

Lieviti indigeni di cantina, una fonte di biodiversità per la territorialità dei vini

Nei mosti in fermentazione è presente una grande biodiversità di ceppi di lievito che partecipano al processo con frequenze diverse. Gli studi hanno dimostrato che alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* possono persistere in cantina per anni consecutivi e concorrere allo stile e alla definizione della territorialità dei vini

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, a causa del vantaggio competitivo che dimostra riguardo soprattutto alla sua resistenza all'etanolo, è solitamente la specie microbica che domina la fermentazione alcolica dei vini. Il raggiungimento di tale dominanza però può avvenire in tempi diversi e questo è principalmente dovuto al rapporto numerico tra le popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* e di *S. cerevisiae* presenti nel mosto, nonché alle proprietà delle diverse specie che costituiscono la popolazione dei non-*Saccharomyces*. **Studi condotti negli ultimi 25 anni hanno ampiamente dimostrato come le popolazioni di *S. cerevisiae* che conducono i processi fermentativi spontanei siano quasi sempre caratterizzate da un elevato polimorfismo genetico.** Questo significa che ceppi diversi possono essere coinvolti nella stessa fermentazione alcolica sia contemporaneamente che in successione (Shuller et al., 2007). Nonostante l'elevata biodiversità, nella maggior parte di queste fermentazioni, solo alcuni ceppi indigeni di *S. cerevisiae* sono presenti con frequenze di isolamento superiori al 25-50% (maggioritari), mentre un numero variabile di ceppi è presente in percentuali inferiori (minoritari) (Pretorius et al., 2000). Studi di enologia condotti sulle fermentazioni spontanee in differenti areali vitivinicoli, hanno mostrato come alcu-

ni ceppi indigeni possano persistere nella stessa cantina per anni consecutivi, essere condivisi tra cantine di diverse zone vinicole, oppure essere rappresentativi di una specifica area geografica (Capece et al., 2016). In ogni caso, **i ceppi più persistenti sono certamente quelli capaci di adattarsi meglio all'ambiente e quindi sia alle specifiche pratiche di vinificazione utilizzate dalla cantina, sia alle condizioni ambientali di ciascuna area enologica** da cui provengono (clima, pratiche agricole, ecc.). Inevitabilmente i ceppi rilasceranno in vino prodotti secondari del metabolismo secondo quanto consente il loro bagaglio genetico e questo, in molti casi, si tradurrà in una correlazione significativa tra l'origine dei ceppi e le caratteristiche sensoriali dei vini prodotti (Bokulich et al., 2016). Nei programmi di selezione per ottenere ceppi indigeni di *S. cerevisiae* da utilizzare come colture starter, vista l'esistenza di due spinte selettive a cui le popolazioni indigene di *S. cerevisiae* sembrano essere sottoposte, una legata all'ambiente di cantina mentre l'altra alla territorialità (Knight et al., 2015), occorre mettere al centro della selezione lo stile aziendale, che è l'unico descrittore delle peculiarità delle singole cantine. Bisogna però sottolineare che pochissime indagini sono state effettuate per verificare l'effettiva persistenza in vendemmie

consecutive dei lieviti indigeni di un particolare ecosistema vitivinicolo. In una di queste, riguardante la biodiversità delle popolazioni di *S. cerevisiae* nelle fermentazioni spontanee di 11 cantine spagnole differenti (regione della Rioja) durante 3-4 annate consecutive ad esempio, non sono stati riscontrati ceppi indigeni di cantina o di areale ricorrenti nelle diverse annate (Santamaria et al., 2019). **Il nostro gruppo di ricerca coordinato da Lisa Granchi (DAGRI, Università degli Studi di Firenze), in collaborazione con lo Spin Off Universitario FoodMicroTeam, ha studiato la diversità genetica delle popolazioni di *S. cerevisiae* in fermentazioni alcoliche spontanee allestite durante un periodo che va da 3 a 10 vendemmie consecutive** presso alcune cantine toscane situate in regioni enologiche differenti. Lo scopo di questo lungo lavoro di ricerca era quello di valutare la presenza e la persistenza di ceppi di *S. cerevisiae* che fossero indigeni della cantina e/o della zona di appartenenza della cantina stessa (Granchi et al., 2019).

BIODIVERSITÀ DEGLI ISOLATI DI *S. CEREVISIAE* PROVENIENTI DA DIVERSE AZIENDE VINICOLE TOSCANE

Un totale di ventotto fermentazioni alcoliche spontanee sono state allestite durante le vendemmie realizza-

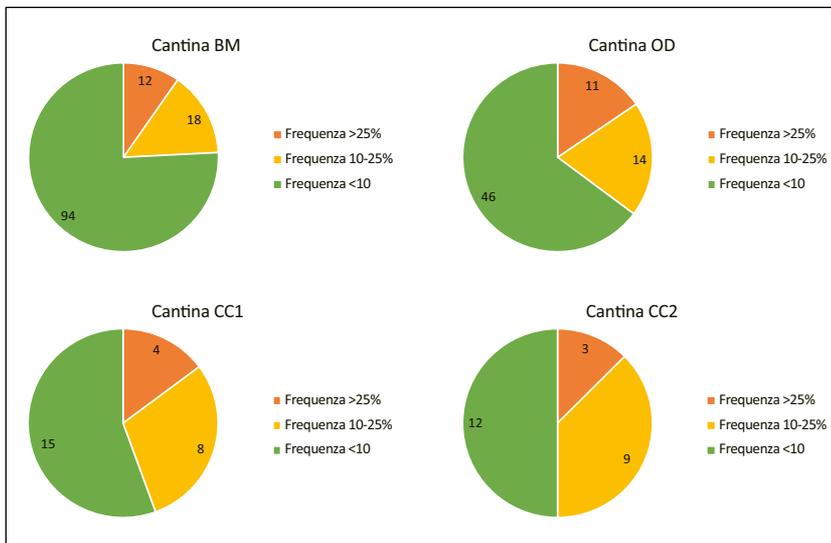


Figura 1 - Numero di ceppi indigeni riscontrati in ciascuna cantina e suddivisi in base alle frequenze di isolamento dalle fermentazioni spontanee condotte nelle varie annate prese in considerazione (11 per la Cantina BM, 10 per la Cantina OD, 4 per la Cantina CC1, 3 per la Cantina CC2)

te in annate consecutive (da 3 a 11) presso quattro cantine situate in tre regioni enologiche differenti della Toscana, quella del Brunello di Montalcino DOCG (Cantina BM, 11 annate), della Val d'Orcia DOC (Cantina OC, 10 annate) e del Chianti Classico DOCG (Cantina CC1, 4 annate; Cantina CC2, 3 annate). Le cantine scelte per la sperimentazione erano operative da molti anni e non avevano mai fatto uso di lieviti starter commerciali per la gestione della fermentazione alcolica. Il totale degli isolati di lievito *S. cerevisiae* presi in considerazione in questo studio è stato di 2436, di questi 248 erano ceppi differenti sulla base dell'approccio molecolare utilizzato (analisi del polimorfismo di restrizione del DNA mitocondriale). Non tutti questi ceppi però avevano frequenze di isolamento elevate (**figura 1**).

Indipendentemente dal numero di annate considerate, il gruppo più numeroso era sempre quello dei ceppi con una frequenza di isolamento minore del 10% seguito da quello con una frequenza compresa tra il 10 e il 25%. In ogni caso, quasi tutte le 28 vinificazioni prese in esame mostravano almeno un ceppo con una frequenza di isolamento superiore al 25% confermando i risultati ottenuti anche da altri Autori (Capece et al., 2012). **La biodiversità osservata era dunque piuttosto elevata in tutte le cantine** e i valori statistica-

mente maggiori osservati in alcune di esse non dimostravano una correlazione con l'impiego di pratiche di viticoltura biologica, come riportato invece da altri Autori (De Celis et al., 2019), ma sembravano piuttosto l'effetto combinato di molti parametri quali il clima, la gestione del vigneto, le pratiche di cantina, ecc. È ragionevole pensare quindi che sia l'insieme delle pratiche agronomiche ed enologiche a definire la nicchia ecologica che ha selezionato i lieviti indigeni di ciascuna cantina.

LA PERSISTENZA DEI CEPPI DI *S. CEREVISIAE* INDIGENI DI CANTINA IN ANNATE DIVERSE

Le informazioni ottenute prendendo in esame i profili di restrizione del DNA mitocondriale sono state utilizzate anche per verificare la possibilità che ciascuna cantina avesse selezionato con il tempo un numero ristretto di ceppi in grado di dominare le fermentazioni alcoliche spontanee di annate differenti (**tabella 1**). Come si evince dalla tabella alcuni ceppi indigeni persistenti sono stati individuati in tutte le aziende oggetto dello studio, in accordo con altri Autori (Torija et al., 2001).

Per capire quanto fossero diversi tra loro i vari ceppi persistenti trovati nelle quattro cantine, i profili di questi sono stati elaborati statisticamente (analisi dei clusters) al fine di raggrupparli in

Ceppo	Vendemmie successive										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BM-I	●	■					■				
BM-II	●		●								
BM-III	●				●						
BM-IV	●			●							
BM-V		●	■					●	●	●	●
BM-VI		●	●	■	●	■	●	■	■	■	■
BM-VII		●	●								
BM-VIII		●		●							
BM-IX		●	●		●						
BM-X			●			●				●	
BM-XI						●		●			
BM-XII									●	●	
BM-XIII						●	●	●			
BM-XIV							●	●			
BM-XV								●	●	■	●
BM-XVI								●			●
BM-XVII								●	●		●
BM-XVIII							●	●			
BM-XIX								●			●
BM-XX									●	●	●
BM-XXI										●	●
OC-I	●		●	●					●	●	
OC-II					●	●					
OC-III	●		●	●	●	●	●	●			
OC-IV	●	●	■	●	●		●	●	●	●	
OC-V	●			●							
OC-VI	●		●	●							
OC-VII	●		●	●							
OC-VIII	●	●	■	■	■	■		●			
OC-IX	●							●	●	●	
OC-X			●					●			
OC-XI									●	■	●
OC-XII								●	●	●	
OC-XIII								●		●	
OC-XIV									●	■	■
CC1-I	●	●	●								
CC1-II	●			■							
CC1-III	■	■	●								
CC1-IV	●	●									
CC1-V	●	●									
CC1-VI	●			■							
CC1-VII	●	●	●								
CC2-I	■	●	●								
CC2-II	●	●	■								
CC2-III	●	●	●								
CC2-IV	●	●	●								

Tabella 1 - Ceppi indigeni di ciascuna cantina che si sono dimostrati persistenti in almeno 2 annate differenti (in verde: annate in cui il ceppo è presente con percentuali di isolamento < 25%; in rosso: frequenze di isolamento comprese tra il 25 e il 90%); BM: ceppi provenienti dalla cantina situata a Montalcino; OC: ceppi provenienti dalla cantina della Val d'Orcia; CC1 e CC2: ceppi provenienti dalle cantine 1 e 2 della zona Chianti Classico

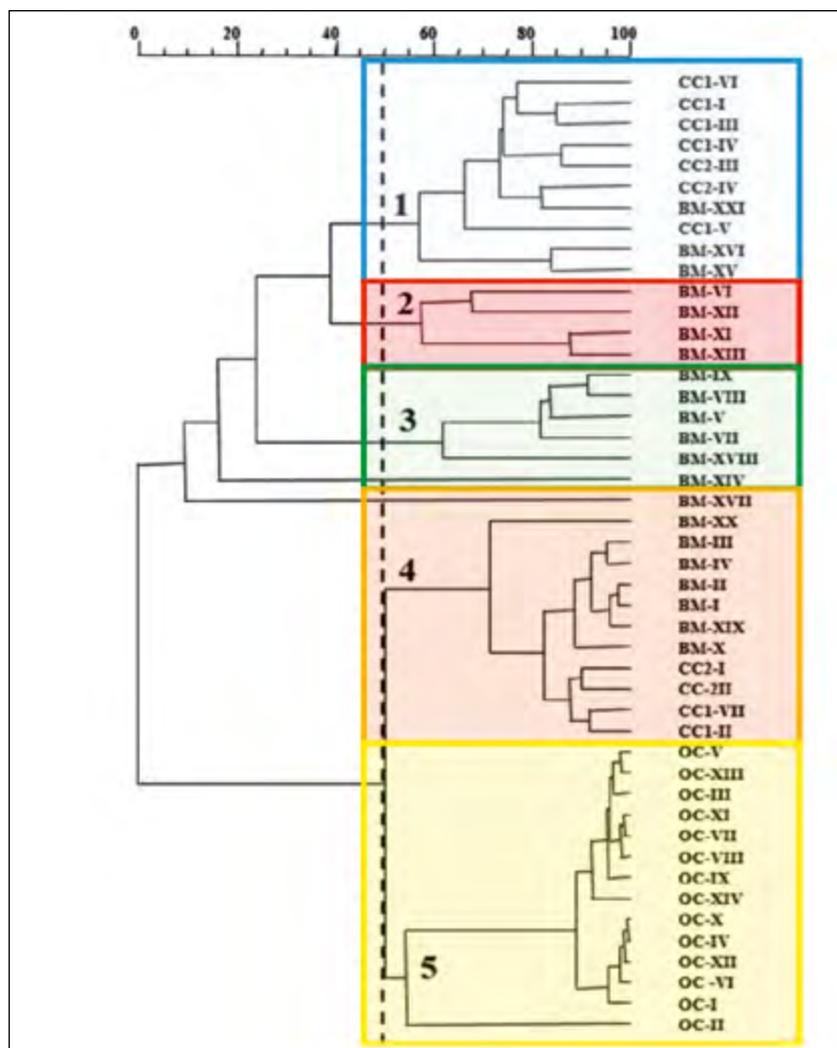


Figura 2 - Dendrogramma ottenuto sottoponendo ad analisi dei cluster i profili genetici dei vari ceppi indigeni di cantina. BM: ceppi provenienti dalla cantina situata a Montalcino; OC: ceppi provenienti dalla cantina della Val D'Orcia; CC1 e CC2: ceppi provenienti dalle cantine 1 e 2 della zona Chianti Classico

base alle loro somiglianze genetiche (percentuale di similarità) (figura 2). Come è possibile osservare i ceppi si raggruppano in 5 gruppi principali, prevalentemente sulla base della cantina di origine. Pertanto, i ceppi presi in considerazione in questo studio sembrano essere rappresentativi della singola cantina piuttosto che di una specifica area enologica. Infatti, nonostante le due cantine CC1 e CC2 si trovino nella stessa zona (Chianti Classico DOCG) e distino tra loro soltanto una ventina di chilometri, presentavano un numero decisamente esiguo di ceppi geneticamente simili. Questo è ancora più evidente per le cantine BM e OC, che distano soltanto 30 km. Pertanto, **i risultati suggeriscono che "l'effetto cantina" sulla selezione dei ceppi indigeni, così**

come definito da Vezinhet et al. (1992), sia stato preponderante su quello legato alla territorialità, anche se probabilmente in qualche misura sinergico.

IL VANTAGGIO COMPETITIVO DEI CEPPI DI *S. CEREVISIAE* DOMINANTI E PERSISTENTI NELLE FERMENTAZIONI

Nelle fermentazioni spontanee dunque alcuni ceppi di *S. cerevisiae* possono essere presenti a percentuali di isolamento molto più significative rispetto ad altri e anche persistere in annate differenti. A questo punto non resta che chiedersi quali vantaggi competitivi possiedono questi ceppi per riuscire a dominare sugli altri. Una risposta a questa domanda ha tentato di darla il nostro gruppo di ricerca

in un recente studio pubblicato sulla rivista scientifica *Frontiers in Microbiology* (Ganucci et al., 2018) dove abbiamo dimostrato come i ceppi dominanti e persistenti di *S. cerevisiae* possedessero una velocità di crescita maggiore e una fase di latenza più corta rispetto a quelli non dominanti, quando esposti a combinazioni di etanolo e temperatura che simulavano le condizioni della fermentazione alcolica dei vini. In conclusione, questi risultati contribuiscono da un lato a dimostrare il ruolo centrale dell'etanolo e della temperatura nel mettere alla prova la capacità dei ceppi di dominare le fermentazioni spontanee, dall'altro a sottolineare l'importanza di una corretta selezione dei lieviti indigeni da utilizzare come starter. Infatti, il requisito primario di un ceppo starter deve ovviamente essere quello di possedere la capacità tecnologica necessaria per portare a termine la fermentazione alcolica.

DAL LABORATORIO AL VINO: SELEZIONE, PRODUZIONE E IMPIEGO IN CANTINA DI UN CEPPLO INDIGENO DI *S. CEREVISIAE*

Grazie a un progetto finanziato dalla regione Toscana nel 2016 (Piano di Sviluppo Rurale 2014–2020 sottomisura 16.2: **"Produzione in cantina di lieviti starter autoctoni—VICASTART"** - www.vicastart.it), svolto dal nostro gruppo in collaborazione con il team di Alessandro Parenti (DAGRI – UNIFI), e con lo spin off FoodMicroTeam, abbiamo avuto la possibilità non solo di selezionare un lievito indigeno da impiegare come starter per la produzione di vino da una realtà Toscana, ma anche di mettere a punto un impianto pilota per la produzione, direttamente in cantina, di lievito in pasta (foto 1). L'impianto è stato realizzato in collaborazione con Parsec S.r.l. e la cantina coinvolta era la VICAS - Vitecoltori Colline Arno e Sieve di Pontassieve (FI). L'idea del progetto era quella di realizzare un **impianto semplice che potesse essere utilizzato direttamente in cantina** e pensato soprattutto per ridurre i costi necessari alla produzione degli starter quando questi sono prodotti in piccole quantità, perché impiega-



Foto 1 - Impianto pilota per la produzione di lievito in pasta direttamente in cantina realizzato in occasione del progetto, finanziato dalla Regione Toscana, VICASTART

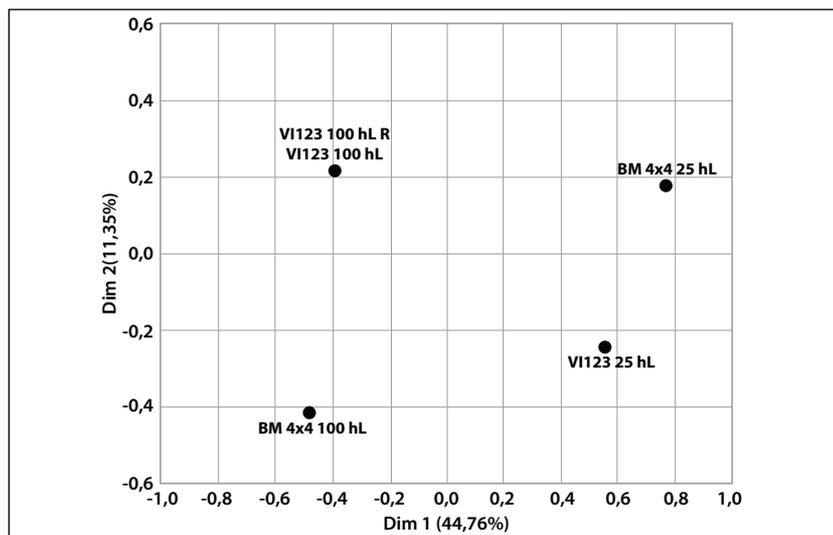


Figura 3 -Mappa di consenso ottenuta trattando statisticamente, mediante l'analisi multivariata (Generalized Procrustes Analysis), le 30 mappe ottenute dagli assaggiatori secondo il metodo Napping. Questo metodo consente ai soggetti di esprimere le somiglianze percepite attraverso il posizionamento dei campioni lungo le due dimensioni di un piano. I campioni posizionati distanti sono quelli percepiti come diversi, mentre quelli posizionati vicini sono percepiti come simili

ti per inoculare relativamente poche fermentazioni. I risultati scientifici di questa attività (Guerrini et al., 2021) mostrano come, dopo aver selezionato un ceppo di *S. cerevisiae* indigeno di cantina sulla base di caratteristiche enologiche e tecnologiche rilevanti, questo sia stato moltiplicato nell'impianto pilota per poi essere impiegato come starter in fermentazioni da 25 e 100 hL. In parallelo, per confronto, sono state realizzate fermentazioni analoghe utilizzando lo starter commerciale normalmente utilizzato dalla stessa cantina (BM4x4). Il preparato ottenuto con il lievito indigeno di can-

tina non solo ha dimostrato di avere le stesse *performance* tecnologiche dello starter commerciale, ma è riuscito anche a conferire al vino caratteristiche chimiche e sensoriali distinte. Particolarmente interessante è il fatto che le differenze sensoriali non siano state percepite soltanto da un panel addestrato che seguiva la procedura prevista dall'OIV, ma anche da un panel più eterogeneo composto da professionisti di settore, giornalisti, consumatori, studenti per un totale di trenta persone. In questo caso è stato utilizzato il metodo qualitativo del Napping (Risvik et al., 1994) (**figura 3**).

Entrambi i ceppi di lievito hanno mostrato differenti *performance* sensoriali in base alle dimensioni della vasca di fermentazione. Per quanto riguarda le preferenze espresse, il vino più apprezzato è stato quello ottenuto con il ceppo indigeno di cantina (VI123) inoculato in 100 hL di mosto (67% delle preferenze). Il vino ottenuto con il ceppo commerciale inoculato in 100 hL è risultato la seconda scelta con il 19% delle preferenze. Le restanti preferenze (14%) sono state espresse per il vino ottenuto con il ceppo indigeno inoculato in 25 hL di mosto. Nessuna preferenza è stata espressa per il ceppo commerciale quando inoculato in 25 hL.

CONCLUSIONI

Gli studi qui descritti dimostrano come **la biodiversità dei lieviti indigeni di cantina possa essere responsabile di alcune caratteristiche peculiari e percepibili del vino e pertanto possa essere sfruttata per esaltare la territorialità del proprio prodotto**. Questo però può essere ottenuto solo a fronte di una selezione adeguata che riguardi sia le capacità del ceppo di impattare in modo positivo sulle caratteristiche sensoriali del vino, sia quelle relative alle *performance* tecnologiche, in modo da garantire l'efficacia dei processi fermentativi. I costi relativi alla produzione di piccoli quantitativi di lievito in pasta da parte di aziende specializzate possono essere contenuti dotando la cantina di un impianto per l'autoproduzione. L'impiego di ceppi indigeni di *S. cerevisiae*, naturalmente adattati a una specifica cantina e appositamente selezionati, può rappresentare un modo per contribuire alla conservazione della biodiversità e di conseguenza alla valorizzazione delle proprietà sensoriali tipiche dei vini di ogni specifica cantina.

La bibliografia è disponibile online:

<https://bit.ly/2UN0yza>

