DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI
RISORSE NATURALI E AMBIENTE
DAFNAE

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

POTENZIALITÀ DEI MICRORGANISMI NELLA DEFINIZIONE E RAFFORZAMENTO DEI CARATTERI DI TIPICITÀ DELLA VARIETÀ VENETA TOCAI FRIULANO

Abstract

Le cantine che operano nella DOC Lison-Pramaggiore come la maggior parte delle realtà vitivinicole utilizzano da molti anni per avviare la fermentazione dei lieviti commerciali. Nonostante i grossi vantaggi che si ottengono dal loro utilizzo (vini di qualità elevata e costante) l'uso di ceppi selezionati può presentare anche degli svantaggi. Infatti, sebbene esistano un numero elevato lieviti selezionati sono relativamente pochi gli starter commerciali venduti nel mondo. Questo fatto aumenta sicuramente il rischio di una riduzione della biodiversità sia dei lieviti in vigneto che di quelli associati all'ambiente di cantina con una standardizzazione del gusto e un appiattimento delle caratteristiche specifiche delle diverse cantine Inoltre, gli starter reperibili in commercio, pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, proprio perché provengono da realtà vitivinicole estranee, non sono sempre capaci di sviluppare completamente gli aromi tipici di un vino, in particolare di quelli autoctoni.
In questo contesto l'introduzione di lieviti ecotipici (ceppi tecnologicamente rilevanti, ma isolati esclusivamente nei vigneti utilizzati per produrre lo specifico vino regionale) rispetto a quelli commerciali in uso, non solo può rappresentare la soluzione ai problemi di drastica diminuzione delle sfumature aromatiche tipiche del vino in questione , ma sicuramente è in grado di esaltare le caratteristiche di tipicità del prodotto fornendo, insieme al vitigno, un ulteriore elemento di "territorialità". In questo progetto è stato condotto un capillare campionamento nei vigneti della varietà Tocai friulano esistente nei territori della DOC Lison -Pramaggiore in fase di prevedemmia. Sono state raccolte diverse centinaia di campioni tra grappoli d'uva e porzioni di corteccia che sono state utilizzate per l'isolati di lieviti (più di 700). Tra questi mediante metodi genetici sono stati identificati quelli di interesse enologico (*Saccharomyces*) e caratterizzati, tramite indagine del DNA, a livello di ceppo. Gli isolati così identificati sono stati sottoposti a caratterizzazione fenotipica per la determinazione delle proprietà enologiche. I migliori sono stati utilizzati in "nanovinificazioni" (fermentazioni in 100 ml di mosto naturale di Tocai). In questa fase, tramite una valutazione sensoriale dei fermentati è stato possibile individuare i ceppi migliori. Nelle successive due vendemmie ciascun ceppo è stato saggiato in 33lt di mosto di Tocai italico, vinificato seguendo il protocollo classico utilizzato per la produzione del vino Lison. Sono stati valutati i 7 migliori ceppi (1 isolato da grappolo e 6 da tralcio) e come controllo è stato aggiunto un ceppo commerciale ampiamente utilizzato per la produzione di questo vino. I prodotti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi sensoriale utilizzando un panel di giudici che comprendeva produttori e tecnici, selezionati dal Consorzio Lison-Pramaggiore. E' stato valutato il profilo sensoriale di ciascun vino attraverso il quale è stato possibile scegliere il ceppo che più ne esaltava

le caratteristiche di tipicità. Nell'ultima vendemmia (settembre 2012) questo ceppo è stato utilizzato da due produttori aderenti al Consorzio in fermentazioni di cantina (25 ettolitri). La prova è ancora in corso di svolgimento, ma i risultati preliminari indicano di nuovo che il ceppo ha notevoli capacità di esaltare le caratteristiche di questo vitigno. Infine è stata condotta mediante metodi molecolari un'indagine filogenetica sui ceppi isolati. Confrontando le caratteristiche genetiche dei lieviti isolati nei territori della DOCG Conegliano Valbobbiadene Prosecco Superiore e della DOC Piave è possibile affermare che la popolazione isolata nei vigneti del Tocai friulano ha caratteristiche specifiche che la distinguono nettamente dalle altre due. Sulla base dei risultati della selezione condotta con successo nei vigneti di Tocai friulano e delle analisi filogenetiche è possibile perciò concludere che l'utilizzo del lievito ecotipico ottenuto può essere considerato un valido strumento in grado di contribuire al rafforzamento dell'identità del vino Lison Classico.

La selezione di lieviti enologici in vigneto

E' orma una prassi di cantina consolidata utilizzare nel processo di vinificazione lieviti selezionati,. Questi starter commerciali, proposti unicamente da multinazionali del settore e perciò provenienti dalle più diverse realtà vitivinicole mondiali, sicuramente forniscono l'enorme vantaggio di controllare la fermentazione alcolica per l'ottenimento di un prodotto di elevata qualità e costante tra le diverse annate. L'uso di tali lieviti selezionati, per contro, può presentare anche degli svantaggi, per nulla trascurabili, poiché fra tutte le colture commercializzate sono relativamente poche quelle realmente utilizzate in tutto il mondo dai vinificatori. Per questo motivo, è sicuramente forte il pericolo di un'uniformazione dell'agente microbico con il risultato di ottenere una riduzione della biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina, ma soprattutto una standardizzazione del gusto e un appiattimento delle caratteristiche specifiche dei vini delle diverse aree produttive. Inoltre, gli starter reperibili in commercio, pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, proprio perché provengono da realtà vitivinicole estranee, non sono sempre capaci di sviluppare completamente gli aromi tipici di un vino.
In questo contesto l'introduzione dei lieviti ecotipici può rappresentare la soluzione sia ai problemi di mantenimento della biodiversità microbica che di drastica diminuzione delle sfumature qualitative ora descritti. Infatti, questi lieviti vengono utilizzati esclusivamente nella zona di isolamento e sono selezionati seguendo le caratteristiche di tipicità del prodotto locale. Sono i lieviti che originariamente davano luogo alla fermentazione spontanea e contribuivano in questo modo a costruire le caratteristiche di tipicità del vino, poiché, ogni zona pedoclimatica e ogni singolo vigneto nel tempo costituiscono una micro-nicchia per l'insediamento di uno specifico complesso di lieviti enologici. I microrganismi di questi micro-*habitat* sono adattati ed evoluti per vivere in quel luogo, ma soprattutto sono responsabili dei caratteri organolettici specifici del vino prodotto localmente.
Per I motivi ora citati, quindi, il programma di selezione oggetto di questo progetto può essere considerato sicuramente un valido elemento che contribuisce al rafforzamento dell'identità del

prodotto enologico ottenuto dal vitigno Tocai friulano, in un momento particolarmente delicato che ha visto un sofferto cambiamento di denominazione.
In relazione all'approccio utilizzato è interessante ricordare che il gruppo di Microbiologia degli Alimenti in collaborazione con il Consorzio di tutela Conegliano Valdobbiadene Prosecco Superiore DOCG e il Consorzio Piave, in collaborazione con Veneto Agricoltura, ha precedentemente concluso con successo altri due progetti di selezione di lieviti isolati dai vigneti di due vitigni storici della regione Veneto: Glera e Raboso Piave. Questa esperienza è anche servita ad affinare le metodiche (sia genetiche che convenzionali) riguardanti tutte le fasi della selezione (dall'isolamento dei lieviti alla definizione dei caratteri tecnologici fino alle prove di microvinificazione e vinificazione in cantina) che sono state utilizzate in questo progetto.

Isolamento e caratterizzazione di lieviti da grappoli di Tocai friulano

Nella prima fase del progetto è stato condotto un campionamento raccogliendo uve della varietà Tocai friulano nella DOC Lison-Pramaggiore. Sono stati raccolti un totale di 173 campioni in 45 diverse aziende. I grappoli sono stati fermentati singolarmente e successivamente dai succhi fermentati sono stati isolati lieviti mediante diluizione su piastra. Sono quindi state isolate un totale di 770 colonie morfologicamente riconducibili a lieviti enologici appartenenti al genere *Saccharomyces* (il lievito dotato delle migliori caratteristiche enologiche). Tali colonie sono state sottoposte ad analisi molecolari per confermare l'appartenenza al gruppo d'interesse e per definire l'identità del ceppo di lievito. Sono stati ottenuti 19 ceppi ecotipici diversi tutti appartenenti alla specie *Saccharomyces* cerev*isi*ae (fig.1). I lieviti così ottenuti sono stati valutati per le loro *performance* fermentative in 100 ml di mosto sintetico. Da tale prova sono stati scelti i ceppi migliori che non hanno dato in fermentazione sentori sgradevoli per essere inoculati in mosto di tocai (nanovinificazioni in 100ml di mosto) e quindi degustati. E' stato chiesto a 5 giudici scelti tra i produttori associati al consorzio di valutare il vino considerando in primo luogo le caratteristiche di tipicità, inoltre di verificare la presenza di eventuali difetti e di note organolettiche positive. E' stata inoltre valutata, per ogni ceppo, la produzione di acido solfidrico e anidride solforosa. La maggior parte dei ceppi analizzati mostra avere una produzione media sia di idrogeno solforato che di anidride solforosa (il 52%) mentre un'elevata produzione dei due composti si è riscontrata nel 46% e degli isolati. Solo il 2% e dei ceppi analizzati ha una produzione bassa di entrambi i composti.

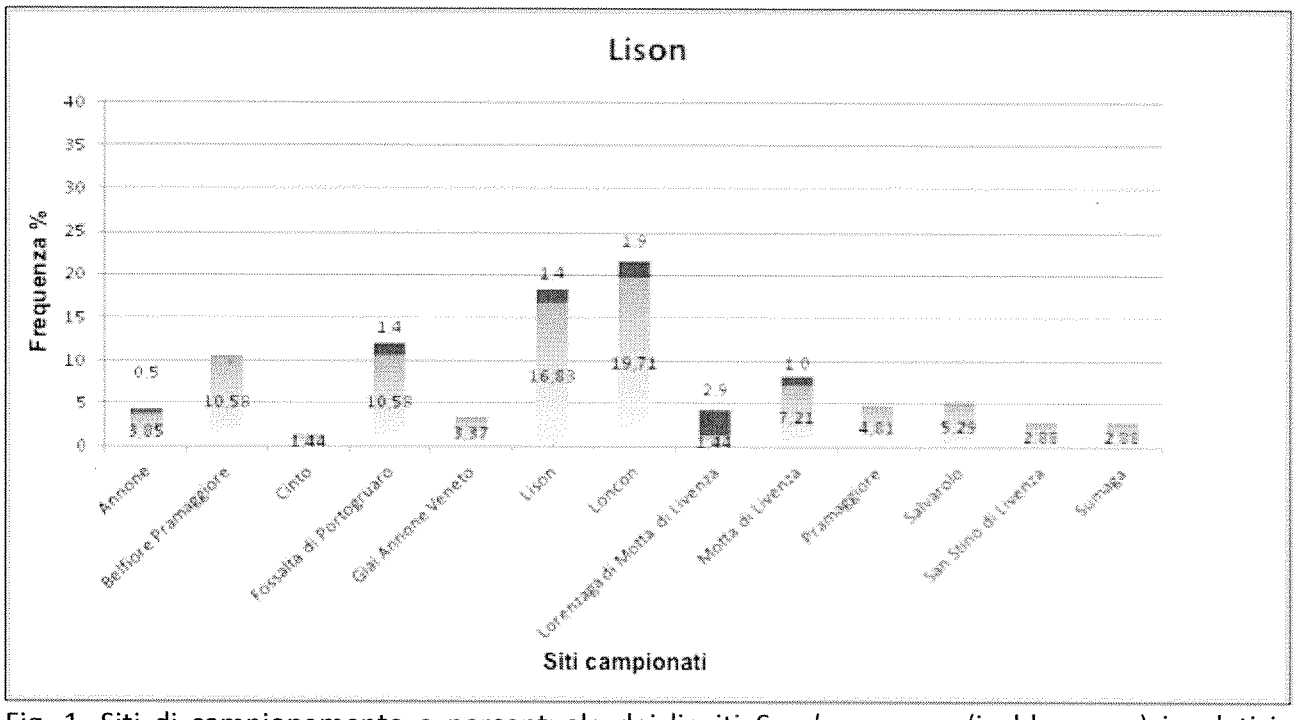

Fig. 1. Siti di campionamento e percentuale dei lieviti *Saccharomyces* (in blu scuro) insolati in ciascun sito.

Isolamento e caratterizzazione di lieviti dalla corteccia di vite della varietà Tocai friulano

In seguito alla scarsa presenza di lieviti del genere d'interesse riscontrata sull'uva di Tocai friulano, è stato deciso di condurre un campionamento pilota prelevando 22 porzioni di ritidoma per isolare nuovi ceppi ecotipici. Dall'analisi delle 43 colonie isolate e confermate appartenere al genere d'interesse, sono stati identificati 7 ceppi diversi tutti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. Considerato l'elevata biodiversità di *S. cerevisiae* riscontrata nelle porzioni di ritidoma prelevate, durante l'autunno successivo è stato condotto un secondo campionamento in post vendemmia su larga scala. Sono stati raccolti 44 campioni e fermentati singolarmente in mosto sintetico. Successivamente, sono state isolate colonie con morfologia riconducibile al genere *Saccharomyces*. Le analisi molecolari condotte in seguito hanno rivelato la presenza di 36 ceppi diversi appartenenti alla specie tecnologica *Saccharomyces cerevisiae*, nessuno appartenente a ceppi commerciali attualmente in uso. Anche in questo caso, tutti i ceppi isolati nei due campionamenti su tralcio, e aventi profili diversi, sono stati sottoposti a prove di fermentazione. I ceppi aventi buone *performance* fermentative in mosto sintetico sono stati quindi fermentati in 100 ml di mosto Lison e degustati da un panel di esperti. Dal totale dei ceppi analizzati, ne sono stati scelti sette per le successive prove di microvinificazione.

Confrontando i risultati ottenuti da grappolo e da tralcio è possibile affermare quindi che il campionamento da ritidoma sembra essere più efficace sia in termini di numerosità dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* che in termini di biodiversità dei ceppi isolati.

Valutazione delle performance di fermentazione su scala pilota e in cantina

Sono state condotte negli ultimi due anni di progetto due serie di fermentazioni pilota presso la cantina sperimentale (una per anno) di Veneto Agricoltura. Ciascun ceppo è stato saggiato in 33lt di mosto di Tocai friulano, vinificato seguendo il protocollo classico utilizzato per la produzione del vino Lison. Sono stati valutati i 7 migliori ceppi (1 isolato da grappolo e 6 da tralcio) e come controllo è stato aggiunto un ceppo commerciale ampiamente utilizzato per la produzione di questo vino. I prodotti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi sensoriale utilizzando un panel di giudici che comprendeva produttori e tecnici, selezionati dal Consorzio Lison-Pramaggiore. E' stato valutato il profilo sensoriale di ciascun vino attraverso il quale è stato possibile scegliere il ceppo che più esaltava le caratteristiche di tipicità di questo vino regionale. Nell'ultima vendemmia (settembre 2012) questo ceppo è stato utilizzato da due produttori aderenti al Consorzio in fermentazioni di cantina (25 ettolitri). La prova è ancora in corso ma i risultati, sulla base dei contatti avuti con le cantine, sono decisamente promettenti.

Analisi delle correlazioni filogenetiche attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari

Recenti pubblicazioni hanno evidenziato l'elevata biodiversità di lieviti presenti in vigneto e come lo studio di questa possa aiutare nella selezione di lieviti con diversi fenotipi. Una serie di marcatori molecolari è stata studiata per analizzare la biodiversità associata a popolazioni naturali di *S. cerevisie*. Tali marcatori sono stati impiegati per studiare le correlazioni filogenetiche intercorrenti tra ceppi di lievito selezionati in questo progetto nelle diverse annate. Sono stati sottoposti all'analisi 204 ceppi provenienti non solo dalla DOC Lison Pramaggiore, ma anche quelli ottenuti nei due precedenti progetti di selezione che hanno coinvolto la DOCG Conegliano Valdobbiadene Prosecco Superiore e la DOC Piave. Inoltre sono stati analizzati 35 ceppi di lievito comprendenti ceppi commerciali, ceppi di laboratorio e ceppi isolati in ambienti diversi rispetto a quello enologico. Dopo aver estratto il DNA di tutti i ceppi mediante l'utilizzo di specifici kit, l'analisi dei micro satelliti è stata condotta amplificando 18 diversi loci per ciascun campione mediante *multiplex* PCR. La separazione dei corti frammenti amplificati è avvenuta sul sequenziatore AB3130xl. L'analisi ha rivelato la correlazione dei lieviti selezionati da uve Tocai friulano con un ceppo americano selezionato da quercia (quindi di tipo selvatico). Tale gruppo risulta essere il più particolare dal punto di vista molecolare. L'analisi di popolazioni ha evidenziato, infatti come la popolazione di lieviti del Tocai sia totalmente non correlata con gli

altri selezionati nelle altre aree e come tale popolazione possa essersi sviluppata in tempi relativamente recenti rispetto alle altre (fig.2).

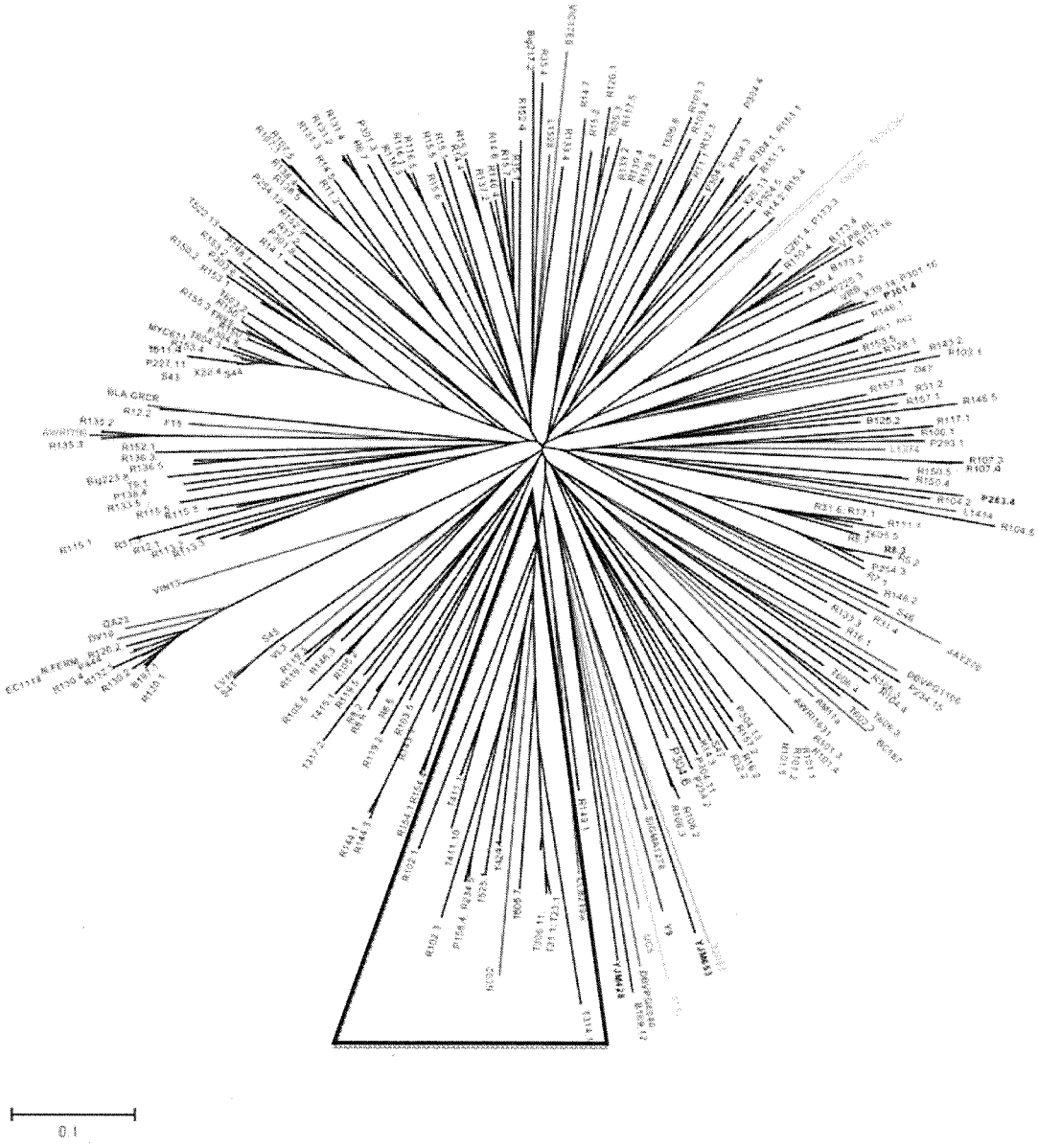

Fig. 2. Analisi filogenetica dei lieviti isolati nelle tre zone vitivinicole venete (DOCG Conegliano Valdobbiadene Prosecco Superiore, DOC Piave , DOC Lison-Pramaggiore). Nel triangolo i lieviti isolati da grappolo dai vigneti di Tocai friulano.

Prof. Viviana Corich, Prof. Alessio Giacomini
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturale Ambiente - DAFNAE
Centro Interdipartimentale per la Ricerca in Viticoltura ed Enologia – CIRVE
Università di Padova