

**6.9 LINEA B.4.1 Controllo della evoluzione delle popolazioni microbiche
con attività di monitoraggio in linea (servizio)**

**Coordinatore scientifico: Prof.ssa Lisa Granchi – DIBA Sezione
Microbiologia - Università degli Studi Firenze**

Autore del documento:

**Prof.ssa Lisa Granchi - DIBA Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
Sezione Microbiologia - Università di Firenze
Piazzale delle Cascine, N. 24**

1) Stato dell'arte

Nel processo di vinificazione la fermentazione alcolica è una fase chiave ed è caratterizzata dallo sviluppo e dall'attività metabolica di diverse specie di lieviti che, oltre all'etanolo, formano composti secondari che concorrono alla qualità ed al valore economico del vino.

Tali lieviti che derivano principalmente dalla superficie dell'uva, dall'ambiente di cantina e dalle colture *starter* che vengono inoculate nel mosto, sono fortemente influenzati, per tipologia, entità numerica e persistenza, da numerosi fattori, fisici, chimici e biotici.

Sulle uve generalmente predominano lieviti appartenenti al genere *Kloeckera* o *Hanseniaspora*, mentre altri generi quali *Metschnikowia*, *Candida* e *Pichia* sono presenti in minor quantità e con diversa frequenza. *Saccharomyces cerevisiae*, la principale specie di lievito responsabile della fermentazione vinaria, è assai rara sulla superficie di uve sane ed integre. Tuttavia, l'entità della popolazione totale di lieviti così come le proporzioni delle singole specie presenti sulle uve sono variabili in funzione della varietà, del grado di maturazione, dello stato sanitario dell'uva, e di numerosi altri fattori che includono fattori climatici (temperatura, precipitazioni, umidità ed altri eventi), pratiche colturali (fertilizzazione, irrigazione, trattamenti fitosanitari, gestione della chioma) e tecniche di raccolta (manuale, meccanica) (Fleet, 1990, Pretorius, 2000). Di conseguenza sulle uve si possono trovare densità cellulari che variano da poche centinaia a 10^5 cellule /mL.

Nell'ambiente di cantina, la presenza e lo sviluppo di determinate specie di lievito sono strettamente dipendenti dalla natura della superficie dei vasi vinari e dalle operazioni di sanitizzazione. In genere, contrariamente a quanto riscontrato in vigneto, in cantina, ed in particolare all'interno dei vasi vinari e sulle varie attrezzature, *S. cerevisiae* è la specie prevalente costituendo la cosiddetta microflora "residente" che deriva sia dalle uve che dalle eventuali colture *starter* impiegate nel tempo durante le varie vinificazioni (Martini, 1993). Inoltre, possono essere presenti lieviti appartenenti ai generi *Candida*, *Dekkera*, *Pichia*, *Brettanomyces* ed altri ancora.

Pertanto, la tipologia e l'entità delle specie di lieviti presenti nel mosto sono influenzate indirettamente dai molteplici fattori sopra elencati e, più direttamente, dalle diverse pratiche enologiche seguite quali, l'aggiunta di anidride solforosa o di altri additivi, i trattamenti di prefermentazione (macerazione a freddo o a caldo) la temperatura e il grado di ossigenazione e soprattutto l'aggiunta di colture *starter* della specie *S. cerevisiae*, pratica molto diffusa per garantire un più rapido avvio e un maggiore controllo del processo fermentativo. Quindi, in mosti freschi i lieviti sono variabili per numero, da poche centinaia ad alcuni milioni per millilitro. Malgrado questa variabilità nella composizione della popolazione iniziale di lieviti, i numerosi studi sulla ecologia della vinificazione sono concordi nel tracciare un comune quadro microbiologico qualitativo che vede nelle prime fasi della fermentazione, sia spontanea che indotta, la presenza di lieviti non-*Saccharomyces* (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Candida* etc.) caratterizzati da una bassa attività fermentativa e da una elevata sensibilità nei confronti dell'etanolo. Generalmente, proprio per queste caratteristiche, tali lieviti sono destinati, con il procedere della fermentazione alcolica, ad una fase di declino fino alla completa inibizione cellulare. Tuttavia, la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna specie di lievito dipende dalle condizioni chimico-fisiche e nutrizionali dell'ambiente "vino" così come dalle interazioni tra le singole specie diverse. E' stato infatti dimostrato che anche nelle fermentazioni inoculate, dove dovrebbe essere garantita la dominanza della specie *S. cerevisiae* all'inizio del processo fermentativo, i lieviti non-*Saccharomyces* possono raggiungere densità cellulari elevate (10^6 - 10^7 UFC/mL) e produrre, in seguito alla loro attività biochimica, composti secondari che possono influenzare positivamente o negativamente le caratteristiche organolettiche del prodotto finito (Lema et al., 1996).

In definitiva, da quanto esposto, appare evidente l'importanza di individuare e quantificare le singole specie di lievito presenti nelle varie fasi del processo di vinificazione, dal momento che la qualità sensoriale del vino è strettamente dipendente dalle loro proprietà metaboliche (Lambrechts e Pretorius, 2000)..

2) Obiettivi del programma di ricerca

Per ciascuna vinificazione sperimentale sarà effettuata la determinazione quantitativa e speciologica della popolazione di lieviti presenti nelle seguenti fasi della fermentazione alcolica:

1. subito dopo l'inoculo del lievito starter
2. a metà della degradazione degli zuccheri
3. al termine della degradazione degli zuccheri

I singoli campioni, prelevati sterilmente, saranno sottoposti dopo opportuna diluizione seriale decimale, a semina superficiale su piastre Petri contenenti mezzi colturali selettivi e differenziali per la conta speciologica dei lieviti. I risultati saranno espressi come Unità Formanti Colonia (U.F.C.) per millilitro di mosto o vino.

L'identificazione speciologica sarà effettuata mediante amplificazione e restrizione della regione rITS (Granchi et al., 1999).

3) Riferimenti bibliografici

Fleet G.H., 1990 Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research*, 1: 211-223.

Lambrechts M.G., Pretorius I.S. 2000 Yeast and its importance to wine aroma. *South Afric. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.

Lema C., Garci-Jares C., Orriols I., Angulo L. 1996 Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216. Martini, A, 1993 Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 4: 165-176.

Pretorius, I.S, 2000 Tailoring wine yeast for the new millenium. *Yeast*, 16: 675-729.