



in cantina

Reidratazione di  
lieviti secchi attivi.

# SECCO O FRESCO PURCHÉ DI QUALITÀ

**SELEZIONATO  
PER L'OBIETTIVO ENOLOGICO  
DESIDERATO E RISPONDENTE  
A IRRINUNCIABILI  
STANDARD QUALITATIVI:  
ECCO IL LIEVITO GIUSTO,  
INDIPENDENTEMENTE DALLA  
SUA FORMULAZIONE FISICA.  
COME SCEGLIERE UN LIEVITO  
PER LA RIFERMENTAZIONE  
IN AUTOCLAVE**

ALESSANDRA BIONDI BARTOLINI\*, FEDERICA CALMINI\*\*, MARIA ELENA FEDELI\*\*\*

Il comportamento fermentativo e qualitativo del lievito enologico non è dato soltanto dal suo genotipo ma anche dalle caratteristiche del preparato industriale, sia esso in forma di lievito secco attivo o di starter fresco. Tra i fattori che possono influenzare la qualità di un prodotto, in termini per esempio di purezza microbiologica o vitalità, ci sono le condizioni di moltiplicazione e le caratteristiche compositive e qualitative dei substrati di coltura, nonché gli stress subiti dalle cellule in alcune fasi del processo industriale.

Per fare al meglio la sua parte, ed esprimere nelle migliori delle condizioni il genotipo isolato dai selezionatori, un ceppo di lievito deve rispondere ad alcuni requisiti di qualità fondamentali che dovranno essere comunque garantiti dal produttore ma che potranno anche fare parte del controllo qualità svolto sulle materie prime dallo stesso utilizzatore. In un lavoro sperimentale svolto in collaborazione con S.G. Biotech® (Villanova sull'Arda – PC) e la Cantina Valtidone (Borgonovo Valtidone – PC) sono stati indagati i parametri di

Il controllo della qualità dei lieviti può essere fatto in parte in un laboratorio di cantina ben attrezzato e in parte deve essere affidato a laboratori professionali.

controllo e le prove enologiche utili non solo per la scelta del ceppo i cui caratteri siano più adatti a uno specifico obiettivo enologico ma anche nella verifica della conformità microbiologica del preparato commerciale.

In modo particolare ci si è chiesti:

- quali parametri microbiologici sul preparato di lievito selezionato possono essere utilizzati nella valutazione della qualità del preparato fornito, quali di questi possono essere controllati in un buon laboratorio di cantina o quali necessitano dell'intervento specialistico di un laboratorio microbiologico?

- Quali informazioni sulle performance tecnologiche ed enologiche si ottengono da prove enologiche su piccola scala e quali con l'impostazione di una prova industriale?

Nelle prove eseguite ci si è concentrati nell'individuare un protocollo di controllo e selezione tra i prodotti commerciali più adatti alla spumantizzazione in autoclave di vini base bianchi.

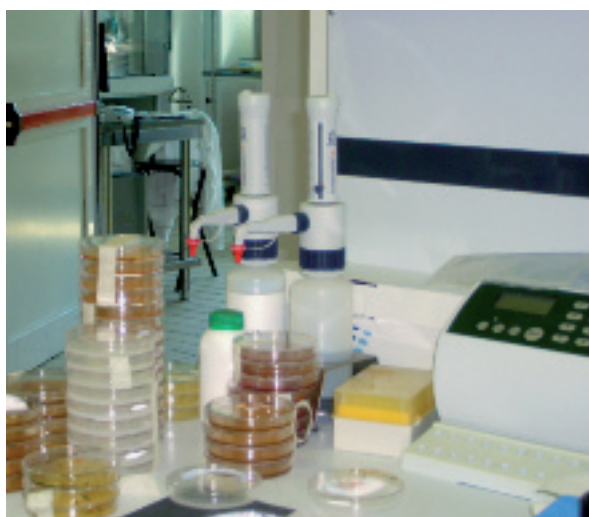
Nella prima fase sono stati scelti sette diversi lieviti commerciali proposti per questa applicazione, dei quali due in forma di starter freschi (i lieviti 1 e 2 rispettivamente ceppi SGB e PRC di S.G. Biotech®) e cinque in forma di lieviti secchi attivi di diversi produttori.

## VALUTARE LA PUREZZA MICROBIOLOGICA

Il Codex Enologico (Oiv) riporta i limiti e le caratteristiche di conformità chimica, fisica e microbiologica per i lieviti secchi attivi. I metodi di valutazione riportati sono descritti solo per questi prodotti e si può supporre che eventuali altre formulazioni (lieviti freschi, in pasta, liquidi ecc.) in cui possono essere proposti – a norma di legge – i lieviti selezionati debbano comunque essere valutati con i medesimi metodi di analisi.

I requisiti microbiologici sono:

- di carattere igienico sanitario: il preparato cioè non deve contenere microrganismi contaminanti patogeni (in quanto naturalmente coadiuvante per l'industria alimentare);
- di interesse enologico: il preparato non deve contenere microrganismi contaminanti il cui sviluppo al di sopra di una determinata



L'impiego degli LSA richiede la preventiva fase di reidratazione, che deve essere seguita con perizia per evitare di compromettere la vitalità delle cellule di lievito.

soglia possa essere di danno qualitativo al vino nel quale viene utilizzato.

I prodotti oggetto della prova sono stati analizzati per le loro caratteristiche microbiologiche, utilizzando i metodi proposti dall'Oiv presso il laboratorio microbiologico di S.G. Biotech® per alcuni dei parametri e presso l'Istituto di microbiologia dell'Università Cattolica S.C. di Piacenza per altri. Dal punto di vista metodologico possiamo dire che un laboratorio aziendale con una sezione microbiologica ben attrezzata può svolgere le analisi relative all'isolamento su terreno selettivo di alcuni microrganismi di interesse enologico, come i lieviti

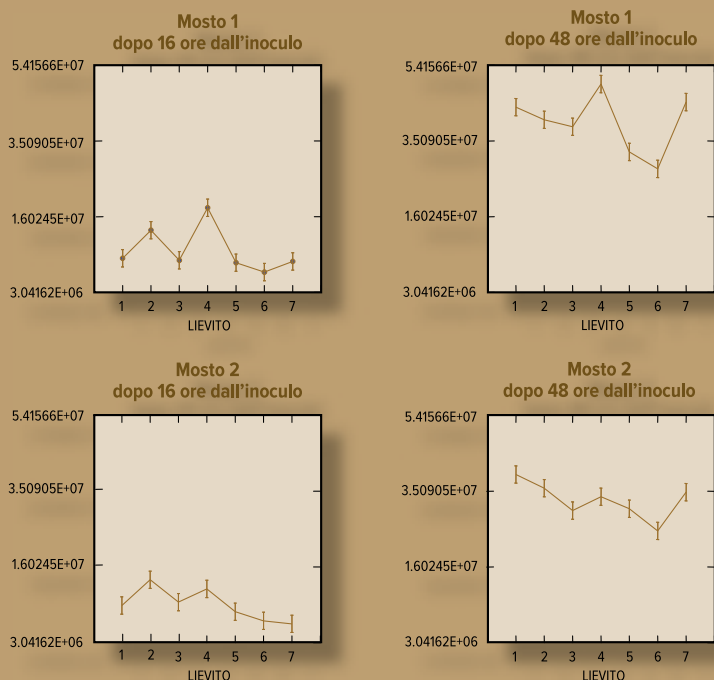
totali, i lieviti non *Saccharomyces*, i batteri lattici ed eventualmente i batteri acetici, mentre per la ricerca dei microrganismi patogeni i metodi prevedono fasi di arricchimento e isolamento che sono possibili solo all'interno di laboratori microbiologici specializzati.

Oltre alla valutazione con il metodo ufficiale di coltura su piastra per la conta delle cellule vitali, è stato utilizzato un sistema di analisi a fluorescenza (Nucleocounter® YC-100TM) che permette di valutare sia la carica totale di cellule sia le cellule vitali e non vitali. Lo stesso metodo è stato poi utilizzato nel monitoraggio delle popolazioni nelle prove di fermentazio-

Tesi	LA CONFORMITÀ MICROBIOLOGICA				
	Lieviti totali (UFC/g) (metodo ufficiale)	Lieviti vitali (conta con metodo Nucleocounter)	Batteri lattici UFC/g	Lieviti non <i>Saccharomyces</i>	<i>Brettanomyces</i>
	Conformità Codex OIV (res. Oeno 16-2003)				
	≥ 10 <sup>10</sup> UFC/g		< 10 <sup>4</sup>	< 0,01% dei totali	
Lievito 1 (SGB)	1,09 x 10 <sup>10</sup>	8,21 x 10 <sup>9</sup>	< 100	< 100 UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 2 (PRC)	1,02 x 10 <sup>10</sup>	5,75 x 10 <sup>9</sup>	< 100	< 100 UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 3	9,97 x 10 <sup>9</sup>	9,60 x 10 <sup>9</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>	< 100 UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 4	1,58 x 10 <sup>10</sup>	1,75 x 10 <sup>10</sup>	2,06x10 <sup>4</sup>	2,04 x10 <sup>4</sup> UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 5	1,10 x 10 <sup>10</sup>	1,21 x 10 <sup>10</sup>	1,15x10 <sup>3</sup>	< 100 UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 6	1,42 x 10 <sup>10</sup>	1,86 x 10 <sup>10</sup>	2,90x10 <sup>4</sup>	100 UFC/g	< 100 UFC/g
Lievito 7	1,13 x 10 <sup>10</sup>	1,12 x 10 <sup>10</sup>	< 100	< 100 UFC/g	< 100 UFC/g

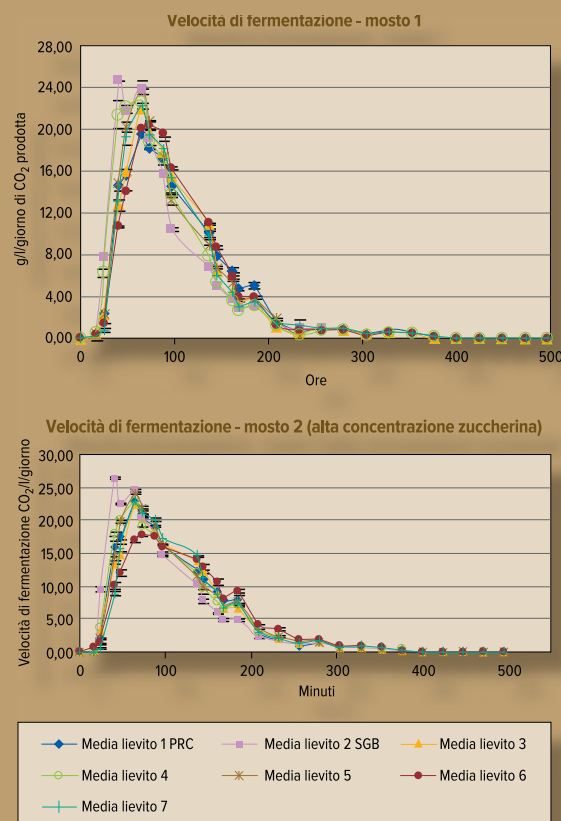
Tab. 1 - controllo qualità delle caratteristiche microbiologiche per i micro-organismi di interesse enologico dei lieviti analizzati.

## LE PERFORMANCE FERMENTATIVE



Graf.1 - Livelli di popolazione nelle prove di fermentazione su mosto 1 e su mosto 2 dopo 16 e 48 ore dall'inoculo (Least square means).

## LE VELOCITÀ DI FERMENTAZIONE



Graf. 2 Andamento della velocità di fermentazione nei due mosti, espressa in g/l di CO2 prodotta in un giorno.

ne e rappresenta uno strumento interessante per il controllo delle fermentazioni.

Infine si è voluta indagare l'eventuale presenza di cellule di *Brettanomyces* (verifica non prevista dal Codex per gli LSA), per il quale si è utilizzato un mezzo selettivo commerciale su piastra per l'isolamento in vino.

Come evidenziato in tabella 1, tutti i preparati presi in esame risultano conformi per quanto riguarda la presenza di microrganismi patogeni (Coliformi, Stafilococchi coagulasi positivi e Salmonelle). Nella ricerca dei microorganismi di interesse enologico al contrario si evidenzia per alcuni di essi (per la presenza di batteri lattici e lieviti non *Saccharomyces*) una presenza di inquinanti talvolta anche superiore ai limiti riportati dal Codex enologico. Dal punto di vista tecnologico questo potrebbe portare all'avvio di fermentazioni malolattiche indesiderate, all'innalzamento dell'acidità volatile o ad altre deviazioni organolettiche.

## VALUTARE LE PERFORMANCE ENOLOGICHE

Allo scopo di testare le prestazioni fermentative dei preparati freschi e dei LSA di riferimento sono state allestite due serie di prove di fermentazione su scala di laboratorio su mosto Chardonnay della vendemmia 2007, a due diverse condizioni di concentrazione zuccherina (180 e 230 g/l).

In modo particolare si sono volute riprodurre condizioni di fermentazione diverse per la concentrazione zuccherina iniziale che fossero rispettivamente facili e difficili

Le prove, condotte in bottiglie sterili inoculate con ognuno dei lieviti in esame opportunamente reidratati o diluiti (secondo quanto prevedevano le indicazioni d'uso date dal produttore) e inoculate in quantità equivalente a 20 g/hl, sono state condotte in doppio.

I dati relativi alle popolazioni presenti dopo 16 e dopo 48 ore dall'inoculo (cellule totali

valutate con il metodo Nucleocounter) nelle prove svolte sui due mosti sono stati inseriti in una matrice ed elaborati statisticamente applicando l'analisi della varianza ANOVA (pacchetto informatico Systat 10) nella quale si sono considerati il numero di cellule come variabile dipendente e l'epoca di prelievo, il mosto e il ceppo di lievito come fattori di variabilità. In questo modo si è potuto valutare statisticamente l'effetto di ognuno dei tre fattori sulla variabilità del sistema.

Il grafico 1 riporta l'effetto dei diversi ceppi sulla popolazione per ogni epoca di prelievo e per ognuno dei mosti. In modo particolare è possibile osservare che:

- il ceppo 4 presenta una popolazione significativamente superiore rispetto a tutti gli altri ceppi nel mosto 1 ma non nel mosto 2, a indicare una sua maggiore sensibilità alle elevate concentrazioni zuccherine;
- il ceppo 5 e il ceppo 6 presentano popo-



## LA CRESCITA CELLULARE

lazioni significativamente più basse rispetto agli altri lieviti in entrambe le epoche e in entrambi i mosti utilizzati;

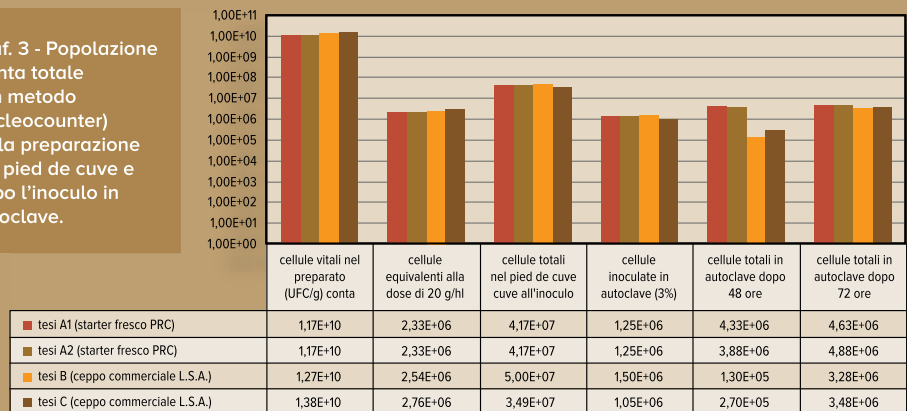
- nei lieviti 1 e 2 non si osservano differenze tra i due mosti mentre si osserva come per il lievito 1 la velocità di moltiplicazione (data dal confronto delle popolazioni nelle due epoche) sia maggiore rispetto a quella osservata nel lievito 2, che passa da livelli significativamente superiori alla maggior parte dei lieviti dopo 16 ore, a livelli superiori soltanto ai ceppi 5 e 6 dopo 48 ore.

La fermentazione è stata monitorata attraverso la misura del calo ponderale delle bottiglie per la valutazione della CO<sub>2</sub> prodotta.

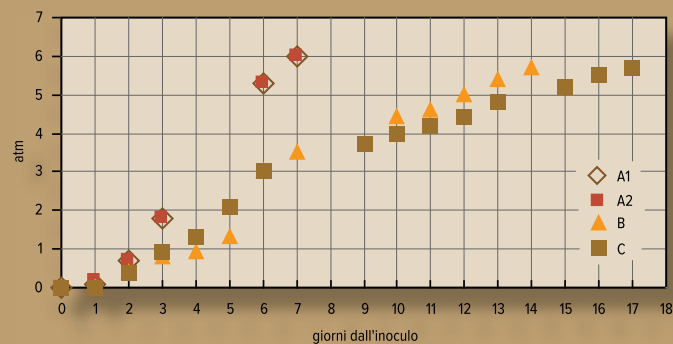
L'andamento fermentativo può essere descritto con la stima della velocità di fermentazione, espressa in grammi di CO<sub>2</sub> prodotta nell'unità di tempo e di volume (g/l/giorno). Tale misura risulta interessante per descrivere il comportamento del lievito nel corso di tutto il processo e in modo particolare per mettere in evidenza i momenti di massima velocità fermentativa e quelli di rallentamento. Il lievito 2 (SGB) presenta un avvio molto rapido in entrambi i mosti (grafico 2), con il raggiungimento in tempi brevi della massima velocità di fermentazione raggiunta da tutto il set di prove. Successivamente la velocità di fermentazione dello stesso lievito subisce una rapida caduta e scende nelle fasi centrali della fermentazione al di sotto della media degli altri ceppi. Altri lieviti (come il 4 per esempio) presentano un comportamento diverso nella capacità di raggiungere velocemente il picco di massima velocità di fermentazione nei due mosti a diversa concentrazione in zuccheri.

Comportamento nettamente diverso da tutti i lieviti in esame è quello del numero 6, con avvio più lento, che impiega un tempo nettamente maggiore per raggiungere un picco di massima velocità più basso rispetto a quello raggiunto da tutti gli altri lieviti, ma che mantiene elevata la sua velocità di fermentazione nelle fasi successive, tanto da chiudere la fermentazione in tempi non superiori a quelli degli altri lieviti. Evidenzia un comportamento simile (con un picco basso di Massima Ve-

Graf. 3 - Popolazione (conta totale con metodo Nucleocounter) nella preparazione del pied de cuve e dopo l'inoculo in autoclave.



## LA PRESSIONE SVILUPPATA IN AUTOCLAVE



Graf. 4 - Andamento dello sviluppo di pressione in autoclave a 20°C: confronto tra le tesi A, B e C.

locità fermentativa e mantenimento di un tasso di consumo degli zuccheri più elevato rispetto agli altri ceppi) anche il lievito 1.

Dall'analisi chimica effettuata sui vini al termine delle fermentazioni è emerso che in entrambi i mosti tutti i lieviti hanno completato il consumo degli zuccheri e che, a parte un caso (lievito 5, che manifesta un rendimento in alcol più elevato degli altri lieviti e una riduzione del contenuto in acido malico), i valori analitici riscontrati sono simili nelle due serie di fermentazioni e per la maggior parte dei lieviti utilizzati.

Soltanto il lievito 3 ha portato, soprattutto nella fermentazione del mosto 2, a vini con valori mediamente più elevati di acidità volatile, mentre i lieviti 1 (PRC) e 6 hanno dato vini con valori leggermente più alti in aldeidi acetica.

## LA SCELTA DEL LIEVITO NELLA RIFERMENTAZIONI IN AUTOCLAVE

A questo punto del processo di scelta, si sono verificate su scala industriale, le performance fermentative e qualitative di un preparato in forma fresca (tesi A1 e A2- inocolata con il ceppo PRC di S.G. Biotech®) in comparazione con due ceppi commerciali in forma di lieviti secchi attivi tra quelli più utilizzati nella spumantizzazione di vini base varietali (il ceppo EC1118 nella tesi B e il ceppo DV10 nella tesi C).

La prova si è svolta presso le strutture della Cantina Valtidone ed è consistita nello svolgimento contemporaneo, su un'unica base spumante Ortrugo 2008, della rifermentazione di quattro autoclavi del volume di 50 hl. Il lievito della tesi A è stato inoculato in doppio in due



autoclavi (A1 e A2), al fine di applicare una verifica della ripetibilità del metodo utilizzato.

La base è stata preparata in un'unica massa omogenea di 200 hl, stabilizzata e arricchita per un contenuto di zuccheri minimo di 24 g/l, utili allo sviluppo in autoclave di 6 atmosfere di pressione.

Per la preparazione del *ped de cuve* è stato adottato il protocollo standard utilizzato in cantina nella presa di spuma. La crescita cellulare all'interno del *ped de cuve* è stata monitorata con il metodo Nucleocounter. Al termine della fase di adattamento alle condizioni del vino base, la carica cellulare dei tre lieviti era in tutte e tre le tesi dell'ordine dei 35-40 milioni di cellule per ml (grafico 3).

I risultati mostrano un comportamento fermentativo nettamente diverso delle due repliche del lievito fresco e dei due preparati commerciali di lievito secco attivo.

Mentre nell'autoclave inoculata con lo starter fresco si è osservato fin dalle prime 48 ore un avvio della moltiplicazione cellulare (da 1,25 milioni di cellule/ml inoculate in autoclave e presenti nel *ped de cuve* si passa a circa 4 milioni di cellule/ml), le cellule dei due preparati secchi sono andate incontro a una forte mortalità nella prima fase seguente all'inoculo in autoclave, con una riduzione della popolazione fino a un ordine di grandezza esponenziale.

Tale differenza si è riflessa nella diversa velocità di consumo degli zuccheri e nel conseguente sviluppo di anidride carbonica (pressione) all'interno dell'autoclave (grafico 4). Nelle due ripetizioni A1 e A2 infatti la rifermentazione si è conclusa in circa 7 giorni con completo esaurimento degli zuccheri. Nelle tesi B e C al contrario si sono osservati un avvio più lento e un rallentamento del consumo degli zuccheri, che si è protratto più a lungo nella tesi C.

In entrambi i casi le rifermentazioni sono state interrotte senza che si fosse completato il consumo degli zuccheri, rispettivamente al 15° e al 20° giorno, e con un residuo di circa 6 g/l di zuccheri.

Al termine della presa di spuma i vini non differivano sostanzialmente per le caratteristiche chimico-analitiche e sono stati sottoposti



Gli Starter Freschi sono lieviti che, grazie a un processo di produzione innovativo, si presentano in forma fluida e non necessitano di reidratazione prima dell'uso.

Per dare una risposta alle domande che ci si poneva in apertura, possiamo dire che senz'altro la risposta qualitativa del lievito in una fermentazione industriale è data dal ceppo scelto, dalle cui caratteristiche genetiche e dal cui patrimonio enzimatico dipendono lo stile e l'impronta che esso è in grado di dare al vino, ma anche che le proprietà del preparato industriale possono influenzare le performance fermentative del ceppo, mentre la sua purezza microbiologica può portare a deviazioni di carattere analitico, se non organolettico, delle quali non è direttamente responsabile il ceppo scelto.

L'affidabilità del fornitore è senz'altro un requisito fondamentale e l'introduzione di alcuni parametri di valutazione nel piano di controllo qualità della cantina potrebbe ridurre il rischio di utilizzo di preparati non del tutto conformi.

## Cosa sono gli Starter freschi?

Gli Starter Freschi per l'enologia sono colture industriali di *Saccharomyces cerevisiae* per uso enologico ottenute dalla società emiliana di biotecnologie S.G. Biotech® attraverso un processo innovativo (*Fly-starter – Fresh liquid yeast*) che consiste nella moltiplicazione dei ceppi in piccoli fermentatori su substrati di nuova formulazione e nella successiva separazione a freddo, che si svolge in assoluta sterilità e porta alla produzione e al confezionamento di un prodotto fluido della consistenza di una crema. Il prodotto ha una conservabilità di 30 giorni alla temperatura di 2-4°C. Il vantaggio rispetto agli LSA risiede nel fatto che le cellule non vengono sottoposte allo stress dell'essiccamento e della successiva reidratazione. La moltiplicazione in piccoli fermentatori permette di produrre e moltiplicare anche ceppi di interesse e selezione locale, se non aziendale, con risultati affidabili.

alla valutazione organolettica di un gruppo di assaggiatori esperti.

Il giudizio sulle caratteristiche organolettiche dei vini non è stato unanime, in quanto i giudici si sono divisi in coloro che, nello spumante base Ortrugo, premiavano nei lieviti della rifermentazione la capacità di conservare i caratteri organolettici del vitigno senza intervenire con caratteristiche aromatiche e gustative di natura fermentativa e in coloro che, al contrario, apprezzavano un apporto di aromi fermentativi soprattutto fruttati e di morbidezza gustativa. In linea generale il lievito PRC è stato descritto con caratteri fruttati e floreali.

Per quanto riguarda la formulazione, le prove sopra descritte dimostrano, al di là delle caratteristiche del ceppo la cui scelta come si è visto dipende dagli obiettivi di stile, che gli starter freschi rappresentano per alcune applicazioni enologiche un'alternativa affidabile, sia per quanto riguarda le caratteristiche microbiologiche, sia per le performance fermentative ottenute nelle fermentazioni su mosto e nelle rifermentazioni su scala industriale. ■

\*Consulente R&S

\*\*Cantina Valtidone - Borgonovo Val Tidone (PC)

\*\*\*S.G. Biotech® - Villanova sull'Arda (PC)