

DOCUMENTO
TECNICO

Da sinistra:
M. Ciani,
G. D'Ignazi,
F. Comitini,
G. Mazzoni

* **Francesca Comitini**
** **Giuliano D'Ignazi**
** **Gianni Mazzoni**
* **Maurizio Ciani**

* Dipartimento di Scienze degli
Alimenti, Università Politecnica
delle Marche - Ancona
** Terre Cortesi Moncaro -
Montecarotto (AN)

MONITORAGGIO DELLA MICROFLORA INDIGENA LIEVITIFORME DURANTE LE FASI PREFERMENTATIVE

Il monitoraggio dei lieviti indigeni durante le fasi prefermentative ha evidenziato la presenza dominante sulle bacche d'uva del lievito *Aureobasidium* spp. Il trasporto e la sosta delle uve favoriscono il progressivo incremento dei lieviti apiculati che possono essere controllati con dosi di 10 g/q di metabisolfito di potassio.

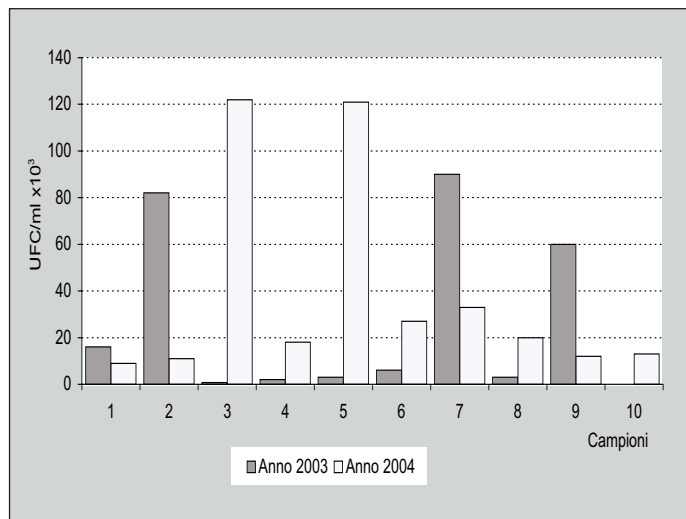
Introduzione

Il processo di vinificazione avviene grazie all'attività dei lieviti che trasformano lo zucchero del mosto d'uva in alcol, provocando la cosiddetta fermentazione alcolica, durante la quale avvengono una serie di complesse trasformazioni del substrato che danno origine al prodotto finale.

Il quadro microbiologico associato al naturale svolgimento della fermentazione alcolica è caratterizzato dalla

presenza di varie specie di lievito che si susseguono nel corso della fermentazione. Il processo di vinificazione, infatti, viene condotto su un substrato, mosto d'uva non sterile, che può contenere lieviti cosiddetti "selvaggi" che popolano naturalmente la superficie della bacca d'uva e gli ambienti di cantina (Rosini et al. 1982; Martini et al. 1996; Ciani e Rosini, 1993; Costanti et al. 1997). Numerosi studi sull'ecologia dei mosti in fermentazione hanno ormai chiarito la succes-

sione di lieviti apiculati (*Hanseniaspora-Kloeckera*) ed ellittici (*Saccharomyces cerevisiae*); questi ultimi dominano il processo fermentativo e sono i principali colonizzatori del mosto (Kunkee e Gosweel, 1977; Martini, 1993). Altri lieviti appartenenti soprattutto ai generi *Metschnikowia*, *Candida Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* possono essere presenti negli stadi intermedi e finali delle fermentazioni e

Fig. 1 - Microflora rinvenuta sulle uve al momento della raccolta

Confronto tra i campionamenti effettuati nelle due diverse annate.

alcuni possono influire negativamente sulle caratteristiche sensoriali e qualitative del vino finito (Fleet e Heard, 1993).

La pratica di inoculare i mosti con colture pure di lievito, ideata intorno al 1890 da Müller-Thurgau, in Italia è stata regolamentata nel 1977, con l'entrata in vigore del D.L. 3 ottobre 1977 con cui è stato autorizzato l'impiego degli starter L.S.A. (lieviti secchi attivi) in enologia, producendo una rapida diffusione delle fermentazioni condotte in "purezza microbiologica". Tuttavia, ad oggi alcuni autori e tecnici rimangono riluttanti nei confronti dell'uso dei lieviti starter, probabilmente a causa del fatto che gli starter reperibili in commercio pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica (Preorius, 2000) presentano una scarsa variabilità. Al contrario, le popolazioni miste di lieviti presenti naturalmente sulle uve o in cantina, possono portare alla produzione di vini con caratteristiche sensoriali ben distinte capaci in alcuni casi di esaltare la tipicità del prodotto (Ciani, 1997; Egli et al., 1998; Fleet e Heard, 1993; Herraiz et al., 1990). Affidando la fermentazione alla microflora che si sviluppa naturalmente nel mosto, si andrebbe tuttavia incontro a processi incostan-

ti, con vini non perfettamente riproducibili di anno in anno e con possibili inconvenienti relativamente alle caratteristiche sensoriali ed organolettiche. Da queste considerazioni nasce l'esigenza di evitare la proliferazione dei lieviti selvaggi che possono causare, con il loro sviluppo nelle fasi precedenti il processo fermentativo, il consumo di nutrienti come le varie fonti azotate o vitamine (tiamina in particolare) e/o la produzione di metaboliti tossici che possono influenzare il corretto sviluppo dei lieviti fermentanti e quindi il normale svolgimento del processo fermentativo.

La presente indagine condotta per due annate consecutive (2003 e 2004) si prefigge lo scopo di monitorare la microflora indigena durante le fasi pre-fermentative del processo di vinificazione che comprendono la raccolta delle uve, il conferimento delle stesse alla cantina ed i vari trattamenti pre-fermentativi. L'azienda vitivinicola interessata all'indagine, la Terre Cortesi Moncaro s.r.l. in Montecarotto (AN) si trova nel cuore della zona di produzione a Doc del verdicchio classico ed è costituita in forma cooperativa da vari soci che conferiscono le uve dalle zone limitrofe.

Con l'intento di attuare un miglior controllo sulle prime fasi del processo di vinificazione e mettere a punto un sistema di controllo che interessi anche la qualità microbiologica delle uve conferite si è sentita l'esigenza di investigare sull'evoluzione della microflora in queste prime fasi della vinificazione.

In particolare è stata valutata l'influenza dei tempi di sosta delle uve prima del conferimento in cantina e l'impiego di varie dosi di metabisolfito di potassio sullo sviluppo e diffusione della microflora selvaggia. Lo scopo finale era quello di mettere a punto una procedura atta a controllare e quindi successivamente a limitare la carica microbica riferita ai lieviti selvaggi che, se presenti in eccesso, possono interferire

sul regolare andamento del processo fermentativo e sulle caratteristiche organolettiche del vino.

Materiali e metodi

Il monitoraggio della microflora lievitifforme è stato effettuato utilizzando le tecniche microbiologiche classiche durante due stagioni vendemmiali consecutive (2003-2004).

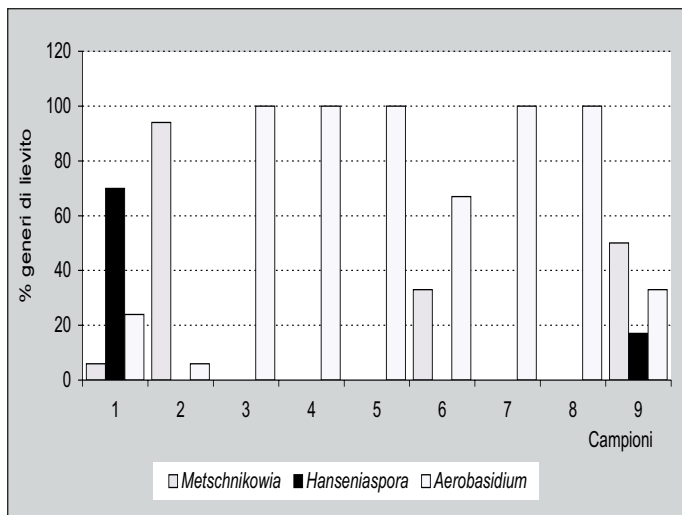
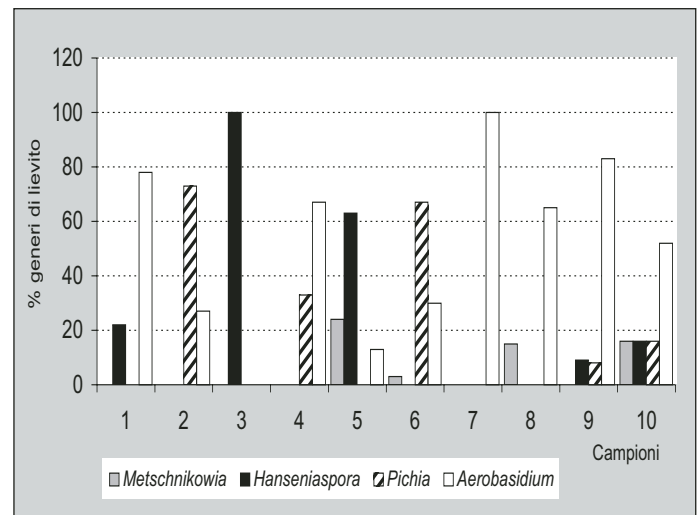
In particolare per le conte colturali in piastra sono stati utilizzati terreni differenziali e selettivi con lo scopo di ottenere risultati più dettagliati e più facilmente interpretabili. A questo scopo è stato utilizzato il terreno WL-agar che permette la crescita di tutti i lieviti e differenziando i vari generi in base al colore e alla morfologia assunta dalla colonia. In alcuni casi tale terreno è stato modificato mediante l'aggiunta di un antibiotico, la cycloheximide che a dosi selettive (0,05 g/l) inibisce la crescita di qualsiasi specie di lievito di ambito vinario fatta eccezione del genere *Kloeckera* e della sua forma perfetta *Hanseniaspora* e *Brettanomyces/Dekkera*.

Inoltre è stato utilizzato il terreno selettivo Agar-Lisina che non permette la crescita dei saccaromiceti (Lin, 1975).

L'analisi quantitativa delle uve al momento della raccolta è stata effettuata a partire dai grappoli che sono stati pigiati asetticamente all'interno di sacchetti sterili, posti in agitazione per 15 min. in un piano rotante (150 rpm) e quindi sono state effettuate le conte vitali nei vari terreni di coltura (Martini et al., 1996)

Relativamente al monitoraggio dei mosti al momento del conferimento in cantina sono stati analogamente raccolti in contenitori sterili, conservati a basse temperature durante il trasporto e sottoposti in laboratorio allo stesso trattamento precedentemente descritto.

I mosti ottenuti dopo pi-

Fig. 2a - Biodiversità dei lieviti presenti nei campioni di uve: anno 2003**Fig. 2b - Biodiversità dei lieviti presenti nei campioni di uve: anno 2004**

giatura sono stati campionati in ingresso (prima) ed in uscita (dopo) i vari trattamenti di chiarifica e sottoposti quindi alle analisi microbiologiche mediante la conta dei lieviti.

Risultati e discussione

I risultati relativi alla microflora presente sulla superficie delle bacche d'uva sono riassunti in Fig. 1 dove si possono osservare in particolare le differenze quantitative fra le vendemmie del 2003 e del 2004.

L'anno 2003 è stato caratterizzato da un andamento stagionale con poche piogge e temperature al di sopra della media. La presenza di lieviti sulle uve è risultata abbastanza limitata e solo 3 campioni dei 10 campioni analizzati sono risultati nella norma con una popolazione dell'ordine di 10^5 UFC/ml.

Nell'anno 2004, caratterizzato da un andamento stagionale con piogge frequenti e temperature al di sotto della media, la concentrazione della microflora lievitiforme è risultata in genere più abbondante ma sempre abbastanza contenuta a parte i campioni 3 e 5.

Le Figg 2a e 2b mostrano invece la distribuzione quantitativa dei lieviti relativa agli stessi campioni di uve.

Il genere più rappresentato e quantitativamente dominante nel corso degli anni 2003 e 2004 è risultato *Aerobasidium*. I generi fermentanti (*Metschnikowia*, *Pichia* e *Hanseniaspora*) sono risultati presenti solo sporadicamente. In particolare nel 2003 i lieviti apiculati sono stati ritrovati solo sul 22% dei campioni controllati e in quantità contenuta (circa 10×10^3 UFC/ml), mentre nel 2004 la colonizzazione delle uve è risultata pari al 50% dei campioni in concentrazioni variabili tra 1 e 100×10^3 UFC/ml.

I dati relativi all'influenza del trattamento con diverse dosi di metabisolfito di potassio delle uve in relazione anche ai tempi di sosta e alle diverse fasi della vendemmia, sono riassunti nelle Tab. 1 e 2. È interessante osservare che durante la sosta, la microflora subisce una modificazione con la riduzione e la scomparsa degli *Aerobasidium* e progressiva colonizzazione da parte dei lieviti fermentanti appartenenti ai generi *Pichia* e *Hanseniaspora*. Inoltre, confrontando lo stesso campione analizzato ad inizio ed a fine vendemmia, si può rilevare un consistente aumento della carica microbica probabilmente dovuto alla progressiva contaminazione dei materiali, degli attrezzi di cantina e dei contenitori uti-

lizzati nelle fasi della raccolta e del trasporto delle uve.

Dall'osservazione di tali risultati è possibile stabilire con certezza che il controllo della carica microbica può essere attuata utilizzando dosi di 10 g/ql di metabisolfito di potassio, diversamente 5 g/ql è risultata una dose insufficiente per il controllo della microflora indesiderata. Come si può rilevare le alte cariche microbiche osservate sono state maggiormente influenzate dall'epoca di conferimento delle uve (inizio-fine vendemmia) più che dai tempi di sosta.

Per quanto riguarda infine, l'influenza dei trattamenti prefermentativi sulla popolazione lievitiforme nel mosto è interessante osservare che tutti i trattamenti impiegati sono risultati in linea di massima efficaci per ridurre la popolazione lievitiforme selvaggia (Tab. 3).

Durante il processo di decantazione statica si nota una riduzione progressiva della carica microbica totale che risulta, a fine trattamento, di almeno un ordine decimale inferiore a quello di partenza. In particolare, il trattamento di flottazione ha mostrato un'azione più energica sull'abbattimento della microflora rispetto agli altri trattamenti.

Dall'osservazione generale di tutti i trattamenti impiegati si può notare che alla

riduzione della carica microbica si affianca tuttavia una modificazione della composizione microbica con la comparsa di specie che generalmente colonizzano gli ambienti di cantina ed in particolare la comparsa dei lieviti *Saccharomyces* (Rosini, 1984; Ciani et al., 2004).

Considerazioni conclusive

Dai dati che emergono da questo lavoro è possibile affermare che in tutti i campioni di uva analizzati, la specie presente in percentuali più elevate è quella del lievitosimile non fermentante *Aureobasidium* spp. in entrambe le annate prese in esame. A tale proposito, preliminari evidenze indicano come l'impiego di fungicidi sistemici di ultima generazione siano i responsabili della modificazione del quadro microbiologico riferibile ai lieviti della bacca d'uva (dati non mostrati). Pur non essendo molto presenti sulle uve, nelle successive fasi che precedono la fermentazione si assiste ad un progressivo sviluppo dei lieviti apiculati e l'uso della SO_2 sulle uve dopo la raccolta e durante il conferimento riesce solo in parte a limitare il loro sviluppo. L'epoca di raccolta nell'ambito della campagna vendemmiale ha influito più sul-

Tab. 1 - Campioni di uva raccolta a mano: valutazione della carica lieviti-forme dopo sosta di 6 ore e controllo microbiologico con diverse dosi di metabisolfito di potassio (g/q)

Campione	N. lieviti x 10 ³ /ml	Lieviti: % genere
Anno 2003		
Inizio vendemmia 0 g/q	400	<i>Metschnikowia</i> 50%; <i>Hanseniaspora</i> 23%; <i>Pichia</i> 27%
Inizio vendemmia 5 g/q	1100	<i>Metschnikowia</i> 10%; <i>Hanseniaspora</i> 36%; <i>Pichia</i> 54%
Inizio vendemmia 10 g/q	60	<i>Metschnikowia</i> 17%; <i>Hanseniaspora</i> 33%; <i>Pichia</i> 50%
Fine vendemmia 0 g/q	13000	<i>Hanseniaspora</i> 10%; <i>Metschnikowia</i> 20%; <i>Pichia</i> 70%
Fine vendemmia 5 g/q	11000	<i>Hanseniaspora</i> 25%; <i>Pichia</i> 75%
Fine vendemmia 10 g/q	570	<i>Pichia</i> 60%; <i>Hanseniaspora</i> 12%; <i>Metschnikowia</i> 19%; <i>Aereobasidium</i> 9%
Anno 2004		
Inizio vendemmia 0 g/q	80	<i>Pichia</i> 82%; <i>Metschnikowia</i> 12%; <i>Aereobasidium</i> spp 5%; <i>Hanseniaspora</i> 1%
Inizio vendemmia 5 g/q	4	<i>Hanseniaspora</i> 95%; <i>Metschnikowia</i> 5%
Inizio vendemmia 10 g/q	1040	<i>Hanseniaspora</i> 16%; <i>Pichia</i> 74%; <i>Aereobasidium</i> 5%; <i>Metschnikowia</i> 5%
Fine vendemmia 0 g/q	6500	<i>Hanseniaspora</i> 18%; <i>Pichia</i> 71%; <i>Saccharomyces</i> 6%; <i>Aereobasidium</i> 5%
Fine vendemmia 5 g/q	5300	<i>Pichia</i> 75%; <i>Kloeckera</i> 19%; <i>Metschnikowia</i> 3%; <i>Aereobasidium</i> 3%
Fine vendemmia 10 g/q	20	<i>Pichia</i> 93%; <i>Hanseniaspora</i> 7%

Tab. 2 - Campioni di uva raccolta a mano: valutazione della carica lieviti-forme dopo sosta di 24 ore e controllo microbiologico con diverse dosi di metabisolfito di potassio (g/q)

Campione	N. lieviti x 10 ³ /ml	Percentuale generi
Anno 2003		
Inizio vendemmia 0 g/q	1500	<i>Hanseniaspora</i> 80%; <i>Pichia</i> 20%
Inizio vendemmia 5 g/q metabisolfito	260	<i>Hanseniaspora</i> 92%; <i>Metschnikowia</i> 8%
Inizio vendemmia 10 g/q	400	<i>Hanseniaspora</i> 50%; <i>Pichia</i> 50%
Fine vendemmia 0 g/q	14000	<i>Pichia</i> 70%; <i>Metschnikowia</i> 20%; <i>Hanseniaspora</i> 10%
Fine vendemmia 5 g/q	4000	<i>Pichia</i> spp. 80%; <i>Hanseniaspora</i> 18%; <i>Metschnikowia</i> 2%
Fine vendemmia 10 g/q	800	<i>Hanseniaspora</i> 46%; <i>Pichia</i> 46%; <i>Metschnikowia</i> 8%
Anno 2004		
Inizio vendemmia 0 g/q	40	<i>Pichia</i> 65%; <i>Hanseniaspora</i> 16%; <i>Metschnikowia</i> 10%; <i>Aereobasidium</i> 9%
Inizio vendemmia 5 g/q metabisolfito	4	<i>Hanseniaspora</i> 82%; <i>Metschnikowia</i> 18%
Inizio vendemmia 10 g/q	0,7	<i>Pichia</i> 100%
Fine vendemmia 0 g/q	8000	<i>Pichia</i> 62%; <i>Hanseniaspora</i> 18%; <i>Saccharomyces</i> 18%; <i>Metschnikowia</i> 1%; <i>Aereobasidium</i> 1%
Fine vendemmia 5 g/q	2300	<i>Pichia</i> 81%; <i>Hanseniaspora</i> 17%; <i>Metschnikowia</i> 2%
Fine vendemmia 10 g/q	770	<i>Hanseniaspora</i> 68%; <i>Pichia</i> 32%

la carica microbica totale che sulla sua composizione, infatti il trattamento con 5 g/q di metabisolfito di potassio non riesce a contenere lo sviluppo dei lieviti apiculati soprattutto quando la sosta risulta prolungata. Diversamente, la presenza di 10 g/q di metabisolfito di potassio ha permesso di limitare lo sviluppo della microflora lieviti-forme totale dopo circa 24 ore a livelli uguali o inferiori a 10⁶ cell/ml anche se si assiste ad un incremento nel tempo dei lieviti apiculati.

A conferma di quanto già noto non è stata riscontrata la presenza di *S. cerevisiae* nelle uve (Rosini et al., 1982; Martini et al., 1996); tale lievito comincia a colonizzare alcuni campioni dei mosti in chiarifica cioè durante la decantazione statica e nelle altre procedure di trattamento pre-fermentativo dei mosti. Ciò a conferma dell'ipotesi che i *Saccharomyces* selvaggi provengono principalmente dalle attrezzature e dagli ambienti di cantina (Rosini, 1984; Costanti et al., 1997; Ciani et al., 2004). In conclusione, dai risultati ottenuti si può affermare che il monitoraggio della flora microbica durante tutte le fasi del processo di vinificazione, anche in quelle prefermentative, è una procedura indispensabile per ottimizzare il processo fermentativo e individuare le tecnologie di vinificazione più adatte al fine di ottenere un prodotto ottimale dal punto di vista qualitativo.

Riassunto

La presente indagine è stata condotta in due annate consecutive (2003-2004) con lo scopo di monitorare la microflora indigena durante le fasi pre-fermentative del processo di vinificazione che comprendono la raccolta delle uve, il conferimento delle stesse alla cantina ed i vari trattamenti pre-fermentativi. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che in tutti i campioni di uva analizzati il lievito dominante è risultato l'*Aereobasidium*

Tab. 3 - Influenza dei trattamenti prefermentativi sulla popolazione lieviti-forme nel mosto

Campione	N. lieviti x 10 ³ /ml	Percentuale generi
Anno 2003		
Decantazione statica inizio	110	<i>Metschnikowia</i> 10%; <i>Hanseniaspora</i> 54%; <i>Pichia</i> 36%
Decantazione statica fine	60	<i>Saccharomyces</i> 90%; <i>Hanseniaspora</i> 10%
Flottazione prima	2000	<i>Metschnikowia</i> 19%; <i>Hanseniaspora</i> 56%; <i>Pichia</i> 25%
Flottazione dopo	110	<i>Metschnikowia</i> 15%; <i>Hanseniaspora</i> 40%; <i>Pichia</i> 25%; <i>Aereobasidium</i> 20%
Centrifugazione prima	200	<i>Pichia</i> 100%
Centrifugazione dopo	100	<i>Pichia</i> 98%; <i>Saccharomyces</i> 2%
Anno 2004		
Decantazione statica inizio	670	<i>Metschnikowia</i> 3%; <i>Hanseniaspora</i> 4%; <i>Pichia</i> 93%
Decantazione statica fine	30	<i>Saccharomyces</i> 100%
Flottazione prima	38900	<i>Saccharomyces</i> 94%; <i>Metschnikowia</i> 1%; <i>Hanseniaspora</i> 2%; <i>Pichia</i> 3%
Flottazione dopo	43	<i>Saccharomyces</i> 91%; <i>Hanseniaspora</i> 9%
Centrifugazione prima	4900	<i>Pichia</i> 65%; <i>Saccharomyces</i> 13%; <i>Metschnikowia</i> 13%; <i>Hanseniaspora</i> 9%
Centrifugazione dopo	96	<i>Pichia</i> 84%; <i>Saccharomyces</i> 4%; <i>Metschnikowia</i> 3%; <i>Hanseniaspora</i> 9%

spp. Durante il trasporto e la sosta delle uve la composizione della microflora lieviti-forme ha subito una modificazione e progressivo incremento a favore dei lieviti fermentanti di forma apiculata. Il trattamento delle uve con 10 g/q di metabisolfito di potassio ha permesso di limitare lo sviluppo di tale microflora. Sulla concentrazione microbica più di altri fattori ha inciso in maniera determinante l'epoca di indagine (inizio-fine vendemmia).

Abstract

The present study was carried out during two consecutive years (2003-2004) with the aim to evaluate indigenous microflora during the pre-fermentation stages of winemaking process. The results obtained showed that *Aureobasidium* spp. resulted the dominant yeast genera in all grape samples. During the transport and temporary halts of grapes microflora composition undergoes enhancements and modifications in favour to fermentative apiculate yeasts. A treatment of grapes with 10 g/hl

of potassium meta bisulphite limited the development yeasts microflora.

The time of grape harvest (start and end of vintage) influenced microbial concentration of must more than the other factors investigated.

Bibliografia

Ciani M. and Rosini G., Vinificazioni industriali in "purezza microbiologica". Partecipazione della coltura starter al processo fermentativo. *Industrie delle bevande* 22: 202-206 (1993).

Ciani M., Role of biological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. In: S.G. Pandalai, Editor, *Recent Res. Develop. Microbiol.* vol. 1, Research Signpost, Kerala, India, pp. 317-331 (1997).

Ciani M., Mannazzu I., Marinangeli P., Clementi F. and Martini A., Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 159-164 (2004).

Costantini M., Poblet M., Arola L., Mas A., Guillar-

mon J.M., Analysis of yeast population during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 339-34 (1997).

Egli C.M., Ediger W.D., Mittrakul C.M., Henick-Kling T., Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 779-789 (1998).

Fleet G.H. and Heard G.M., Yeasts-growth during fermentation. In: G.H. Fleet, Editor, *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland pp. 27-54 (1993).

Herraiz T., Reglero G., Herraiz M., Martin-Alvarez P.J. and Cabezudo M., The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 313-318 (1990).

Kunkee R.E., Amerine M.A., Yeast in winemaking. In A.H. Rose and J.S. Harrison (ed.), *The yeasts: yeast technology*. Academic Press, London, pp. 5-72 (1970).

Lin Y., Detection of wild yeasts in the brewery. Efficiency of differential media. *J. Inst. Brew.* 81: 410-417 (1975).

Martini A., Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3 165-176 (1993).

Martini A., Ciani M. and Scorzetti G., Direct enumeration of and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 435-440 (1996).

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

Rosini G., Federici F. and Martini A., Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8: 83-89 (1982).

Rosini G., Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30: 249-256 (1984).