) consiste nel prendere in considerazione i vini più pregiati e di isolare i lieviti agenti della loro fermentazione ipotizzandone un diretto intervento nel conferimento dell'alta qualità (Zambonelli et al., 2000). Si tratta di un criterio ben poco razionale, perché le selezioni non possono basarsi sull'origine più o meno nobile dei soggetti, ma sui dati obiettivi. Tutte le selezioni devono essere eseguite in funzione di caratteri (o di prestazioni produttive) ben definiti, noti e misurabili, di cui devono essere note la frequenza o l'entità con cui si presentano all'interno della specie scelta. *S. cerevisiae* è un organismo con un alto grado di variabilità, i cui caratteri enologici sono in gran parte individuati e la cui frequenza o entità sono state determinate per mezzo di studi biometrici (Zambonelli et al., 2000). I caratteri enologici possono essere suddivisi in "tecnologici" e "di qualità".

Caratteri tecnologici

Sono quelli che influiscono sull'andamento della fermentazione e la cui conoscenza permette di programmarla. Noti da molto tempo, hanno costituito la base delle prime selezioni. I diversi caratteri tecnologici vengono suddivisi in:

- caratteri di competitività (potere fermentativo o alcol-tolleranza, vigore fermentativo, resistenza all'anidride solforosa);
- tipo di sviluppo (a cellule disperse o polverulento, flocculento, a catene di cellule o aggregati, capacità schiumogena, potere filmogeno o carattere flor);
- sviluppo a basse temperature e ad alte temperature;
- carattere killer.

Dei diversi caratteri quelli che più interessano sono il potere fermentativo, il vigore fermentativo e la resistenza all'anidride solforosa.

Il potere fermentativo è in diretto rapporto con l'alcol-tolleranza ed esprime la quantità massima di etanolo che un lievito può formare per fermentazione di un mezzo (quale il mosto) contenente zucchero in eccesso (Zambonelli et al., 2000). Il carattere può essere determinato impiegando 100 ml di mosto d'uva, arricchito di glucosio fino al 30% (o più), in beuta chiusa con una trappola ad acido solforico che trattiene l'umidità. Durante la fermentazione, si forma anidride carbonica che, allontanandosi dal mosto, provoca un calo in peso di tutto il sistema. L'andamento della fermentazione può essere seguito con pesate quotidiane fino al momento in cui il peso rimane costante. Il calo in peso com-

plessivo fornisce già un'idea esatta dell'intensità del carattere che, poi, troverà conferma nella determinazione dell'etanolo prodotto. L'inibizione dello sviluppo e l'arresto della fermentazione sono una conseguenza dell'accumulo di etanolo all'interno delle cellule.

S. cerevisiae è il lievito dotato di maggiore alcol-tolleranza in assoluto. Il carattere, espresso in termini di volumi di etanolo in 100 ml, varia da un minimo di 8 fino ad un massimo di 18.

Il vigore fermentativo esprime la prontezza con cui un ceppo dà inizio alla fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine (Zambonelli et al., 2000). Ciascun ceppo di *S. cerevisiae* si moltiplica con un proprio tempo di generazione, cosicché lo sviluppo di ceppi differenti, a parità di condizioni, non avviene mai in modo sincrono. Il vigore fermentativo è carattere la cui espressione non può essere messa in rapporto con una particolare reazione enzimatica o con un particolare aspetto del metabolismo cellulare, ma può essere determinato solo per comparazione fra ceppi (Zambonelli et al., 2000).

L'anidride solforosa è un antisettico la cui azione sulle cellule microbiche è molto complessa. *S. cerevisiae* è un lievito che mostra una grande varietà di comportamenti verso l'anidride solforosa. In presenza di 100 mg/L e con un valore di pH = 3, circa il 30% dei ceppi è in grado di dare origine ad una fermentazione il cui andamento non risente (o risente poco) della presenza del composto, mentre quasi altrettanti sono inibiti (Zambonelli et al., 2000). Il carattere è di grande importanza tecnologica e non è in rapporto né con il potere fermentativo né con il vigore fermentativo.

Caratteri di qualità

I lieviti possono influire sulla composizione dei vini con due differenti modalità:

- per la capacità o l'incapacità di produrre, durante lo sviluppo e la fermentazione, quantità più o meno elevate, di determinati composti che agiscono sulla qualità dei vini;
- per la capacità di agire su alcune sostanze dei mosti provocando, quindi, cambiamenti nella composizione chimica.

I caratteri di qualità che possiamo riscontrare sono:

- produzione di glicerolo, acido succinico, acido acetico, aldeide acetica, acetoino, alcoli superiori, composti dello zolfo (acido solfidrico e anidride solforosa);
- azione su acido malico (degradazione e sintesi);
- attività enzimatiche (attività β -glucosidica, esterasica, proteolitica);
- produzione di polisaccaridi, ammine biogene, urea.

Bibliografia

D.M. 10 ottobre 1977. Impiego dei lieviti selezionati in enologia. Gazzetta Ufficiale n. 281 del 14 ottobre 1977.

Francesca N., Canale D.E., Settanni L., Moschetti G.. Dissemination of wine related yeasts by migratory birds. *Environmental Microbiology Reports*, 2012.

Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Aponte M., Settanni L., Moschetti G.. Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello Bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 337-351, 2010.

Gayevskiy V., Goddard M.R.. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *The ISME Journal*, 6, 1281-1290, 2011.

Lachance M.A., Gilbert D.G., Starmer W.T.. Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in eastern oak-pine forests: a comparison with western communities. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 484-494, 1994.

Lopes C.A., van Broock M., Querol A., Caballero A.C.. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 608-615, 2002.

Mazzei P., Francesca N., Moschetti G., Piccolo A.. NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from Aglianico grapes. *Analytica Chimica Acta*, 673, 167-172, 2010.

Mercado L., Dalcerio A., Masuelli R., Combina M.. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24, 403-412, 2007.

Mills D.A., Johannsen E., Cocolin L.. Yeast diversity and persistence in Botrytis affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4884-4893, 2002.

Phaff H.J., Knapp E.P.. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 22, 117-130, 1956a.

Phaff H.J., Miller M.W., Reccda J.A., Shifrine M., Mrak E.M.. Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California. II Yeast found in the alimentary canal of *Drosophila*. *Ecology*, 37, 533-538, 1956b.

Pretorius I.S.. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729, 2000.

Pretorius I.S., Westhuizen T.J.. The impact yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 12, 3-31, 1991.

Renouf V., Miot-Sertier C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A.. The wine microbial consor-



tium: a real terroir characteristic. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40, 209-216, 2006.

Schuller D., Alves H., Dequin S., Casal M.. Ecological survey of *Saccharomyces* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 167-177, 2005.

Sipiczki M.. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 2079-83, 2003.

Stevic S.. The significance of bees (*Apis* sp.) and wasps (*Vespa* sp.) as carriers of yeast for the microflora of grapes and the quality of wine. *Arhiv zav Poljoprivredne Nauke*, 50, 80-92, 1962.

Valero E., Schuller D., Cambon B., Casal M., Dequin S.. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Research*, 5, 959-969, 2005.

Zambonelli C., Tini V., Castellari L.. Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia (a cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali). Edagricole, 2000.







Capitolo 7

A ciascuna cantina il proprio lievito autoctono



Modalità di ottenimento e d'impiego su scala aziendale di un lievito autoctono selezionato







7. A ciascuna cantina il proprio lievito autoctono

Giancarlo Moschetti, Nicola Francesca e Luca Settanni

Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Perché mai ogni cantina dovrebbe produrre vino usando il proprio lievito autoctono? La risposta nasce (forse) dai limiti che l'applicazione dei lieviti autoctoni di un'intera area territoriale ha, molto spesso, sul territorio di origine.

Se è vero che un areale viticolo D.O.C.G. è naturalmente strutturato in decine di comuni, contrade e località, è altrettanto vero che il numero di differenti sottozone pedoclimatiche di cui si compone risulta elevato.

Dunque, può il medesimo ceppo di lievito, benché "autoctono", esprimere al meglio la complessità gusto-olfattiva di decine e decine di mosti ottenuti dalla stessa cultivar ma appartenenti a differenti ambienti pedoclimatici? Tecnicamente, sì. Con elevata probabilità è in grado di portare a termine la fermentazione alcolica senza causare alterazioni, ma potrebbe, altresì, impartire a vini potenzialmente diversi caratteristiche sensoriali simili, laddove, ovviamente, si applicano simili tecnologie di produzione. Pertanto, è giusto affermare che l'impiego dello stesso ceppo autoctono nel suo "intero" areale di origine ridurrebbe, ad un livello intra-regionale, l'omologazione dei vini, pur senza eliminarla?

Probabilmente, è un'affermazione corretta, ma, d'altra parte, l'impiego di starter autoctoni in macrozone viticole rappresenterebbe il primo passo verso una differenziazione dei vini in funzione anche del proprio "terroir microbico". Inoltre, in quest'ottica, rafforzare le note comuni fra vini appartenenti allo stesso areale viticolo attraverso caratteri non solo varietali ma anche microbiologici può rappresentare un vantaggio per i vini a denominazione d'origine. Di sicuro, considerate le attuali tendenze di mercato e l'elevata sensibilità dei consumatori verso le produzioni di origine, per un'azienda che voglia fondare la qualità dei propri vini sulla "tipicità del diverso", l'uso di uno starter unico, perché isolato nei propri vigneti, potrebbe rappresentare un vantaggio in termini di riconoscibilità sul mercato.



Ma come realizzare uno starter microbico a partire dalle proprie uve? La figura 2, qui di seguito riportata, riassume brevemente le attività da mettere in atto per isolare, identificare e selezionare uno starter microbico autoctono.

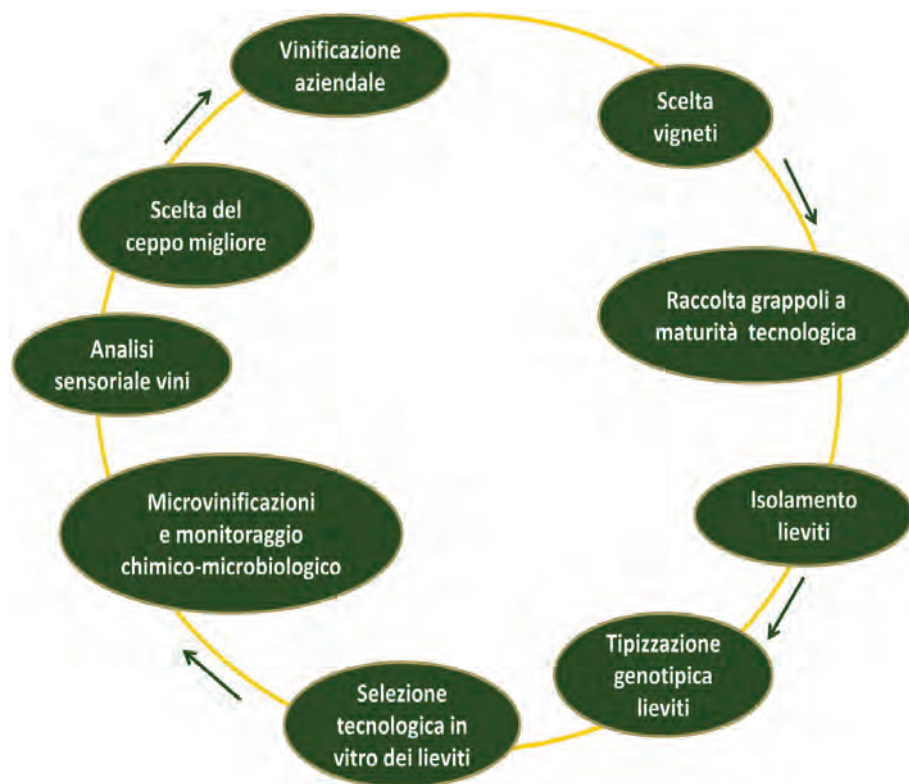


Figura 2 - Fasi di realizzazione di una starter microbico autoctono

Ovviamente, è necessario l'ausilio di laboratori e di personale specializzato, ma la selezione e la diffusione commerciale di ceppi autoctoni è, ad oggi, ampiamente standardizzata e di rapida realizzazione.

Capitolo 8

Lavoro sperimentale per il vino Fiano di Avellino D.O.C.G.



Fasi per l'ottenimento di un lievito autoctono selezionato per il vino Fiano di Avellino D.O.C.G.
e sua applicazione su scala aziendale



8. Lavoro sperimentale: fasi per l'ottenimento di uno starter autoctono per il vino Fiano di Avellino D.O.C.G.

Giancarlo Moschetti¹, Nicola Francesca¹, Ciro Sannino¹, Luca Settanni¹, Raffaele Romano² e Laura Le Grottaglie²

¹ Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

² Dipartimento Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli, Federico II

Nel mese di settembre 2009, ha preso avvio lo studio dei lieviti associati alla cultivar Fiano all'interno dell'areale di produzione del Fiano di Avellino D.O.C.G.. Sono state selezionate diverse zone vitate da cui sono stati ottenuti dei mosti impiegati per l'ottenimento di lieviti con spiccata attitudine enologica da impiegare come starter autoctoni per la produzione di vini Fiano di Avellino D.O.C.G..

A tale scopo, nell'areale di produzione del Fiano di Avellino D.O.C.G., sono state classificate diverse zone viticole sulla base di specifiche caratteristiche pedoclimatiche, così da ottenere, nella successiva fase di isolamento dei lieviti, una più elevata biodiversità microbica. In ciascuna delle zone viticole selezionate, sono stati prelevati campioni dei mosti, da cui sono state isolate ed identificate le principali specie di lieviti associati alla cultivar Fiano.

Tutti gli isolati ascrivibili alla specie *S. cerevisiae* sono stati caratterizzati a livello di ceppo e sottoposti a numerosi saggi tecnologici in vitro ai fini di selezionare il ceppo con le migliori caratteristiche enologiche per la produzione del vino Fiano.

Nel mese di settembre 2010, fra tutti i lieviti selezionati in laboratorio, il ceppo *S. cerevisiae* STAPACEPICA-1 è stato impiegato in una vinificazione sperimentale, su scala aziendale, di uve Fiano di Avellino. Il processo enologico è stato monitorato da un punto di vista microbiologico, chimico-fisico e sensoriale. In qualità di controllo, è stato impiegato un ceppo commerciale di *S. cerevisiae*, comunemente impiegato in vinificazioni aziendali di uve Fiano.

Confermata la capacità da parte del ceppo *S. cerevisiae* STAPACEPICA-1 di produrre vino Fiano e contribuire in modo significativo alla tipicità del prodotto finito, nel mese di settembre 2011 è stata avviata la fase di diffusione com-

merciale del suddetto ceppo. A tutti i produttori di Fiano di Avellino D.O.C.G. è stata offerta la possibilità di impiegare, gratuitamente, il ceppo *S. cerevisiae* STAPA-CEPICA-1 da noi selezionato.

8.1. Campionamento dei grappoli ed acini d'uva Fiano di Avellino

Nell'areale vitivinicolo "Fiano di Avellino D.O.C.G.", sono stati individuati 8 siti (figure 3) di campionamento di uve (figure 4a-h) con differenti caratteristiche pedoclimatiche, come mostrato in tabella 1.

I prelievi sono stati eseguiti privilegiando la raccolta di acini e grappoli beccati da uccelli e/o punti da insetti e/o rotti, in quanto, sulla base dei dati raccolti in letteratura, rispetto ai grappoli integri, essi sono normalmente associati ad una più ampia biodiversità blastomicetica, oltre che ad una più alta presenza di lieviti resistenti su mezzi selettivi (Francesca et al., 2010).

Ogni vigneto è stato suddiviso in tre sub-aree di 100 m² ognuna e distanti fra loro circa 100-500 m. All'interno di ciascuna sub-area, oltre ad un campionamento random di 500 acini d'uva, sono stati raccolti 5 grappoli, cercando di ottenere la massima rappresentatività della microflora blastomicetica.



Figura 3 - Zone di campionamento dell'areale Fiano di Avellino D.O.C.G.

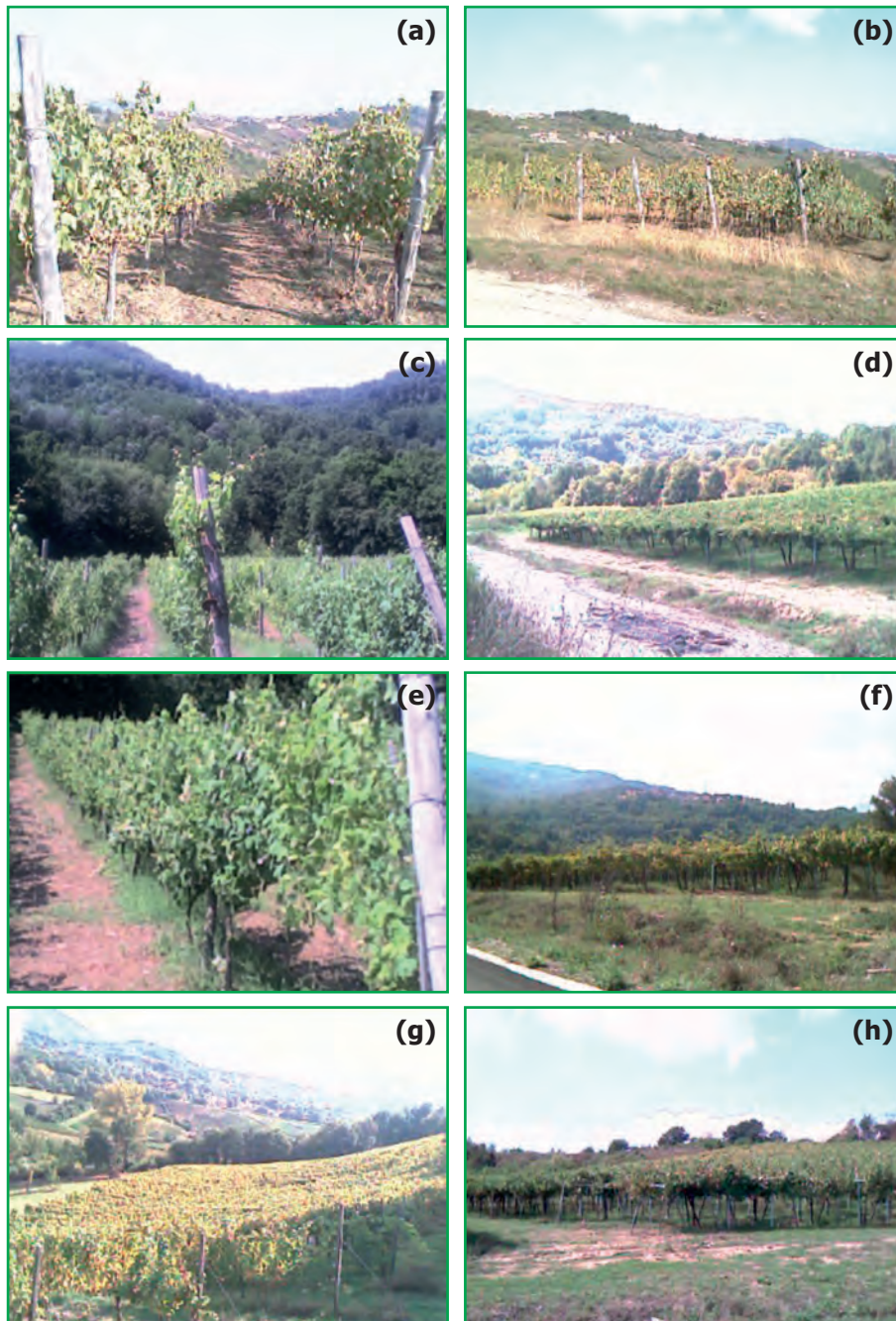


Figura 4 - Foto dei vigneti campionati nell'areale Fiano di Avellino D.O.C.G. (a), comune di Montefalcione (AV); (b), comune di Contrada (AV) (c), comune di Salza Irpina (AV); (d), comune di Lapio (AV); (e), comune di Montefredane (AV); (f), comune di Santo Stefano del Sole (AV); (g), comune di San Michele Pratola (AV); (h), comune di Capriglia (AV)

Tabella 1 - Caratteristiche pedoclimatiche dei vigneti campionati nell'areale Fiano di Avellino D.O.C.G.

	Capriglia	Contrada	Lapio	Montefalcione	Montefredane	Salza Irpina	S. Michele Pratola	S. Stefano del Sole
Altitudine (m.s.l.m)	432	380	521	450	400	488	323	550
Esposizione	Sud-Est	Sud-Est	Sud-Est	Sud-Est	Nord-Est	Sud-Est	Sud-Est	Sud-Est
Età vigneto (anni)	40	20	9	10	12-25	12	18	14
Tipologia terreno	Sciolto	Arg.	Cal.-Arg.	Medio impasto	Arg.-Cal.	Arg.	Cal.-Tuf.	Cal.-Arg.
Sistema allevamento	Cts	Cts	Cts	Cts	Cts	Cts	Tend.mod.	Cts
Potatura	Cordone	Guyot	Guyot	Guyot	Cordone-Guyot	Guyot	Cordone	Guyot
Produzione (qL/ha)	60	40-50	70	80-90	50	40-50	120	70
Urbanizzazione zona	Abitata	Abitata	Non abitata	Abitata	Boschiva abitata	Abitata	Boschiva non abitata	Boschiva non abitata

Abbreviazioni: m.s.l.m, metri sul livello del mare; Cal., calcareo; Arg., argilloso; Tuf., tufaceo; Cts, contropalliera; Tend. mod., tendone modificato

8.2. Allestimento delle microfermentazioni spontanee

I grappoli e gli acini provenienti dalla medesima sub-area di ciascun vigneto sono stati inseriti in busta sterile, trasportati in laboratorio mantenendo la temperatura costante a 4°C e successivamente pressati attraverso un omogeneizzatore a pale. I mosti, così ottenuti, sono stati trasferiti in contenitori sterili (volume 5 litri) (figura 5), addizionati di metabisolfito di potassio (MBSK) (0,20 mg/ml) ed incubati ad una temperatura di 17°C, fino al totale consumo degli zuccheri. In questo modo, sono state avviate delle microfermentazioni spontanee in cui la presenza di MBSK ha creato una parziale selezione dei lieviti, favorendo lo sviluppo delle specie resistenti al MBSK e, quindi, con una potenziale attitudine tecnologica.

Poiché il numero di specie/ceppi di lievito subisce una forte evoluzione durante la fermentazione alcolica spontanea, per poter ottenere una più ampia biodiversità fra gli isolati, in particolare, in termini di ceppi di *S. cerevisiae*, abbiamo analizzato i mosti in diverse fasi del processo fermentativo. Per tale motivo, i campioni sottoposti ad analisi sono stati: mosto appena ottenuto (M0), mosto ad 1/3 (M1) e mosto a 3/3 (M2) del consumo degli zuccheri.

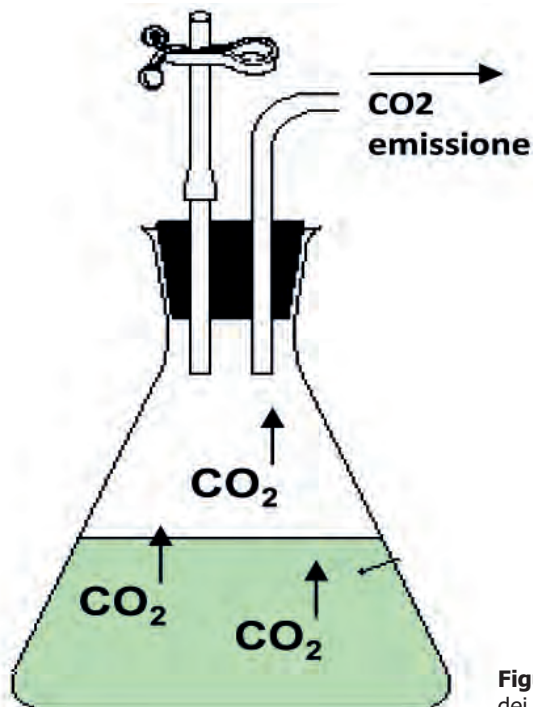


Figura 5 - Beuta di microfermentazione dei mosti d'uva

8.3. Conta ed isolamento dei lieviti

Da ciascuno dei suddetti campioni sono state prelevate quantità pari a 1 ml, le quali sono state sottoposte a diluizioni decimali seriali in soluzione fisiologica (0,8% p/v, NaCl) ed aliquote di 0,1 ml di tali diluizioni sono state inoculate in capsule Petri, in duplice copia, a cui è stato addizionato il terreno colturale WL Nutrient Agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Le piastre, così inoculate, sono state incubate per 48-72 ore a 28°C. Su tale substrato, grazie a specifiche componenti, i lieviti appartenenti a generi/specie differenti sviluppano, in seguito alla crescita, un "aspetto" (morfologia della colonia microbica) diverso in termini di colore, dimensioni, consistenza, etc. Tutto ciò facilita la selezione di colonie ascrivibili a differenti generi/specie di lieviti.

In corrispondenza della fine della fermentazione alcolica (M2), tutti i campioni sono stati inoculati, oltre che su WL agar, anche su Modified Ethanol Sulphide Agar (MESA) (Francesca et al., 2010) che, grazie alle componenti selettive (etanolo e MBSK) contenute nel substrato, risulta particolarmente utile ai fini dell'isolamento dei presunti *Saccharomyces* spp.. In questo modo, è possibile ottenere un maggior numero di isolati con potenziali attitudini tecnologiche e, quindi, incrementare le probabilità di isolare validi starter enologici. Le piastre contenenti i substrati di crescita, su cui sono sviluppate le colonie dei lieviti, sono state sottoposte a conteggio ed hanno fornito i risultati mostrati in tabella 2.

Sulla base delle differenti morfologie delle colonie su WL agar sono stati selezionati 522 lieviti. Inoltre, dalle piastre contenenti il terreno selettivo di crescita MESA sono state isolate 96 colonie.

Tutte le colture isolate sono state, successivamente, purificate (figura 6) su WL agar e conservate a - 80°C in brodo malto, previa addizione di glicerolo (30% v/v). Tutte le analisi sono state condotte in doppio.

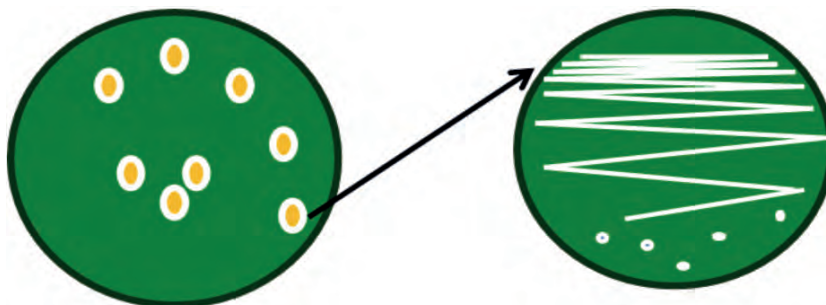


Figura 6 - Purificazione delle colonie di lieviti mediante striscio su piastra contenente specifico substrato nutritivo

Tabella 2 - Conte (UFC/ml) microbiche e identificazione molecolare degli isolati durante le microfermentazioni

Zone viticole	Campioni	Carica microbica	Specie
Capriglia	M0	2,30x10 ⁵	<i>H. uvarum</i> ,
	M1	1,18x10 ⁷	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M2	8,80x10 ⁷	<i>Zygosaccharomyces spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Contrada	M0	3,30x10 ⁵	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>I. terricola</i>
	M1	2,20x10 ⁸	<i>H. uvarum</i> , <i>I. terricola</i>
	M2	5,60x10 ⁷	<i>I. terricola</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M0	2,20x10 ⁵	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i>
Lapio	M1	1,74x10 ⁷	<i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M2	8,30x10 ⁷	<i>M. pulcherrima</i> , <i>I. terricola</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Montefalcione	M0	1,06x10 ⁶	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>I. terricola</i> ,
	M1	1,56x10 ⁸	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M2	5,50x10 ⁷	<i>C. zemplinina</i> , <i>Zygosaccharomyces spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M0	1,15x10 ⁶	<i>H. uvarum</i>
Montefredane	M1	1,59x10 ⁸	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M2	2,90x10 ⁷	<i>I. terricola</i> , <i>Zygosaccharomyces spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Salza Irpina	M0	1,00x10 ⁵	<i>H. uvarum</i>
	M1	1,44x10 ⁸	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>P. guilliermondii</i>
San Michele	M2	7,10x10 ⁷	<i>H. uvarum</i> , <i>I. terricola</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M0	1,00x10 ⁴	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i>
Pratola	M1	1,27x10 ⁸	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i>
	M2	1,48x10 ⁸	<i>I. terricola</i> , <i>Zygosaccharomyces spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Santo Stefano del Sole	M0	7,50x10 ⁵	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i>
	M1	1,09x10 ⁷	<i>H. uvarum</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>I. terricola</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	M2	2,00x10 ⁸	<i>M. pulcherrima</i> , <i>I. terricola</i> , <i>S. cerevisiae</i>

Abbreviazioni: P., *Pichia*; C., *Candida*; H., *Hanseniaspora*; I., *Issatchenkia*; M., *Metschnikovia*; S., *Saccharomyces*; M0, mosto appena ottenuto; M1, mosto in fermentazione ad 1/3 del consumo degli zuccheri; M2, mosto in fermentazione a 3/3 del consumo degli zuccheri

A ciascuno degli isolati messi in collezione, ovvero preservati a basse temperature, è stato attribuito un codice, così da risalire facilmente al mosto da cui è stato isolato, alla zona viticola d'origine ed alla concentrazione raggiunta in fase di microfermentazione. Conoscere la zona d'origine dell'isolato microbico è indispensabile per progettare uno starter da impiegare in un certo areale produttivo.

Inoltre, conoscere la concentrazione a cui il lievito è stato isolato dal mosto in fermentazione può fornire un indizio sulla capacità di tale microrganismo di svilupparsi nel mosto e, quindi, dominare il processo fermentativo. Ad esempio, un lievito isolato a concentrazioni di 10^5 - 10^7 UFC/ml da un mosto a fine fermentazione sarà caratterizzato, con buona probabilità, da proprietà tecnologiche (tolleranza all'etanolo, etc.) interessanti e candidato ad essere un potenziale starter microbico.

Le probabilità che tale microrganismo sia enologicamente valido aumentano se esso appartiene a specie di lieviti (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *C. zemplinina*, *T. delbrueckii*) notoriamente impiegate come starter enologici. Per tale motivo, ai fini della progettazione di uno starter, è indispensabile che alla fase di conta e di isolamento dei lieviti segua quella di identificazione fenotipica e/o genotipica.

8.4. Identificazione fenotipica e molecolare dei lieviti

L'attribuzione "certa" della specie a ciascuno dei lieviti isolati, così come la tipizzazione a livello di ceppo, è di fondamentale importanza ai fini di una rapida e corretta selezione degli starter microbici da impiegare su scala aziendale. Prima di sottoporre gli isolati allo screening tecnologico, basato su una serie complessa e costosa di saggi in vitro, è necessario conoscere quali specie e quanti ceppi, ovvero quanti microrganismi geneticamente diversi fra loro, sono presenti tra i lieviti isolati.

A titolo di esempio: avere in collezione 100 ceppi microbici significa avere altrettanti microrganismi, ciascuno caratterizzato da un genoma unico che si esprimerà, con una certa probabilità, in attività metaboliche uniche per tipologia ed intensità e che potrà incidere sulla composizione chimico-organolettica di un vino contribuendo alla formazione di un prodotto unico.

Lo sviluppo crescente della biologia molecolare e l'introduzione di tecniche sempre più avanzate hanno permesso di eliminare parecchie ambiguità tassonomiche e di semplificare notevolmente l'identificazione dei microrganismi (Fer-

nández et al., 1999). Infatti, diversi studi effettuati sui lieviti del vino e basati su metodiche molecolari hanno fornito risultati più precisi e sicuri, perché svincolati dalla variabilità fenotipica (Cocolin et al., 2001; Baleiras Couto et al., 1995).

Nel presente lavoro, tutti gli isolati blastomicetici in coltura pura sono stati raggruppati in base alla morfologia della colonia (su WL agar) e della cellula (al microscopio) e circa 3 isolati, per ciascun gruppo morfologico, sono stati, successivamente, identificati a livello di specie.

Tutte le colture selezionate sono state sottoposte ad estrazione del DNA mediante il kit InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), in accordo alle istruzioni fornite dal produttore e, successivamente, sottoposte ad analisi inter-specifiche.

Le analisi sono state condotte mediante un approccio polifasico basato su diverse tecniche di biologia molecolare. Una prima differenziazione dei lieviti è stata ottenuta mediante amplificazione e successiva digestione per via enzimatica del gene 5.8S-ITS rRNA (figura 7) per valutarne i relativi polimorfismi genetici (restriction fragment length polymorphism -RFLP- analysis) (Esteve-Zaroso et al., 1999). I prodotti di amplificazione ITS, così come i relativi frammenti di digestione, sono stati caricati su un gel di agarosio e visualizzati attraverso un transilluminatore UV.

Per verificare l'esattezza del primo raggruppamento ed eventualmente approfondire la discriminazione fra le specie di lieviti, circa 5 isolati rappresentativi di ciascun gruppo 5.8S-ITS-RFLP sono stati sottoposti ad un'ulteriore analisi di restrizione che ha avuto come gene target il 26S rRNA (Baleiras-Couto et al., 2005). I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati come descritto sopra. Con lo scopo di confermare il raggruppamento e l'identificazione ottenuta con la quantificazione dei frammenti derivanti dalle due analisi di restrizione (5.8S-ITS-RFLP e 26S-FRLP), un isolato per ciascun gruppo è stato ulteriormente analizzato mediante sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA (O'Donnell, 1993).

La purificazione e il sequenziamento dei prodotti di amplificazione sono stati realizzati presso la PRIMM S.r.l. (Milano, Italia). Le sequenze così ottenute sono state caricate in Banca Dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e analizzate mediante il programma BlastN ottenendo così l'identificazione a livello di specie. In tutte le zone viticole campionate, è stata riscontrata la presenza di molte specie sia nei mosti (M0) che durante le microfermentazioni (M1 e M2) (tabella 2). Nel presente lavoro, *Hanseniaspora uvarum* è risultata particolarmente presente in tutte le zone campionate, ma quasi esclusivamente nei mosti appena

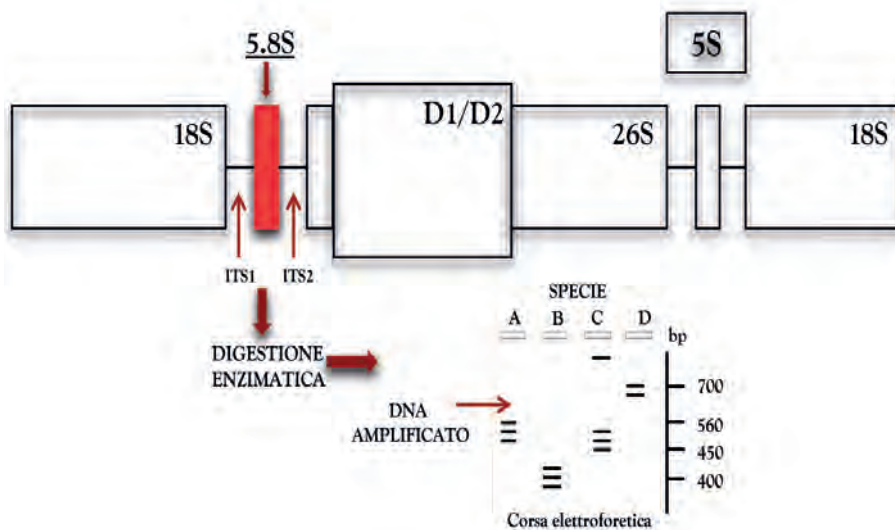


Figura 7 - Amplificazione e digestione enzimatica del gene 5.8S-ITS rDNA e relativi profili di restrizione visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio

ottenuti (M0) e nei primi giorni di fermentazione (M1). I lieviti appartenenti a tale genere, infatti, possono raggiungere nel mosto cariche microbiche elevate (10^3 - 10^6 UFC/ml) e dominare le prime fasi della fermentazione alcolica, risultano poco resistenti ad elevate concentrazioni di etanolo e sono in grado di produrre elevate quantità di composti volatili.

Le specie *M. pulcherrima* e *Issatchenkia terricola* sono state isolate in quasi tutti i vigneti, ma con minore frequenza rispetto alle precedenti specie.

M. pulcherrima è stata isolata maggiormente nelle fasi iniziali e al terzo giorno di fermentazione, ma raramente nella fase finale delle microfermentazioni (tabella 2). Una sua caratteristica fisiologica è quella di crescere in presenza di elevate concentrazioni zuccherine (50-60% glucosio p/v) e di avere un basso potere alcoligeno (Vincenzini et al., 2005).

La presenza di alcol nel mosto determina un elevato stress fisiologico che induce tale specie ad una sintesi più o meno elevata di esteri, formati da alcoli superiori ed acidi grassi a 10-12 atomi di carbonio, la cui concentrazione arricchisce il vino di aromi fruttati. Recenti studi hanno dimostrato e quantificato la sintesi di questi aromi, tanto che propongono di affiancare questa specie a *S. cerevisiae*, mediante la formulazione di un unico starter commerciale (Parapoli et al., 2010).

Issatchenkia terricola risulta, quasi sempre, presente su grappoli e mosti appena ottenuti, ma può essere presente anche nelle fasi centrali della fermentazione.

Il genere *Zygosaccharomyces* spp. è stato maggiormente ritrovato in corrispondenza del 13° giorno di microfermentazione, confermandone la buona tolleranza all'alcool etilico e all'anidride solforosa (Vincenzini et al., 2005). Diverse specie ascrivibili a questo genere, tra cui *Z. bailii* e *Z. rouxii*, se presenti nel mosto, possono arricchirne il bouquet aromatico nei primi giorni di fermentazione, mentre, con l'aumentare della concentrazione di etanolo, il relativo stress fisiologico determina un aumento di acido acetico, nonché possibili odori sgradevoli (Martorell et al., 2007).

Pichia guilliermondii e *Candida zemplinina* sono i lieviti riscontrati in numero minore rispetto al totale delle colture identificate e sono stati rilevati nelle fasi iniziali (M1) e finali (M2) delle microfermentazioni (tabella 2). I lieviti del genere *Pichia* spp. sono comunemente associati ai grappoli d'uva ed alle prime fasi della fermentazioni, senza avere, però, un ruolo fondamentale ai fini della qualità del fermentato.

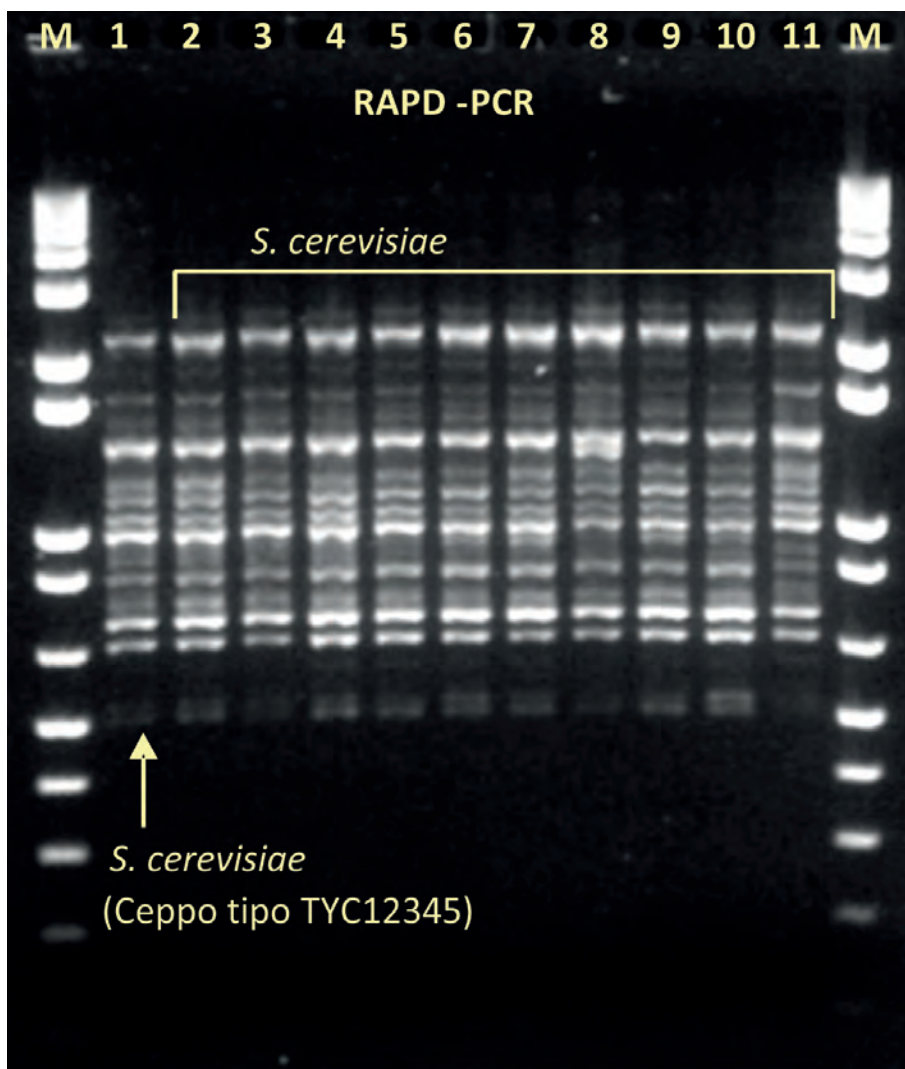
D'altra parte, *Candida zemplinina* è stata recentemente inquadrata come lievito dalle spiccate caratteristiche enologiche, osmotollerante, produttore di elevate quantità di glicerolo, ridotta acidità volatile e, per questo motivo, impiegata come starter in coltura mista con *S. cerevisiae*.

Dunque, è facilmente intuibile che molti degli isolati ascrivibili alle specie sopra elencate, anche se appartenenti al gruppo dei non-*Saccharomyces*, rappresentano dei potenziali starter microbici da usare in colture miste con *S. cerevisiae*. Tutto ciò potrebbe consentire l'avvio di nuove ricerche nell'ambito del miglioramento qualitativo dei vini, compreso il Fiano D.O.C.G..

8.5. Tipizzazione degli isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae*

Tutte le colture ascrivibili alla specie *S. cerevisiae* sono state ulteriormente differenziate a livello di ceppo. Pertanto, tutti gli isolati sono stati sottoposti ad amplificazione RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction).

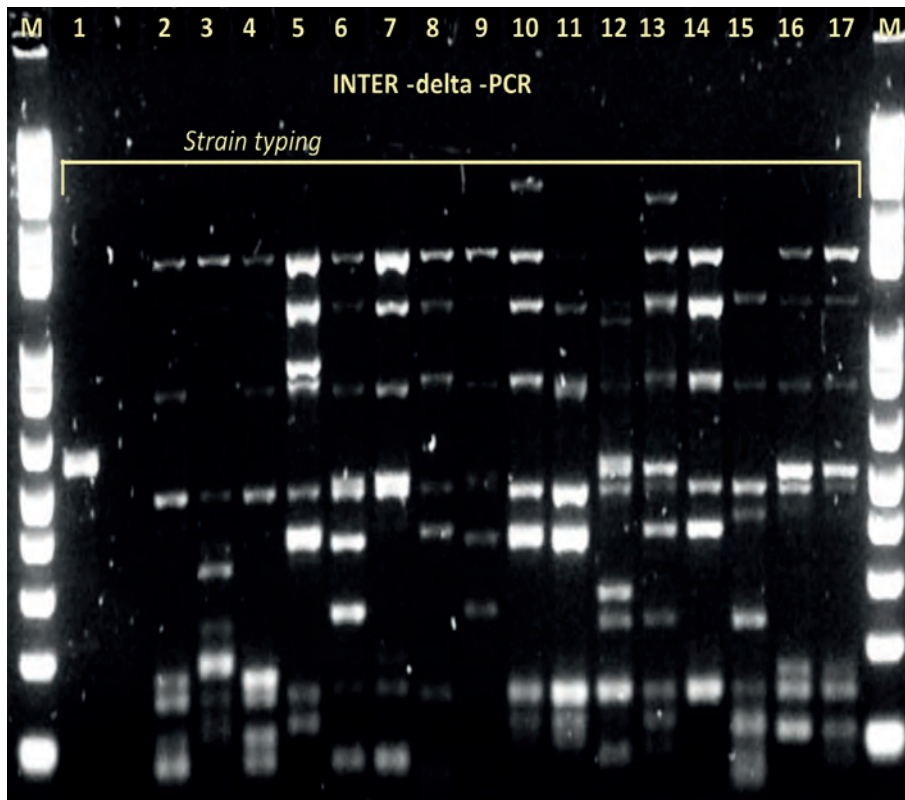
Gli isolati hanno mostrato un profilo genetico uguale a quello del ceppo tipo *S. cerevisiae* 1942T (figura 8) e riuniti in un unico cluster. Tale risultato ha permesso di confermare l'appartenenza degli isolati alla specie *S. cerevisiae* senza discriminarli a livello di ceppo.



Profili RAPD-PCR degli isolati *S. cerevisiae* ottenuti con il primer XD5. Corsie: M, marcatore molecolare 1Kb Plus Invitrogen; da 1 a 11, alcuni isolati *S. cerevisiae*

Figura 8 - Raggruppamento molecolare dei lieviti *S. cerevisiae* isolati da Fiano

Tutte le colture sono state, successivamente, sottoposte ad analisi delle sequenze interdelta, ottenendo un'elevata variabilità dei polimorfismi genetici. Come si evince dalla figura 9, tale tecnica ha permesso di discriminare gli isolati *S. cerevisiae* in 17 ceppi differenti confermando la positività di questa metodica, ottimizzata da Legras et al. nel 2003 e riproposta per lo *strains typing* di lieviti filmogeni da Charpentier et al. nel 2009.

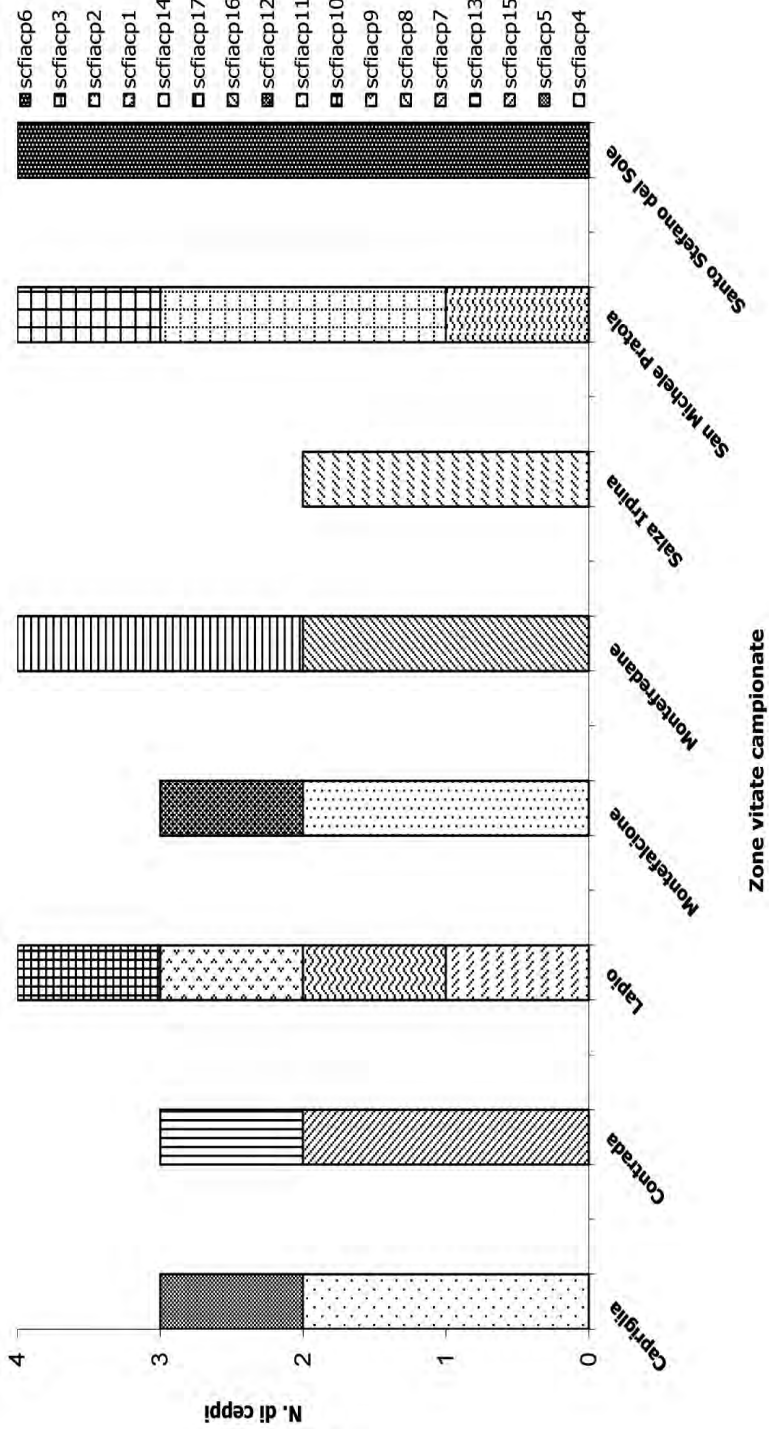


Profili INTER-delta-PCR di alcuni ceppi di *S. cerevisiae* ottenuti con i primers delta12/delta21. Corsie: M, marcatore molecolare 1Kb Plus Invitrogen; da 1 a 17, ceppi di *S. cerevisiae*

Figura 9 - Discriminazione molecolare dei ceppi di lievito *S. cerevisiae* isolati da Fiano

È interessante notare come in alcuni casi siano stati isolati differenti biotipi dalla medesima microfermentazione e appartenenti alla stessa zona di campionamento. Gli isolamenti effettuati dalle microfermentazioni Lapio e San Michele Pratola hanno restituito il maggior numero di biotipi (figura 10).

Figura 10 - Distribuzione numerica dei ceppi di *S. cerevisiae* isolati nelle diverse zone vitate soggette a campionamento



8.6. Screening tecnologico dei ceppi di *S. cerevisiae*

Tutti i ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* sono stati sottoposti ad una serie di test in vitro con lo scopo di selezionare quelli con la migliore attitudine a fermentare un mosto di uve Fiano di Avellino. Il primo saggio a cui sono stati sottoposti i ceppi ha riguardato la produzione di idrogeno solforato (H_2S), composto responsabile del tipico *off-flavour* dei vini (odore di ridotto, uova marcia, etc.) su Bismuth Sulfite Glucose Glycerin Yeast extract (BiGGY) agar (Oxoid) (Jiranek et al., 1995).

Tutti i ceppi caratterizzati da una bassa produzione di H_2S (tabella 3) sono stati testati in base alla loro capacità di svilupparsi in substrato nutritivo (MESA) contenente diverse concentrazioni di etanolo (dal 12 al 16% v/v) e di MBSK (da 50 a 300 mg/L) (Settanni et al., 2012). Questo test risulta di fondamentale importanza, in quanto la tolleranza all'etanolo e al MBSK sono caratteri indispensabili affinché uno starter possa avviare e portare a termine la fermentazione alcolica. In base ai risultati ottenuti nei precedenti saggi, i ceppi migliori sono stati caratterizzati per la produzione di acido acetico (Caridi et al., 2002) e testati in base alla loro capacità di crescita in presenza di differenti concentrazioni (da 50 a 500 $\mu\text{mol/L}$) di solfato di rame (CuSO_4) (Fiore et al., 2005). La presenza del rame sulle uve e nei mosti, in seguito ai trattamenti fitosanitari effettuati in campo, può raggiungere concentrazioni tali da inibire le attività metaboliche dei lieviti, generando, in cantina, anche rallentamenti e/o arresti di fermentazione. I ceppi dotati di bassa produzione di acido acetico ed elevata resistenza al CuSO_4 (tabella 3) sono stati ulteriormente testati per la loro capacità di svilupparsi alle temperature di 13, 17 e 25°C, produrre quantità limitate di schiuma (Regodón et al., 1997) e svilupparsi in mezzo liquido in modalità polverulenta. Dieci ceppi, fra tutti quelli testati, hanno fornito risultati tecnologicamente interessanti.

Ad oggi, molti dei produttori di vini bianchi scelgono di condurre una fermentazione alcolica a temperature non superiori ai 18°C, così da ridurre la perdita di aromi, soprattutto varietali, e consentire una lenta ma costante attività fermentativa dei lieviti in grado di contribuire maggiormente alla complessità organolettica del prodotto finito.

Al fine di svolgere correttamente i saggi in vitro, evitando errori nell'interpretazione dei risultati, tutti i test sono stati condotti in presenza dei controlli (CP1 e CP2), ovvero due ceppi di lieviti (collezione del Dip. SAF, Università degli Studi di Palermo) noti per le loro attitudini tecnologiche. Tutte le analisi sopra riportate sono state condotte in triplo.

Tabella 3 - Screening tecnologico dei ceppi di *S. cerevisiae*

Codice ceppo	H ₂ S ^a	Etanolo ^b	MBSK ^c	CuSO ₄ ^d	CaCO ₃ ^e	13°C ^f	17°C ^g	Tipo di crescita ^h	Schiuma
scfiacp1	1	3	4	9	+	-	-	S	F0
scfiacp2	2	3	5	9	-	+	+	S	F1
scfiacp3*	1	4	5	10	-	+	+	S	F0
scfiacp4	1	2	5	8	-	-	-	S	F1
scfiacp5*	0	4	6	9	-	+	+	S	F0
scfiacp6*	0	4	6	10	-	+	+	S	F0
scfiacp7*	1	4	6	10	-	+	+	S	F0
scfiacp8	1	2	3	8	+	-	-	S	F0
scfiacp9	4	3	5	8	-	-	-	S	F1
scfiacp10*	0	4	5	10	-	+	+	S	F0
scfiacp11	1	3	6	10	+	+	+	S	F0
scfiacp12	2	3	6	10	-	+	+	S	F0
scfiacp13*	1	4	6	10	-	+	+	S	F0
scfiacp14*	0	4	5	9	-	+	+	S	F1
scfiacp15*	1	4	5	10	-	+	+	S	F0
scfiacp16*	0	4	6	10	-	+	+	S	F0
scfiacp17*	0	4	6	10	-	+	+	S	F0
CP1	0	4	6	10	-	+	+	S	F0
CP2	0	4	6	10	-	+	+	S	F0

^a Colore delle colonie cresciute sul terreno Biggy agar: 0 = bianco; 1 = beige; 2 = marrone chiaro; 3 = marrone; 4 = marrone scuro; 5 = nero

^b 0, 0% (v/v); 1, 10% (v/v); 2, 12% (v/v); 3, 14% (v/v); 4, 16% (v/v) di etanolo contenuto nelle piastre di MESA a cui i ceppi hanno mostrato crescita

^c 50 mg/L; 2, 100 mg/L; 3, 150 mg/L; 4, 200 mg/L; 5, 250 mg/L; 6, 300 mg/L di MBSK contenuto nelle piastre di MESA a cui i ceppi hanno mostrato crescita

^d 0, 0 µM; 1, 50 µM; 2, 100 µM; 3, 150 µM; 4, 200 µM; 5, 250 µM; 6, 300 µM; 7, 350 µM; 8, 400 µM; 9, 450 µM; 10, 500 µM di CuSO₄ contenuto nelle piastre di YPD agar a cui i ceppi hanno mostrato crescita

^e +, alone di precipitazione rilevabile; -, alone di precipitazione non rilevabile sulle piastre di CaCO₃ agar

^f +, crescita; -, non crescita a 13°C nel terreno YPD

^g +, crescita; -, non crescita a 17°C nel terreno YPD

^h S, crescita polverulenta F, crescita flocculenta nel terreno YPD

ⁱ F0, schiuma minore di 2 mm; F1, schiuma compresa tra 2 e 4 mm; F2, schiuma maggiore di 4 mm

8.7. Test di microfermentazione e saggi enzimatici

Dai risultati ottenuti mediante lo screening tecnologico, dieci ceppi di *S. cerevisiae* con le migliori caratteristiche enologiche (bassa produzione di H₂S e acido acetico; resistenza ad elevate concentrazioni di etanolo, KMBS e CuSO₄; capacità di crescita a basse temperature, crescita polverulenta e bassa produzione di schiuma) sono stati valutati per la loro capacità di avviare e portare a termine una fermentazione alcolica di mosto di uva Fiano di Avellino (tabella 4). In tal senso, sono state allestite delle beute, opportunamente sterilizzate, nelle quali sono stati aggiunti 3L di mosto pastorizzato di uva Fiano a cui sono stati addizionati 0,20 mg/mL di MBSK e 0,20 mg/mL di attivante di fermentazione (Booster activ premium, Vason, Milano, Italia).

Le beute, così preparate, sono state inoculate con delle brodo colture di ceppi selezionati, in quantità tale da ottenere una concentrazione di 10⁷ cellule/ml di mosto. Le beute, chiuse con tappo forato e montato con pipetta Pasteur per la decarbonizzazione dei mosti, sono state termocondizionate a due differenti temperature: 13°C e 17°C con U.R. 60%.

Durante la fermentazione, si forma anidride carbonica che, svolgendosi, provoca un calo di peso di tutto il sistema. L'andamento della fermentazione è stato seguito con pesate quotidiane fino al tredicesimo giorno dall'inoculo. Inoltre, la capacità di fermentare il mosto da parte dei ceppi selezionati è stata valutata anche in termini di: **potere fermentativo** (PF), calcolato in base all'etanolo (% v/v) prodotto a fine della fermentazione alcolica; **vigore fermentativo** (VF) calcolato in termini di CO₂ (grammi calo peso delle beute) prodotta dopo il terzo giorno di fermentazione; **purezza fermentativa** (PF), definita come la quantità di acido acetico (g/L) rispetto alla quantità di etanolo (% v/v) prodotto alla fine della fermentazione.

In qualità di controllo positivo, è stata effettuata una microfermentazione, nelle medesime condizioni sopra descritte, inoculando nel mosto un ceppo di *S. cerevisiae* (GR1) dalle ottime capacità fermentative.

A fine fermentazione, tutti i mosti sono stati analizzati (in doppio) per il loro contenuto in zuccheri riduttori, acido acetico e glicerolo, in accordo alle metodiche ufficiali. Infine, i ceppi sono stati sottoposti a test (in doppio) di attività enzimatiche (tabella 5): la produzione di enzima β -glucosidasi è stata valutata su specifici substrati (Hernández et al., 2003) in presenza di arbutina, esculina, 4-metilumbelliferil β -D-glucopiranoside (MUG) e 4-nitrofenil β -Dglucopiranoside (p-NPG); l'attività proteolitica è stata valutata in accordo alla metodica proposta da Bilinsky et al. (1987).

Tabella 4 - Risultati delle microfermentazioni condotte dai ceppi selezionati di *S. cerevisiae*

Codice ceppo	Potere fermentativo ^a		Vigore fermentativo ^b		Acidità volatile ^c	
	13°C	17°C	13°C	17°C	13°C	17°C
scfiacp3	12,12±0,07	12,34±0,15	1,13±0,06	2,54±0,14	0,57±0,13	0,51±0,08
scfiacp5	12,19±0,24	12,05±0,21	1,09±0,07	2,26±0,02	0,51±0,08	0,52±0,34
scfiacp6	12,15±0,14	13,75±0,15	1,13±0,05	2,29±0,06	0,43±0,21	0,56±0,12
scfiacp7	12,23±0,18	12,34±0,03	1,14±0,30	2,35±0,11	0,49±0,03	0,54±0,13
scfiacp10*	13,79±0,11	13,76±0,18	1,79±0,12	3,20±0,31	0,35±0,05	0,37±0,21
scfiacp13	12,13±0,03	12,58±0,12	1,16±0,17	2,08±0,23	0,55±0,02	0,51±0,07
scfiacp14	11,82±0,12	12,54±0,15	1,18±0,07	2,61±0,05	0,61±0,05	0,55±0,03
scfiacp15	12,17±0,15	12,50±0,07	1,09±0,02	2,14±0,06	0,54±0,11	0,60±0,21
scfiacp16*	13,69±0,13	13,79±0,11	2,08±0,04	2,75±0,17	0,36±0,01	0,46±0,21
scfiacp17*	13,71±0,13	13,84±0,23	1,39±0,03	2,78±0,14	0,40±0,06	0,44±0,31
CP-1	13,17±0,17	13,41±0,02	1,24±0,19	2,77±0,11	0,41±0,20	0,48±0,11
CP-2	13,03±0,24	13,74±0,16	1,27±0,02	2,63±0,04	0,44±0,12	0,47±0,01

Codice ceppo	Purezza fermentativa ^d		Residuo zuccherino ^e		Contenuto in glicerolo ^f	
	13°C	17°C	13°C	17°C	13°C	17°C
scfiacp3	0,04±0,01	0,04±0,05	1,86±0,18	1,94±0,18	7,40±0,08	7,12±0,12
scfiacp5	0,04±0,02	0,04±0,06	2,12±0,21	1,92±0,04	7,06±0,02	7,32±0,08
scfiacp6	0,03±0,03	0,04±0,04	2,19±0,06	2,31±0,13	7,50±0,13	7,19±0,01
scfiacp7	0,04±0,01	0,04±0,01	2,07±0,02	2,52±0,13	7,51±0,21	7,21±0,12
scfiacp10*	0,02±0,05	0,02±0,01	1,60±0,01	1,43±0,03	7,56±0,02	7,59±0,03
scfiacp13	0,04±0,02	0,04±0,11	1,76±0,01	2,11±0,01	7,55±0,01	7,43±0,22
scfiacp14	0,05±0,06	0,04±0,05	2,24±0,03	1,82±0,16	6,97±0,02	7,12±0,04
scfiacp15	0,04±0,03	0,04±0,13	1,86±0,11	1,73±0,03	7,61±0,04	7,22±0,10
scfiacp16*	0,02±0,08	0,03±0,08	1,51±0,02	1,43±0,06	7,03±0,01	7,56±0,04
scfiacp17*	0,03±0,09	0,03±0,02	1,62±0,09	1,26±0,03	7,39±0,11	7,63±0,02
CP-1	0,02±0,03	0,03±0,04	1,78±0,11	1,67±0,01	7,19±0,09	7,43±0,23
CP-2	0,03±0,11	0,03±0,13	1,71±0,07	1,49±0,05	7,41±0,03	7,53±0,11

^a Etanolo (% v/v) prodotto al termine della fermentazione

^b CO₂ prodotta dopo 3 giorni di fermentazione (CO₂/giorno)

^c Acido acetico(g/L) prodotto al termine della fermentazione

^d Acidità volatile prodotta in relazione alla produzione di etanolo alla fine fermentazione

^e Residuo zuccherino (g/L) al termine della fermentazione

^f Glicerolo (g/L) prodotto al termine della fermentazione

CP-1, CP-1: ceppi di controllo con attitudini tecnologiche note

*ceppi con le migliori attitudini tecnologiche

Tabella 5 - Risultati delle attività enzimatiche dei ceppi selezionati di *S. cerevisiae*

Codice ceppo	Attività Glucosidasica ^a				Attività proteolitica ^a
	Esculina	Arbutina	MUG	pNPG	
scfiacp3	+	-	+	+	-
scfiacp5	-	-	-	-	-
scfiacp6	+++	-	+++	+	-
scfiacp7	-	-	-	-	-
scfiacp10*	++	-	+++	+	-
scfiacp13	+++	-	++	+	-
scfiacp14	-	-	-	-	-
scfiacp15	++	-	++	+	-
scfiacp16*	+	-	+	+	-
scfiacp17*	++	-	+	+	-
CP-1	+++	-	++	+	-
CP-2	++	-	+++	+	-

^a Attività Enzimatica : +++, alta; ++, media; +, bassa; -, non rilevabile

*ceppi con le migliori attitudini tecnologiche

CP-1, CP-2: ceppi di controllo con attitudini tecnologiche note

Le attività enzimatiche di origine microbica possono incidere fortemente sulla composizione del quadro aromatico di un vino. Ad esempio, l'enzima β -glucosidasi prodotto da numerose specie di lievito, fra cui *S. cerevisiae*, è in grado di liberare nel mosto numerosi composti odorosi a partire da molecole complesse, naturalmente presenti nelle uve, contribuendo all'espressione delle note varietali di una determinata cultivar. Analizzando i risultati mostrati in tabella 4 e 5, relativi a tutti i saggi sopra riportati, i ceppi scfiacp10, scfiacp16 e scfiacp17 hanno fornito, fra tutti quelli testati, risultati enologicamente interessanti e superiori a quelli ottenuti con i ceppi di controllo (CP-1, CP-2).

In particolare, il ceppo scfiacp10, isolato a Lapio, ha fornito i migliori risultati. Prima di impiegare i lieviti in una vinificazione su scala aziendale, per confermarne ulteriormente l'attitudine enologica, abbiamo nuovamente testato il ceppo scfiacp10 in una vinificazione di mosto pastorizzato di uve Fiano, ma con un volume maggiore (50L) rispetto alle microfermentazioni in beuta. La fermentazione è avvenuta nelle stesse condizioni di quelle sopra riportate, fissando però la temperatura a 17°C. In qualità di controllo, è stato utilizzato un ceppo commerciale *S. cerevisiae* (X5 Zymaflor, Laffort, France), comunemente impiegato per la vinificazione su scala aziendale di uve Fiano.

Il prodotto ottenuto dalla fermentazione è stato analizzato in base ai principali parametri enologici, mostrando un quadro chimico-fisico in linea con i dati ottenuti con il ceppo di controllo e con i parametri di legge. Il prodotto della fermentazione,

ottenuto con il ceppo autoctono scfiacp10, è stato sottoposto anche all'analisi dei principali composti organici volatili (COV), analizzati mediante un gas-cromatografo collegato ad uno spettrometro di massa. Considerando le principali differenze fra i composti analizzati, come mostrato dalla figura 11, il vino prodotto con il ceppo autoctono scfiacp10 è stato caratterizzato da una minore concentrazione di esteri (odori fruttati) e da più alto contenuto di alcoli ed acetati (erbaceo, floreale) così come da un elevata concentrazione di 3-metil-1-butanolo.

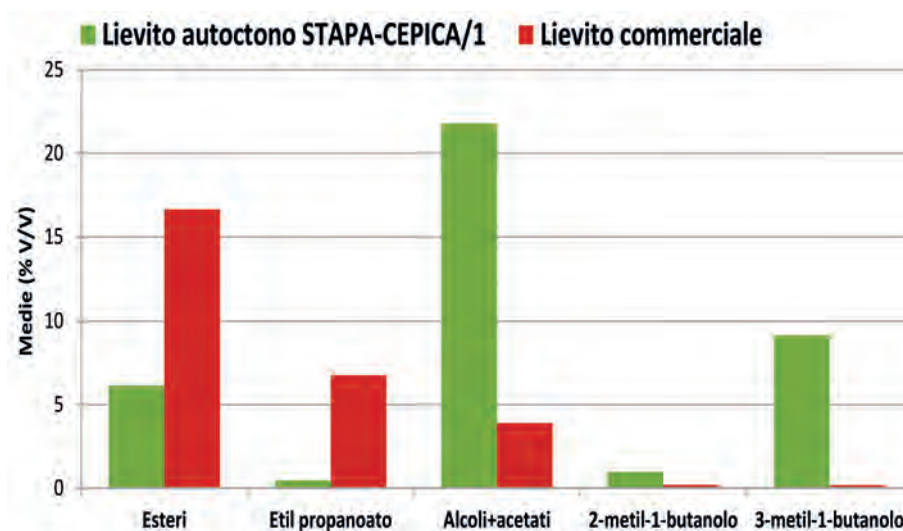


Figura 11 - Principali differenze in termini di composti organici volatili riscontrate fra i due vini sperimentali

Inoltre, il prodotto fermentato con il lievito autoctono è stato caratterizzato, nelle fasi successive alla fermentazione alcolica, da una maggiore torbidità, attribuibile ad una maggiore persistenza del ceppo in sospensione nella massa liquida (potenzialmente associabile ad una minore ossidabilità del mosto/vino) (figura 12). Anche le conte vitali dei lieviti sul substrato selettivo MESA hanno dimostrato una più alta concentrazione del ceppo autoctono rispetto al commerciale in fase post-fermentativa.

All'assaggio, il vino ottenuto con il ceppo autoctono ha mostrato una maggiore complessità olfattiva e gustativa, probabilmente attribuibile alle principali differenze chimico-tecnologiche sopra riportate. Sulla base dei risultati ottenuti, il ceppo autoctono scfiacp10 è stato individuato come possibile starter da impiegare in una vinificazione, su scala aziendale, di uve Fiano di Avellino. Tale microrganismo è stato rinominato ceppo STAPA-CEPICA/1.

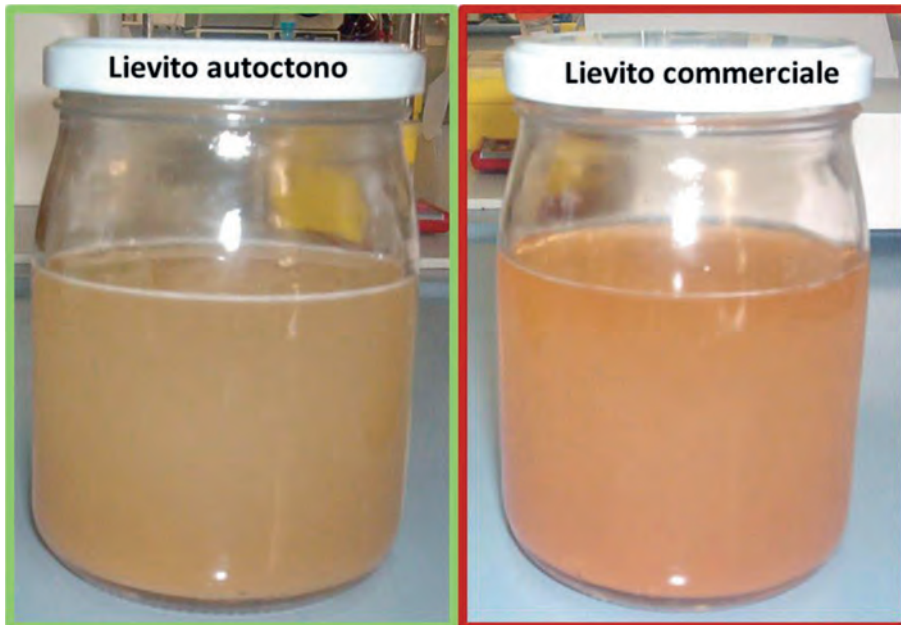


Figura 12 - Vino in fase di maturazione dopo la fermentazione alcolica condotta in parallelo con i due lieviti: lievito autoctono STAPA-CEPICA/1 e lievito commerciale

8.8. Vinificazione su scala aziendale di uve Fiano di Avellino con il lievito autoctono STAPA-CEPICA/1

Il ceppo autoctono *S. cerevisiae* STAPA-CEPICA/1, caratterizzato da un'elevata attitudine enologica, è stato coltivato realizzando una coltura pura in pasta (vitalità coltura 90%; concentrazione 10^9 cellule/g; umidità relativa 70%) presso la SG Biotech® (Piacenza, Italia). Tale ceppo è stato impiegato per la vinificazione su scala aziendale di un vino commerciale Fiano D.O.C.G., annata 2010. Il ceppo commerciale *S. cerevisiae* X5 (Zymaflor, Laffort) è stato impiegato, in qualità di controllo, in una vinificazione parallela condotta nelle medesime condizioni del ceppo STAPA-CEPICA/1. Il processo tecnologico è stato realizzato presso l'Azienda Mastroberardino s.p.a. (Atripalda, Avellino). Effettuata la pigiadiraspatura delle uve, il mosto ottenuto mediante pressatura pneumatica, previa solfitazione (150 mg/L MBSK), è stato sottoposto a defecazione statica (10°C per 24h). Stabilizzata la temperatura a 17°C, il mosto è stato suddiviso in due vasche di acciaio da 20 hl, ciascuna riempita con 15 hl di mosto ed inoculate con 20 g/hL dei rispettivi lieviti che hanno condotto la fermentazione per 28 giorni ad una temperatura di circa 17°C. Dopo la sfecciatura, i vini sono

stati affinati in contenitori di acciaio per circa cinque mesi ad una temperatura di 12°C, quindi messi in bottiglia previa filtrazione. In corrispondenza delle principali fasi tecnologiche della vinificazione, è stato effettuato il campionamento mediante prelievo asettico in contenitori sterili conservati a 4°C fino al momento delle determinazioni microbiologiche e chimico-fisiche. I risultati delle conte microbiche sono qui di seguito riportati nelle figure 13a e 13b.

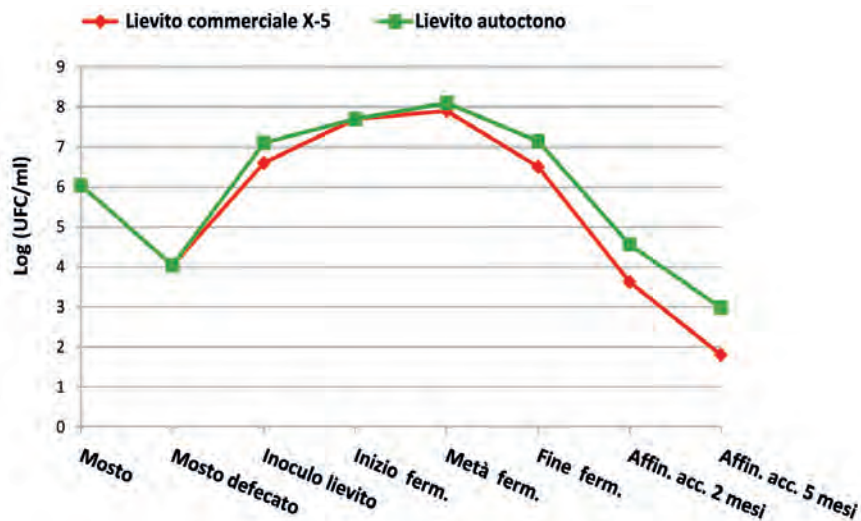


Figura 13a - Conte dei lieviti totali su WL agar relative alle vinificazioni su scala aziendale

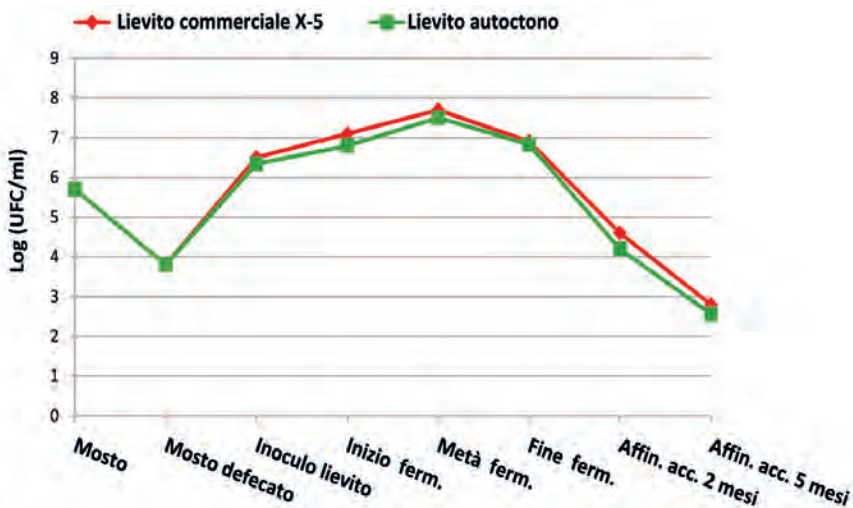


Figura 13b - Conte dei lieviti presunti *Saccharomyces* spp. su MESA relative alle vinificazioni su scala aziendale

Il primo obiettivo della sperimentazione è stato quello di dimostrare la dominanza del ceppo STAPA-CEPICA/1 durante la vinificazione, ovvero verificare che tale ceppo sia stato in grado di avviare e portare a termine la fermentazione, raggiungendo le più alte concentrazioni nelle diverse fasi della lavorazione.

I dati relativi alle conte microbiologiche, effettuate sia su WL agar (conta dei lieviti totali) (figura 13a) che sul substrato selettivo MESA (idoneo per il monitoraggio dei lieviti *Saccharomyces* spp.) (figura 13b), hanno fornito un quadro microbiologico del ceppo STAPA-CEPICA/1 perfettamente comparabile a quello del ceppo commerciale ed in linea con i dati riscontrati nelle comuni vinificazioni commerciali.

Poiché le vinificazioni, benché sperimentali, sono state eseguite su scala aziendale (15 hl), i mosti inoculati con i lieviti non sono stati pastorizzati, cioè non sono stati trattati in modo da eliminare gran parte della microflora in forma vegetativa.

Quindi, per essere certi che i valori delle conte microbiche fossero attribuibili alla presenza del lievito STAPA-CEPICA/1, in corrispondenza di tutti i campioni analizzati è stato isolato un numero statisticamente significativo di lieviti (50 per campione) destinati all'identificazione a livello di specie e ceppo mediante metodi fenotipici e genotipici (figura 14).

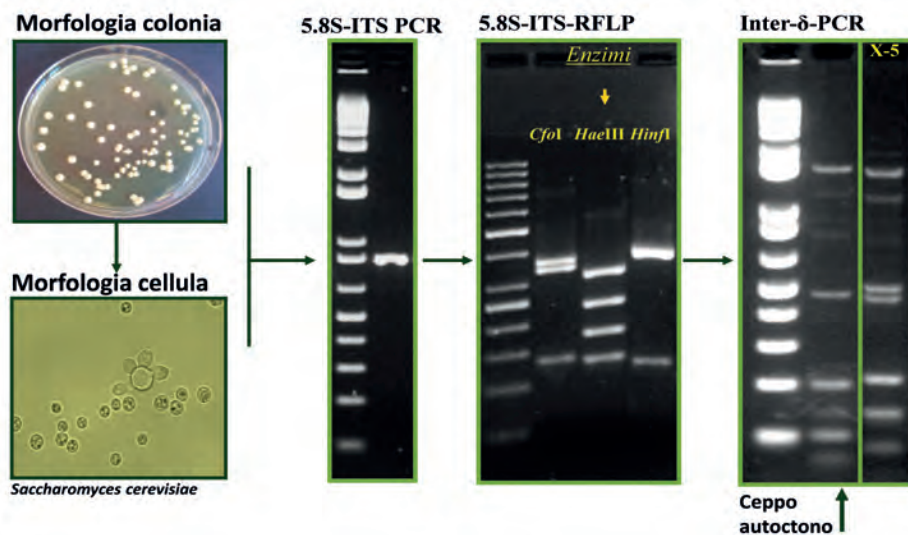


Figura 14 - Identificazione fenotipica e molecolare della ceppo autoctono STAPA-CEPICA/1 *S. cerevisiae*. Il ceppo commerciale usato in qualità di controllo è rappresentato dal profilo X-5

In tal senso, tutti gli isolati sono stati raggruppati sulla base delle caratteristiche morfologiche (colonia e cellula) e successivamente sono stati indentificati a livello di specie mediante amplificazione e digestione enzimatica del gene 5.8S-ITS rDNA seguita dalla Inter- δ -PCR per l'identificazione a livello di ceppo. Il 92% dei lieviti isolati alle più alte concentrazioni, ascrivibili alla specie *S. cerevisiae*, ha restituito un profilo interdelta corrispondente al ceppo STAPA-CEPICA/1, sia in fase di fermentazione alcolica che nelle successive (affinamento in acciaio e imbottigliamento) (figura 15).

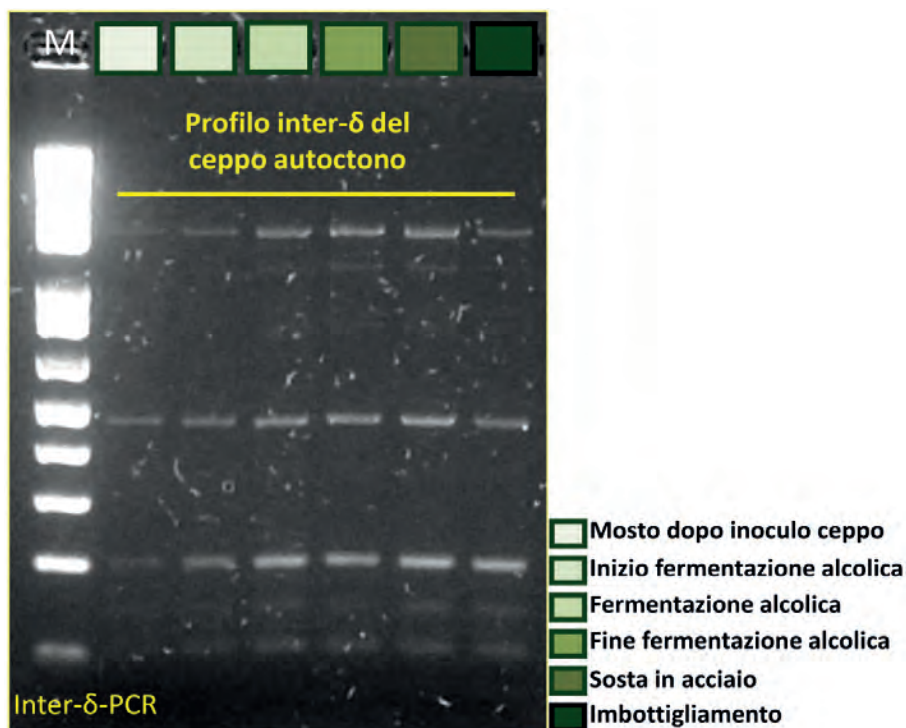


Figura 15 -Monitoraggio del ceppo autoctono STAPA-cePICA/1 durante la vinificazione su scala aziendale. M, marcatore molecolare 1Kb Plus (Invitrogen)

Tutto ciò dimostra che il ceppo autoctono STAPA-CEPICA/1 è stato in grado di dominare microbiologicamente l'intero processo di vinificazione.

Per dimostrare l'affidabilità tecnologica del ceppo autoctono, il processo è stato monitorato anche da un punto di vista chimico-fisico.

Come riportato in tabella 6, anche i parametri chimici di base dimostrano la validità tecnologica del lievito autoctono STAPA-CEPICA/1, dalla fase di fermentazione all'imbottigliamento.

Tabella 6 - Monitoraggio chimico-fisico delle vinificazioni sperimentali su scala aziendale con i ceppi di lievito autoctono e commerciale

Campioni	Mosto	Fine fermentazione		Affinamento		Imbottigliamento	
		Autoctono	Commerciale	Autoctono	Commerciale	Autoctono	Commerciale
pH	3,26±0,03	3,38±0,06	3,37±0,21	3,36±0,03	3,57±0,3	3,33±0,26	3,44±0,11
ATT	6,66±0,01	5,92±0,15	6,32±0,34	6,39±0,09	5,88±0,12	5,36±0,01	5,73±0,04
AV	0,37±0,05	0,38±0,12	0,44±0,02	0,53±0,04	0,50±0,07	0,65±0,06	0,67±0,23
SO ₂ totale	19,52±0,04	23,36±0,08	29,12±0,07	66,56±0,05	57,92±0,03	71,52±0,05	76,53±0,21
SO ₂ libera	1,280,09	4,8±0,07	3,52±0,04	2,24±0,13	4,16±0,09	34,56±0,09	22,4±0,06
Brix	19,45±0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etanolo	n.d.	12,3±0,02	11,9±0,09	12,3±0,02	12,23±0,08	13,6±0,14	13,4±0,05
PF	305,75±0,04	136,55±0,05	84,55±0,09	80,15±0,03	131,75±0,17	n.d.	n.d.
Catechine	203,63±0,06	60,32±0,04	54,36±0,11	70,43±0,01	82,23±0,06	n.d.	n.d.
DO	0,47±0,08	0,13±0,05	0,03±0,15	0,73±0,02	1,32±0,16	n.d.	n.d.

ATT, acidità totale titolabile (g/L acido tartarico); AV, acidità volatile (g/L acido acetico); SO₂ (mg/L); Etanolo (% V/V); PF, polifenoli totali (mg/L acido gallico); catechine (mg/L); DO, densità ottica (420 nm); n.d., non determinato

8.8.1. Analisi sensoriale dei vini sperimentali Fiano di Avellino

I vini imbottigliati ottenuti con i due ceppi sono stati sottoposti ad analisi sensoriale (figura 16) al fine di valutarne le differenze organolettiche e verificare se effettivamente il ceppo STAPA-CEPICA/1 sia stato effettivamente in grado di rafforzare le note di tipicità del vino Fiano. Il profilo sensoriale dei vini è stato valutato sulla base di un metodo descrittivo (UNI:10957, 2003) e ricorrendo all'ausilio di un panel descrittivo di 10 giudici. Nella prima fase, i giudici sono stati formati sottoponendo loro l'assaggio di diversi campioni di vino commerciale Fiano D.O.C.G., allo scopo di costruire un vocabolario comune per la descrizione degli attributi sensoriali dei vini Fiano e per familiarizzarli con la scala di valori e con la procedura seguita. Ogni attributo è stato dettagliatamente descritto e, sulla base della frequenza delle citazioni (>60%), sono stati selezionati 19 descrittori, inseriti nella scheda di valutazione dei vini: intensità del colore, intensità e complessità olfattiva, *off-odour*, fiori, frutta matura, agrumi, frutta secca, erbe aromatiche, spezie, intensità e complessità gustativa, dolce, acidità, alcol, morbidezza, *off-flavour*, espressione territoriale e valutazione complessiva. I campioni sono stati sottoposti all'assaggio dei giudici

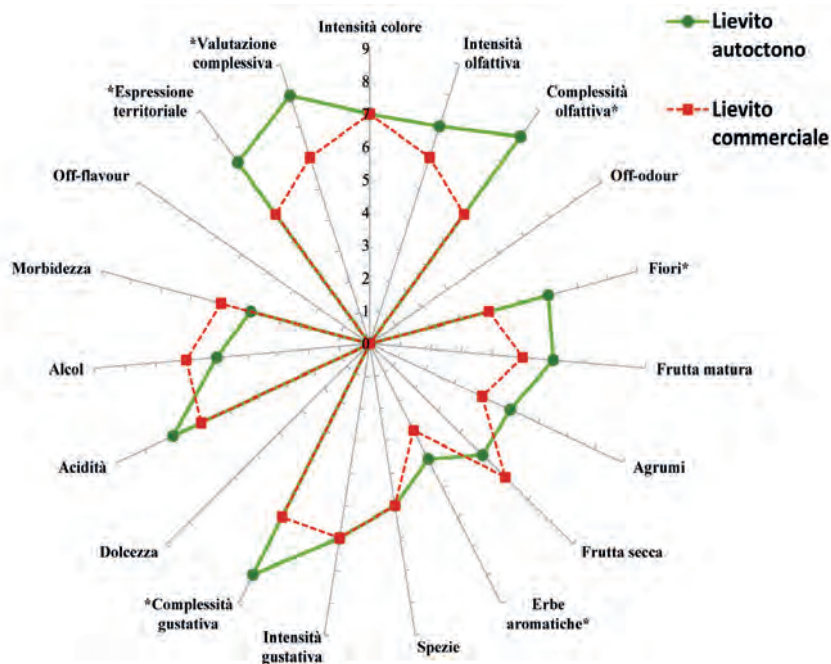


Figura 16 - Risultati dell'analisi sensoriale condotta sui vini ottenuti con il lievito autoctono STAPA-CEPICA/1 e il lievito commerciale

in modo casuale e in incognito, in stanze individuali, in presenza di luce bianca e in assenza di odori estranei, presso i laboratori del Dip. SAF. Prima e durante gli assaggi, ai giudici è stata fornita acqua a temperatura ambiente. I giudici hanno espresso i risultati dell'analisi sensoriale assegnando a ciascuno degli attributi individuati un valore compreso fra 1 (sensazione assente) e 9 (particolarmente intenso). Tutte le analisi sono state effettuate in triplo e i risultati sono stati sottoposti ad Analisi della Varianza (ANOVA) così da evidenziare le differenze statisticamente significative fra gli attributi sensoriali come riportato in figura 16.

Tra i due vini sono state riscontrate differenze significative relativamente ai descrittori complessità olfattiva, fiori, erbe aromatiche, *complessità gustativa*, *espressione territoriale* e *valutazione complessiva*. A tutti i descrittori sopra riportati sono stati attribuiti valori superiori nel campione di vino ottenuto con il lievito autoctono STAPA-CEPICA/1. Tali differenze sono attribuibili probabilmente alla capacità del lievito autoctono di contribuire maggiormente alla definizione del profilo sensoriale del vino Fiano di Avellino D.O.C.G. marcandone gli attributi territoriali.

8.9. Promozione e diffusione aziendale del ceppo STAPA-CEPICA/1 nell'areale di produzione del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.

Il progetto di ricerca per il miglioramento del vino Fiano attraverso l'uso di lieviti autoctoni ha previsto una terza ed ultima fase, forse quella di maggiore interesse enologico: promuovere in tutto il territorio del Fiano di Avellino D.O.C.G. l'impiego del ceppo STAPA-CEPICA/1. Lo scopo è stato non solo quello di rendere noti i risultati della ricerca, ma anche di ampliarla. Pochissimi ceppi autoctoni in Italia, così come nelle altre regioni viticole del mondo, varcano le soglie dei laboratori in cui sono stati isolati. Nel nostro caso, grazie alla promozione fatta dalla struttura STAPA-CePICA di Avellino (Assessorato all'Agricoltura della Regione Campania), il ceppo è stato impiegato nella vinificazione di 29 aziende produttrici di Fiano di Avellino D.O.C.G. (tabella 7) potendo, così, dimostrare l'applicabilità dei lieviti autoctoni anche su un'ampia scala territoriale. Tutte le aziende produttrici di Fiano di Avellino D.O.C.G., in prossimità della vendemmia 2011, hanno potuto ordinare gratuitamente un quantitativo massimo di 2 Kg (in pasta) del ceppo STAPA-CEPICA/1, compilando il modulo di richiesta presente sul sito web dello STAPA-CePICA di Avellino (Assessorato Agricoltura, Regione Campania (www.stapacepicaavellino.com)).

Tabella 7 - Aziende che hanno aderito alla sperimentazione effettuando una vinificazione commerciale di Fiano di Avellino D.O.C.G. impiegando il ceppo autoctono selezionato STAPA-CEPICA/1

Aziende
Cantine Vadiaperti srl
Villa Raiano
Azienda Vitivinicola Petilia
Cantina del Barone
Cantine Manimurci srl
Cantine I Favati
Cantine TerraNera srl
Azienda Agricola Vitivinicola FEMIA
Azienda Vitivinicola Colella Rita
Azienda Vitivinicola Terre Auree srl
Azienda Vitivinicola Montesole Colli Irpini srl
Azienda Torricino
Cooperativa Agricole degli 8 Comuni del Greco di Tufo
Azienda Casale del Principato srl
Azienda De Vito Tommaso
Azienda Contrada Michele
Nativ srl
Azienda Casa dell'Orco
Azienda Agricola Irpina srl
Azienda Vitivinicola Ciro Picariello
Azienda Vitivinicola Contea Dè Altavilla srl
Azienda Vitivinicola Bruno
Azienda Colli di Castelfranci
Joaquin Aziende Agricole srl
Cantine Tenuta Cavalier Pepe
Feudi di San Gregorio s.p.a.
Mastroberardino s.p.a.
Azienda Giovanni Molettieri
Aziende Agricole Di Meo

Il ceppo è stato spedito (refrigerato ed entro le 48h dalla sua produzione) all'indirizzo indicato da ciascuna delle aziende che hanno fatto richiesta unitamente ad un protocollo d'impiego (figura 17) del ceppo specificandone le caratteristiche enologiche.

Sulla base delle informazioni reperite da ciascuna azienda, il ceppo autoctono STAPA-CEPICA/1, testato in 29 aziende, ha fornito i risultati enologici attesi.

**CEPPO STAPA-CEPICA/1 di *Saccharomyces cerevisiae*:
LIEVITO DI FIANO IN PASTA FRESCA PRONTO PER L'USO**

Il ceppo di lievito *Saccharomyces cerevisiae* "STAPA-cePICA 1" è il frutto del progetto di ricerca "Miglioramento Qualitativo dei Vini Campani" attivato dallo STAPA-cePICA di Avellino e dal SeSIRCA in collaborazione con la Facoltà di Agraria - Università degli Studi di Palermo, sotto la supervisione del Prof. Giancarlo Moschetti.

Caratteristiche tecnologiche

Il ceppo, isolato da uve "Fiano" coltivate nel Comune di Lapio (AV), è stato testato per la fermentazione di mosti su scala aziendale ed è risultato idoneo per la produzione di vini bianchi complessi ed eleganti. Si è dimostrato un ottimo lievito, estremamente regolare nelle fermentazioni (condotte fino a 14°C e fino a 14.5% etanolo) ed è in grado di valorizzare le componenti tipiche del vitigno Fiano potenziandone le note speziate e floreali, senza appesantire l'aroma. Manifesta un'ottima propensione all'affinamento "sur lies" contribuendo alla formazione di vini con un'elevata persistenza gustativa.

Protocollo di impiego

Il ceppo è distribuito sotto forma di starter "fresco", ovvero lievito in pasta costituito da una coltura pura, viva, attiva ad elevata concentrazione, in grado di innescare prontamente il processo di fermentazione alcolica e di portarlo regolarmente a termine.

- Quantità in ciascuna confezione: 1Kg

Modalità d'inoculo: sciogliere il lievito in pasta direttamente nel mosto, non è necessaria la reidratazione in acqua a temperatura controllata.

Dose da inoculare: 20g/hL, per volumi superiori a 50 hL è consigliato l'inoculo mediante "pie de cuve"

NB: in fermentazione va utilizzato come un normale lievito secco commerciale

Conservazione

Appena si riceve il ceppo di lievito in ghiaccio secco bisogna, fino al momento dell'utilizzazione, conservarlo in frigorifero a 4°C. Tale temperatura preserva l'integrità del lievito per un periodo di 40 giorni senza determinare abbattimento della vitalità cellulare. Per ulteriori informazioni sulle caratteristiche del ceppo e sulle relative modalità di ricevimento è possibile contattare:

- **Dott. Nicola Francesca tel. 333.8567240 e-mail: nicolafrancesca@unipa.it.**

Figura 17 - Scheda tecnica del ceppo autoctono STAPA-CEPICA/1 inviata alle aziende che hanno aderito al progetto

Bibliografia

Baleiras Couto M.M., Eijsma B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H.J., van der Vossen J.M. B.M.. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 41-46, 1995b.

Baleiras-Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L.. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 49-56, 2005.

Bilinsky C.A., Russell I., Stewart G.G.. Applicability of yeast extracellular proteinases in brewing: physiological and biochemical aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 495-499, 1987.

Caridi A., Cufari A., Ramondino D.. Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48, 261-267, 2002.

Charpentier C., Colin A., Alais A., Legras J.L. French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95, 263-273, 2009.

Cocolin L., Heisey A., Mills D.A.. Direct identification of the indigenous yeasts commercial wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 49-53, 2001.

Esteve-Zarzoso.. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 49, 329-337, 1999.

Fernández M.T., Ubeda J.F., Briones A.I.. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 223-229, 1999.

Fiore C., Arrizon J., Gschaedler A., Flores J., Romano P. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1141-1147, 2005.

Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Settanni L., Moschetti G.. Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 26, 337-351, 2010.

Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A.. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 269-273, 1995.

Legras J., Karst, F.. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS*, 221, 249-255, 2003.

Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernandez-Espinar M., Querol A.. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 234-242, 2007.

O'Donnell K.. The fungal anamorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. *Fusarium and its near relatives*. In: D. R. Reynolds & J. W. Taylor (Eds.). Wallingford, USA, pp. 225-233, 1993.

Parapaloli M. Hatziloukas E., Drainas C., Perisynakis A..The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine Xavour, 2010.

Regodón J.A., Pérez F., Valdé M.E., De Miguel C., Ramírez M.. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains, *Food Microbiology*, 14, 247-254, 1997.

Settanni L., Sannino C., Francesca N., Moschetti N.. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press, 2012.

UNI 10957. Sensory analysis method for establishing a sensory profile in foodstuffs and beverages, 2003.

Vincenzini M., Romano P., Farris G.A.. *Microbiologia del vino*, Ambrosiana, Milano, 2005.



9. Conclusioni

Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca

Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Tra i produttori di vino sta divenendo sempre più forte l'interesse per l'ecologia e l'evoluzione dei lieviti durante l'intero processo produttivo, con l'intento di correlare l'avvicinarsi delle popolazioni microbiche ai tipi e alle concentrazioni delle sostanze responsabili dell'aroma del vino. Inoltre, la conoscenza e il controllo della composizione e dell'evoluzione della flora microbica, nel corso della fermentazione alcolica, si rende necessaria nel momento in cui ci si pone come obiettivi la costanza qualitativa e la stabilità microbiologica del prodotto finito. Il primo obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'ecologia microbica dell'ambiente vitivinicolo della cultivar *Fiano*, mai soggetto a questo tipo di analisi. Il raggiungimento di tale obiettivo è di notevole importanza proprio per il ruolo che la microflora non-*Saccharomyces* riveste all'interno della fermentazione. Difatti, molti studi, condotti negli ultimi anni, hanno dimostrato che ottimi risultati nella produzione di vini di qualità possono essere raggiunti mediante l'impiego di ceppi non-*Saccharomyces*, unitamente a ceppi indigeni di *S. cerevisiae*. La possibilità di legare maggiormente l'identità di un vino alla propria zona di origine ha spinto numerosi produttori ad abbandonare l'impiego di starter commerciali, isolati altrove, affidandosi a delle fermentazioni spontanee con il rischio di una notevole incostanza qualitativa del prodotto finito. L'impiego di una coltura starter autoctona, se utilizzata nel medesimo areale d'isolamento, può portare ad un rapido e costante miglioramento qualitativo del prodotto finito. In tal senso, la seconda parte del lavoro è stata specificamente indirizzata all'isolamento ed alla caratterizzazione molecolare e tecnologica di ceppi indigeni di *S. cerevisiae*, ottenendo così una ceppoteca costituita da numerosi biotipi con specifiche attitudini enologiche. Fra questi ceppi, sulla base di un'attenta selezione tanto in vitro quanto in vinificazione sperimentale, sono emersi tre ceppi con caratteristiche tecnologiche di notevole rilevanza enologica. In particolare, il ceppo STAPA-CEPICA/1 è risultato adatto

alla fermentazione di mosti di uve Fiano di Avellino ed in grado di contribuire in modo significativo alla qualità e alla tipicità del prodotto finito. Tale ceppo si è rilevato tecnologicamente valido non solo su scala aziendale in condizioni sperimentali note, ma in ben 29 diverse vinificazioni effettuate in altrettante aziende produttrici di Fiano di Avellino D.O.C.G.. Per la prima volta, un ceppo autoctono isolato in condizioni sperimentali ha trovato un così ampio riscontro tecnologico ai fini della realizzazione di produzioni enologiche di un intero areale produttivo a denominazione d'origine. Convinti che le attività di ricerca avviate in questo progetto siano state orientate nella giusta direzione ai fini del miglioramento qualitativo dei grandi vini della Campania, ci auguriamo che altre attività siano intraprese nella medesima direzione. Per il futuro dei grandi vini campani, ci auspichiamo, inoltre, che il concetto di lievito autoctono sia ancor più associato all'intima struttura del territorio del Fiano attraverso una selezione specifica di starter in relazione alle sottozone pedoclimatiche dell'areale Fiano di Avellino D.O.C.G..

Ringraziamenti

Uno speciale ringraziamento al Dott. Luca Branca dello STAPA-CePICA di Avelino per la sua costante e intensa attività di collaborazione ai fini della buona riuscita del progetto.

Ringraziamo l'Enologo Massimo Di Renzo e l'Az. Mastroberardino S.p.A. per aver messo a disposizione materie prime ed attrezzature partecipando, con grande disponibilità, alle attività di ricerca.

Ringraziamo il Dott. Antoine Gaita dell'Az. Villadimante per aver messo a disposizione materie prime ed attrezzature ai fini della sprimentazione su scala aziendale del ceppo autoctono di *S. cerevisiae* isolato nei vigneti di Fiano D.O.C.G. del comune di Montefredane.

Un grazie da parte nostra va a Gianni Gentile (autore dei disegni), a Gerardo Perrotta (revisore del testo) e ad Emanuele Pistola (responsabile del progetto grafico) per la loro disponibilità e professionalità.



Stampa a cura della



**IMAGO
EDITRICE**

www.imagoedipack.it



Finito di stampare nel mese di febbraio 2013

