

Progetto misura 124

PSR 2007-2013 della Regione Toscana

TITOLO DEL PIF: FILIERA AGRICOLA TOSCANA (PIF 20)

ACRONIMO DEL PROGETTO MISURA 124: ACETOSCANA

TITOLO DEL PROGETTO MISURA 124: Sviluppo di aceti speciali da mosti d'uva toscani

RELAZIONE TECNICA FINALE

Sommario

Introduzione al progetto	2
Fase 1. Aggregazione dei soggetti coinvolti nel progetto.....	7
Fase 2. Definizione dei locali e dei fabbisogni in termini di attrezzature, beni di consumo, beni immateriali e manodopera necessari alla realizzazione del progetto	7
Fase 3. Produzione di 4 tipologie di aceto "balsamico", in piccoli lotti da 60 litri	9
Fase 4. Valutazione sensoriale degli aceti prodotti.....	11
Fase 5. Produzione degli ingredienti Mosto Fresco (MF) e Vino Base (VB).....	22
Fase 6. Produzione degli ingredienti Mosto Concentrato (MConc) e Mosto Cotto (MCotto)	34
Fase 7. Miscelazione ingredienti e ottenimento substrati per la fermentazione alcolica S1, S2, S3, S4.....	40
Fase 8. Fermentazione alcolica substrati e ottenimento dei vini intermedi V1, V2, V3, V4.....	40
Fase 9. Fermentazione acetica vini e ottenimento prodotti	43
Fase 10. Invecchiamento prodotti.....	57
Fase 11. Divulgazione dei risultati.....	57

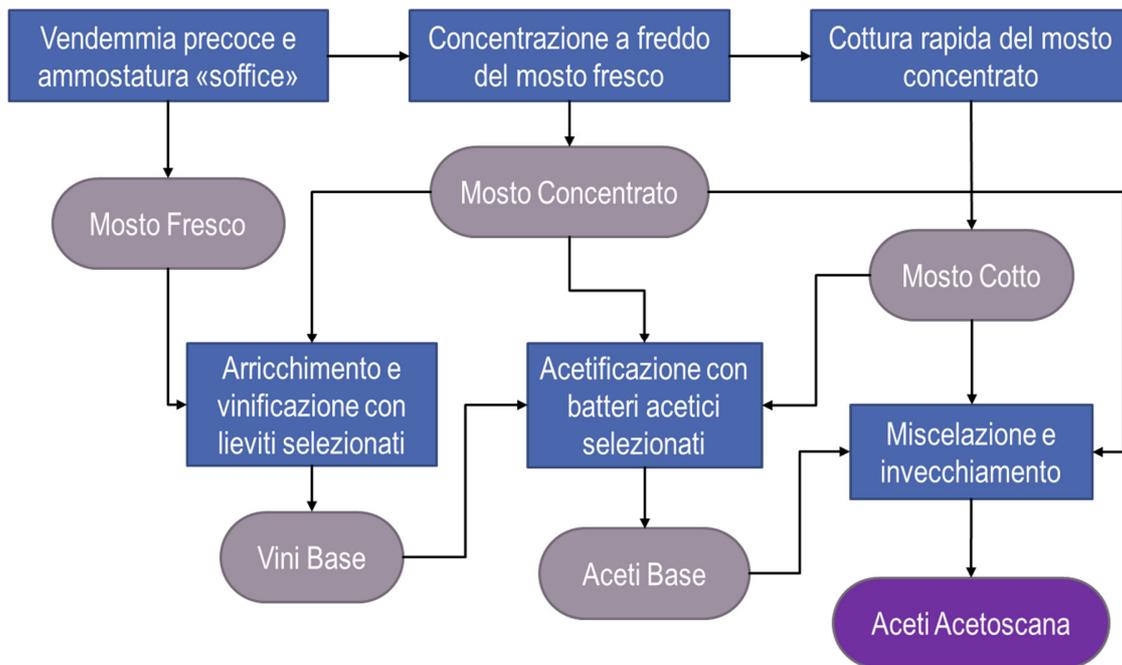
Introduzione al progetto

La produzione di aceto di vino è un processo che utilizza materie prime dal valore relativamente basso per ottenere un prodotto che raggiunge prezzi relativamente alti. Infatti, i mosti d'uva destinati all'acetificazione sono normalmente quelli che hanno uno scarso appeal enologico: non sono cioè adatti alla vinificazione per cui vengono concentrati per sfruttare il loro contenuto zuccherino in diverse produzioni alimentari oppure subiscono una doppia fermentazione (alcolica ed acetica) per la produzione di aceti di vino. La categoria merceologica che maggiormente beneficia dell'uso di questi prodotti "poveri" è quella relativa ai condimenti alimentari agrodolci a base di mosto concentrato e/o cotto ed aceto di vino, cioè tutti i prodotti che hanno un esplicito riferimento al termine "balsamico". Dal punto di vista normativo possono essere aceti in senso stretto, aceti speciali o condimenti, in funzione di alcune proprietà chimico fisiche (principalmente acidità ed alcol residuo) e dell'eventuale presenza di specifici disciplinari di produzione. Indubbiamente la diffusione di prodotti balsamici sul mercato è in forte crescita, anche grazie allo sviluppo di nuove forme di presentazione e di utilizzo del prodotto base (come glasse, creme, spume, spray) ed una continua ricerca dell'aromatizzazione distintiva e particolare (attraverso l'utilizzo di aromi o seguendo processi di produzione peculiari). I grandi produttori di "balsamici" puntano molto sulla differenziazione delle loro linee di produzione per competere sul mercato, ne è la prova l'esplosione di nuovi prodotti sugli scaffali dei supermercati non solo in Italia, ma anche nel resto dell'Europa ed oltre. Nelle province di Modena e Reggio Emilia è concentrata l'intera produzione di aceti "balsamici" a denominazione protetta italiani: due D.O.P. per l'Aceto Balsamico Tradizionale (ABT) di Modena e quello di Reggio Emilia e una I.G.P. per l'Aceto Balsamico di Modena (ABM), oltre ad una moltitudine di piccoli e medi produttori di condimenti alimentari agrodolci che riprendono in parte le modalità produttive delle denominazioni protette.

Per inquadrare correttamente l'ambito del progetto presentato è fondamentale descrivere, confrontare e differenziare i balsamici D.O.P. da quello I.G.P. I primi seguono processi produttivi realmente tradizionali, necessitano di lunghi tempi e molta manodopera; il secondo è un prodotto prettamente industriale, di semplice preparazione e generalmente di basso costo. In sintesi, l'ABT si ottiene dalle fermentazioni (alcolica ed acetica), effettuate con metodi tradizionali, in sequenza e direttamente sul mosto d'uva concentrato per cottura a pressione atmosferica. L'aceto base ottenuto viene invecchiato in gruppi di piccoli barili seguendo una procedura di rinalzo discontinuo annuale simile al metodo "solera" che permette di concentrare lentamente l'aceto (in almeno 12 anni) fino a raggiungere un peso specifico normalmente superiore a 1,3 e proprietà sensoriali eccellenti. L'ABM è invece una miscela di mosto concentrato sottovuoto e leggermente cotto, aceto di vino industriale e caramello. Il colore ed il peso specifico desiderato (variabile da 1,1 a 1,3 ed oltre) si ottiene quindi modulando opportunamente le proporzioni fra gli ingredienti. Solo per i prodotti più costosi la miscela ottenuta viene invecchiata staticamente per alcuni anni in barili di medie dimensioni, di solito barriques.

Le differenze sostanziali fra le due tipologie sono quindi molteplici: i) l'ABT non è aceto di vino ma di mosto cotto mentre nell'ABM l'acidità deriva dal comune aceto di vino ottenuto per fermentazione in sommerso; ii) il processo di concentrazione dell'ABT avviene in parte durante la cottura e successivamente durante l'invecchiamento per lenta evaporazione di parte della frazione acquosa mentre l'ABM è prodotto direttamente alla densità desiderata; iii) l'ABT non ammette l'aggiunta di altri ingredienti oltre al mosto d'uva mentre nell'ABM è presente fino al 2% di colorante E150d e solfiti derivanti dall'utilizzo di mosti muti; iv) la cottura prolungata del mosto per ABT degrada fortemente gli zuccheri presenti con formazione di composti nocivi della famiglia dei furani, nell'ABM la cottura è più rapida e serve essenzialmente per innescare le reazioni di imbrunimento non enzimatico.

Il seguente schema illustra le fasi di lavorazione del progetto, evidenziando le materie prime e gli step produttivi.



Schema produttivo del progetto Acetoscana

La linea di prodotti sviluppati nel progetto ha l'obiettivo di coniugare gli aspetti migliori dal punto di vista qualitativo ed economico delle due tecniche espone: i) le fermentazioni dirette ed in condizioni statiche consentono un risparmio energetico notevole e favoriscono la formazione di composti secondari sensorialmente positivi, anche grazie all'impiego di lieviti e batteri acetici specifici e selezionati appositamente per le loro caratteristiche fermentative che, è bene ricordare, sono molto diverse da quelle richieste in enologia e nelle acetificazioni industriali, ii) il processo di concentrazione del mosto tramite cottura è fortemente limitato mentre l'invecchiamento sarà accelerato tramite l'utilizzo di tecniche di

condizionamento ambientale; iii) non sono presenti additivi e conservanti di nessun genere in quanto vengono impiegate tecniche di conservazione basate sull'impiego oculato degli stessi microrganismi usati nelle fermentazioni; iv) le condizioni di cottura applicate limitano al minimo la formazioni di composti furanici.

Il progetto implementa un modello prototipale che consente di sviluppare la produzione di aceto toscano di alta qualità facendo leva sulle elevate caratteristiche qualitative dei vini toscani, sulle loro peculiarità intrinseche ed estrinseche, con l'obiettivo di ampliare la gamma dei prodotti riconducibili ai *Tuscan Wines*, da offrire nel mercato. Con il progetto si intende "recuperare" un gap per creare un ulteriore elemento di innovazione e sviluppo dell'offerta enologica toscana legata alla cultura alimentare regionale ed in grado di creare utili sinergie anche con gli altri prodotti dell'agroalimentare made in *Tuscany*.

Rispetto al PIF Filiera Agricola Toscana il progetto Acetoscana vuole sviluppare questo nuovo prodotto, che oggi manca nel paniere regionale dei prodotti di qualità, aumentare la gamma di offerta di prodotti di eccellenza fatti in toscana anche nella logica e nell'obiettivo di contribuire al completamento dei prodotti toscani usati nella cucina a e nella preparazione dei piatti tipici. Nel progetto di filiera, il progetto Acetoscana contribuisce ad ampliare l'offerta dei prodotti del territorio regionale, a caratterizzare e qualificare il *tuscany food* in tutte le sue componenti, tipizzando ulteriormente ed allargando l'offerta dei prodotti sul sistema delle vendite dirette, la piattaforma logistica di distribuzione per le forniture dei prodotti agli agriturismi, ai ristoranti ed ai sistemi alberghieri. In questo contesto possono essere sviluppate utili sinergie tra i partecipanti al PIF Filiera Agricola Toscana rispetto ad un prodotto, l'aceto, che entra in molte preparazioni dell'agroalimentare e della cucina toscana.

I caratteri innovativi del progetto si riferiscono sia alla tipologia dei prodotti sia alle metodologie adottate. L'azione "Acetoscana", infatti, si riferisce alla produzione di una gamma di aceti speciali ottenuti impiegando materie prime dalle proprietà originali per il settore, nonché coadiuvanti tecnologici esclusivi e metodologie di produzione innovative in quanto mai impiegate in ambito industriale ma corroborate da secolari metodiche tradizionali. Tali metodiche sono state codificate ed ottimizzate in modo puntuale e preciso dal gruppo di ricerca di Microbiologia degli alimenti fermentati del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Modena e Reggio Emilia. L'intero processo viene monitorato e valutato attraverso analisi di laboratorio (come si conviene a qualsiasi processo di prototipazione in ambito alimentare), sia per intraprendere nei giusti tempi le azioni ordinarie e straordinarie sul procedimento stesso sia per costituire una solida base per le attività divulgative.

Le caratteristiche dominanti dei mosti per gli aceti di Acetoscana sono sostanzialmente diverse da quelle richieste per la vinificazione: è infatti conferita particolare importanza alla componente acidica e agli aromi fruttati piuttosto che al tenore zuccherino. L'ottima qualità delle uve è comunque un'esigenza irrinunciabile. Ciò significa che, a differenza di quanto normalmente accade negli acetifici industriali (che fungono da

riciclatori di mosti e vini con evidenti difetti e/o deficienze sensoriali), al progetto Acetoscana sono conferite esclusivamente materie prime provenienti da uve sane, esenti da difetti microbiologici, raccolte e trattate secondo le indicazioni stabilite nel progetto stesso. Si tratta quindi di una sorta di ridefinizione dei caratteri di qualità dei mosti, distinti da quelli classici della vinificazione e mirati alla produzione di aceti di alto livello, che contribuiscono anche alla riqualificazione di varietà di vitigni di minore importanza ma diffuse sul territorio regionale, senza peraltro entrare in competizione con i mosti destinati alla vinificazione.

Entrando nel dettaglio, l'intento è quello di sviluppare prodotti fortemente specifici dal punto di vista sensoriale e qualitativo in modo da essere riconducibili al territorio da cui hanno origine e dove vengono prodotti. Rispetto a questo è possibile individuare fattori innovativi nelle materie prime utilizzate e nelle caratteristiche del prodotto finito rispetto a tutti gli altri prodotti presenti sul mercato. Generalmente i prodotti balsamici reperibili in commercio sono costituiti da miscele di mosto concentrato e cotto, zuccheri e aceto di vino; quelli del progetto "Acetoscana" prevedono l'utilizzo anche di mosto fresco e vino, ed escludono l'aggiunta di aceto di vino.

Il mosto fresco, infatti, conferisce aromi di freschezza e asprezza moderata (di "verde", come si dice comunemente) che, uniti all'acidità pungente dell'acido acetico, dà luogo ad un prodotto decisamente particolare. Il vino ha una funzione diversa: l'etanolo e gli altri alcoli superiori in sé presenti verranno messi in condizione di reagire con gli acidi organici del mosto fresco per formare esteri più o meno volatili, responsabili del profilo olfattivo e in parte gustativo del prodotto.

Un aspetto caratterizzante che differenzia i prodotti "Acetoscana" da quelli esistenti è l'elevata acidità fissa, cioè l'acidità dovuta agli acidi organici non volatili (quindi acido tartarico, malico, succinico, citrico, gluconico ed altri). Alcuni di tali acidi sono presenti nelle uve e decrescono in concentrazione all'aumentare del grado di maturazione delle uve stesse (mentre invece aumenta il grado zuccherino); altri sono prodotti dall'attività di lieviti e batteri acetici, e la loro quantità può essere modulata ponendo i microrganismi fermentanti in determinate condizioni. Ognuno di questi acidi ha un effetto sensoriale molto diverso da quello pungente dell'acido acetico per cui, modulandone le proporzioni relative, si possono ottenere aceti dal gusto agrodolce molto peculiari. In campo enologico i vitigni migliori sono quelli che coniugano alti valori di zuccheri ad elevata acidità fissa. Generalmente, invece, gli aceti balsamici in commercio hanno acidità fissa molto bassa in quanto i mosti utilizzati derivano da mosti di scarsa qualità ottenuti da uve surmature (per sfruttare il massimo contenuto di zuccheri). I prodotti del presente progetto utilizzeranno invece uve ad alta acidità fissa, dando meno rilievo al loro tenore zuccherino. Il vantaggio economico che ne deriva, oltre alla possibilità di avere un nuovo prodotto da poter offrire sul mercato, è dato anche dalla possibilità di anticipare le operazioni di raccolta delle "uve da aceto" rispetto a quelle da vino incidendo positivamente anche sull'organizzazione e più in generale sulla gestione dell'azienda.

Dal punto di vista produttivo le innovazioni riguardano l'impiego di microrganismi (lieviti e batteri acetici dalla collezione Unimore Microbial Culture Collection – UMCC <http://www.umcc.unimore.it/>) appositamente selezionati per le loro caratteristiche fermentative, nonché i metodi di fermentazione e conservazione. In primo luogo, il processo produttivo comprende metodi che escludono completamente l'utilizzo di solforosa per la stabilizzazione e conservazione dei prodotti; ciò costituisce un carattere innovativo molto forte, anche riferito alla salubrità dei prodotti ottenuti.

Per i lieviti utilizzati in enologia viene richiesta una serie di caratteristiche specifiche, in particolare la resistenza all'anidride solforosa e ad alte concentrazioni di etanolo, bassa produzione di glicerolo ed acido acetico, capacità di consumare completamente gli zuccheri presenti nel mezzo, nessuna produzione di composti indesiderati, ampio range di temperatura di crescita, e altri caratteri di competitività quali la velocità di fermentazione e la pronta fermentazione. Nel progetto Acetoscana, la fermentazione alcolica, necessaria per l'ottenimento dell'ingrediente Vino Base e dei substrati per la successiva acetificazione, sarà condotta con ceppi di lieviti che posseggono caratteri completamente differenti: nessuna particolare resistenza all'SO₂, alta produzione di glicerolo, acido acetico ed acido succinico, alterazione del rapporto glucosio/fruttosio nel mezzo, resistenza ad alte concentrazioni di zuccheri per i mosti concentrati (osmofilia), tenore alcolico moderato, produzione di composti secondari favorevoli.

Le fermentazioni acetiche saranno eseguite con metodo statico superficiale che, oltre ad essere scarsamente diffuso (se non per produzioni "casalinghe"), consente un notevole risparmio energetico rispetto al metodo "sommerso" e su trucioli. Il metodo di innesco della fermentazione e l'aumento del volume del mezzo fermentante (scaling-up) richiama il metodo d'Orleans ma è stato completamente rivisto, modernizzato ed ottimizzato in base agli studi del gruppo di ricerca di Microbiologia degli alimenti fermentati del dipartimento di Scienze della Vita di Unimore. Verrà quindi realizzato un fermentatore ad hoc di media scala, munito dei dispositivi necessari all'esecuzione del protocollo di fermentazione e dei relativi controlli di processo (sistemi di sanitizzazione, aerazione passiva, ispezione, caricamento del substrato dal basso, campionamento a diverse altezze. Gli inoculi di batteri acetici che verranno impiegati derivano anch'essi dalla collezione UMCC e sono selezionati per le loro proprietà specifiche, idonee a tale tipo di fermentazione, quali l'osmofilia, la minima produzione di cellulosa, la capacità di ossidare il glucosio ad acido gluconico in assenza di etanolo, la limitata capacità di ossidare completamente l'etanolo a CO₂ ed acqua. Il sistema di fermentazione, unito ai ceppi di batteri acetici selezionati, è quindi da considerarsi come un processo prettamente originale e mai sviluppato in scala pre-competitiva.

Fase 1. Aggregazione dei soggetti coinvolti nel progetto

Il partenariato del progetto comprende l'azienda Agricola "I Natali sas di Lisi Eleonora", che funge da capofila, e "Università di Modena e Reggio Emilia", dipartimento di Scienze della Vita, gruppo di ricerca di Microbiologia degli Alimenti Fermentati. La forma di aggregazione è un'Associazione Temporanea di Scopo (ATS).

Fase 2. Definizione dei locali e dei fabbisogni in termini di attrezzature, beni di consumo, beni immateriali e manodopera necessari alla realizzazione del progetto

Lo spazio adibito alla sperimentazione è suddiviso in tre locali. Nel primo sono disposte le apparecchiature per la pigiatura delle uve, le fermentazioni alcoliche ed acetiche, lo stoccaggio dei vini e dei mosti. Nel secondo sono presenti i contenitori per lo stoccaggio degli aceti e il loro affinamento (barriques e caratelli), nonché un piccolo laboratorio per il monitoraggio delle fermentazioni e le analisi chimico-fisiche sui substrati e sui prodotti. Nel terzo sono presenti i frigo per la crioconcentrazione ed i contenitori di stoccaggio degli "aceti pilota".

Nel primo locale sono stati approntati: n. 4 vinificatori in acciaio AISI 304 da 5 hL; n. 1 vinificatore in acciaio AISI 304 da 10 hL; n. 8 reattori della fermentazione acetica in acciaio AISI 316 da 2 hL, di cui 4 muniti di termoregolazione, appositamente studiati per il processo di fermentazione acetica in condizioni statiche; pompa peristaltica; sistema di sanitizzazione; housing di filtrazione. Gli acetificatori da 2 hL costituiscono il cuore del sistema di produzione dell'aceto, pertanto sono stati dimensionati e progettati con specifiche caratteristiche (fig. 1). In particolare, sono state sovradimensionate la valvola di scarico totale e la valvola di carico dal basso, sono stati aggiunti tre dispositivi per il campionamento a diverse altezze, è stata inserita una camicia di termoregolazione per il mantenimento delle colture in fermentazione alla temperatura ottimale, è stato inserito un sistema di aerazione passiva costituito da un ingresso orizzontale e un "camino" disposto sul coperchio del fermentatore, entrambi muniti di griglie e valvole manuali di controllo del flusso dell'aria.

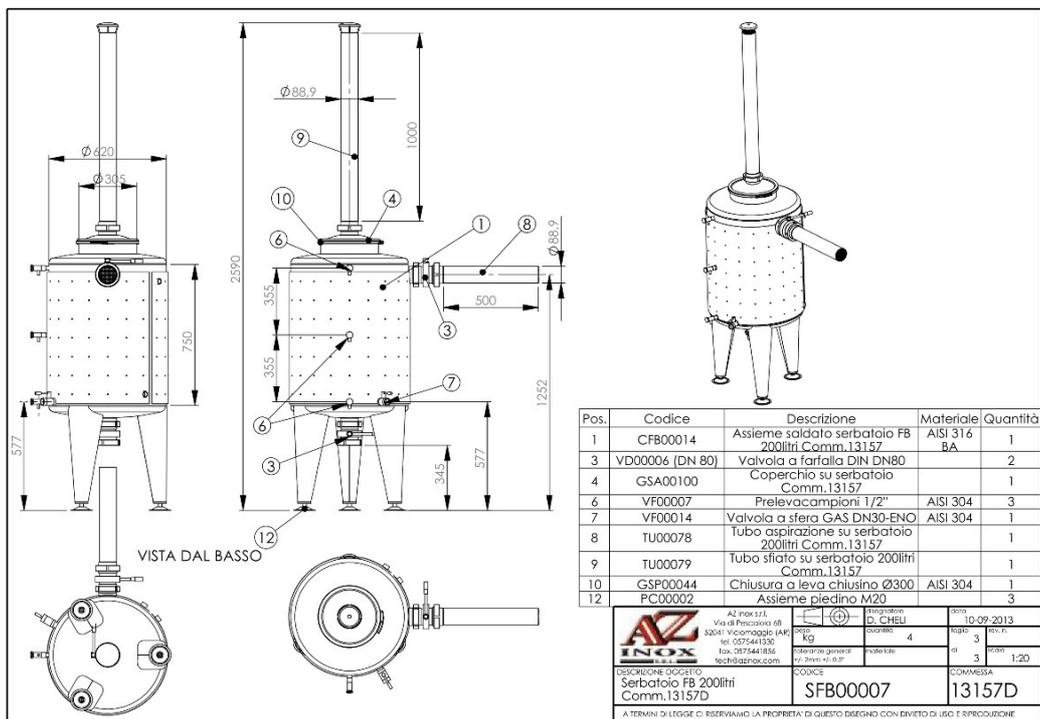


Figura 1 – Progetto dei vessel per la fermentazione acetica, muniti di valvole sovradimensionate, campionatori, sistema di aerazione a camino, camicia di termoregolazione.

Questo sistema protegge la coltura in fermentazione dall'ingresso di insetti ma al contempo fornisce l'apporto d'aria necessario allo sviluppo superficiale dei batteri acetici senza la necessità di condotti di aria forzata attivi. Il flusso d'aria, quando il fermentatore è mantenuto alla temperatura di lavoro di 26-28°C, si è rivelato molto efficace, tanto che, nel corso della sperimentazione, si è osservato una forte riduzione della resa di acetificazione quando le due valvole in ingresso e in uscita del sistema di aerazione venivano lasciate completamente aperte, segno di un eccessivo fenomeno di strappaggio delle sostanze volatili ad opera del flusso d'aria.

Il locale di stoccaggio e affinamento degli aceti contiene 9 barriques di rovere usate per il vino e ricondizionate, nonché 22 caratelli da 50 L.

Nel piccolo laboratorio predisposto è possibile determinare il grado alcolico, l'acidità titolabile, fissa e volatile, il contenuto di zuccheri riducenti, il pH.

Per quanto riguarda la produzione di mosto concentrato, il sistema in uso è un concentratore sottovuoto che opera a ca. 22°C, capace di evaporare 100 L/h di acqua dal mosto e produrre mosto concentrato a circa 62°Bx.

L'imbrunimento del mosto concentrato per ottenere il mosto cotto avviene in un termopastorizzatore da ca. 100 L, capace di raggiungere la temperatura di 120°C.

Fase 3. Produzione di 4 tipologie di aceto “balsamico”, in piccoli lotti da 60 litri

La scelta di preparare delle miscele nasce da questioni di tempo. Non sarebbe stato possibile, e neanche razionale, partire con la produzione in aceti in cantina senza avere indicazioni in merito alla composizione più adeguata. Le miscele inoltre hanno consentito di preparare molti più “stili” di aceto senza dover attendere la messa a punto e la fermentazione diretta dei substrati. D'altronde però, gli aceti prodotti nella cantina sperimentale del progetto sono sensibilmente diversi dalla semplice miscelazione di ingredienti. In particolare:

- Il mosto fresco (se verrà impiegato), non viene sottoposto a solfitazione, a differenza di quello che è stato utilizzato, che era stato mutizzato e quindi desolfato.
- Il mosto concentrato non deriva da un processo di cottura ma di evaporazione a freddo, che preserva le sostanze originarie senza indurre degradazioni degli zuccheri e formazione di composti nocivi.
- Il mosto cotto deriva da trattamenti termici in condizioni controllate, in modo da diminuire il tempo di cottura ma favorire il processo di imbrunimento non enzimatico necessario.
- L'aceto secco di vino non è un ingrediente utilizzato come “taglio”. La fermentazione acetica avviene nel substrato alcolico finale. L'aceto secco serve, eventualmente, per piccole correzioni sull'acidità del prodotto finale, per uniformare i vari batches dello stesso prodotto.

Le materie prime necessarie alla preparazione delle miscele iniziali sono state acquisite presso un fornitore di Reggio Emilia. Tutte le materie prime (mosto fresco, mosto concentrato, mosto cotto, aceto forte) sono state analizzate per determinare i principali parametri chimico fisici (acidità titolabile, fissa e volatile, zuccheri, pH, Brix, densità relativa) necessari a determinare le percentuali di miscelazione (tabella 1).

Ingrediente	Sigla	Acidità Titolabile	Acidità Fissa	Acidità Volatile	Zuccheri	pH	Brix	Densità
		g AcAc/100mL	g AcAc/100mL	g AcAc/100mL	g/100mL		°Bx	
Mosto fresco	MF	0.312	0.312	0	17.5	3.71	17.8	1.07
Mosto concentrato	MConc	1.18	1.18	0	72.4	3.38	63.5	1.31
Mosto cotto acetificato	MCotto	4.92	0.84	4.08	21.8	3.07	26.9	1.11
Aceto forte di vino	AF	11.55	0	11.55	0	3.03	6.9	1.03
Vino	V	0.534	0.534	0	0.2	3.33	6.3	1.02
Aceto forte crioconcent.	AFC	14.7 – 15.4	0	14.7 – 15.4	0	-	7.5	1.03
Mosto fresco crioconcent.	MFC	0.5	0.5	0	31.3	-	28	1.12

Tabella 1 – Proprietà delle materie prime utilizzate per la produzione delle miscele di aceto iniziali.

Per alcune miscele specifiche il mosto fresco e l'aceto forte sono stati crioconcentrati per raggiungere i livelli di acidità e zuccheri necessari. La procedura di crioconcentrazione prevede il congelamento in taniche da 25 L che vengono successivamente fatte sgocciolare a temperatura ambiente per circa metà del volume, raccogliendo la parte concentrata per effetto della separazione dei cristalli di ghiaccio dai soluti presenti nella soluzione liquida.

Di 13 miscele preparate in scala di laboratorio ne sono stati selezionati 7 che sono quindi stati riprodotti in cantina in fusti d'acciaio da circa 60 litri. L'acidità fissa dei prodotti è stata corretta con l'aggiunta di acido malico alimentare, in quanto gli ingredienti in commercio difettano sempre di acidità fissa. I mosti di partenza del progetto sono invece sotto il diretto controllo della cantina, che ha provveduto alla raccolta in un'epoca di maturazione molto precoce che preservi la naturale acidità del mosto d'uva. La tabella 2 elenca i parametri principali delle miscele.

Prodotto	Ingredienti	Acidità Titolabile	Acidità Fissa	Zuccheri	Alcol
		g AcAc/100mL	g AcAc/100mL	g/100mL	%vol
A4	MCotto - AFC	8	1.6	20	0
A5	MConc - MCotto - AFC	8.3	1.6	30	0
A7	MFC - Mcotto - V - AFC	6.8	1.5	13	1.8
B1	MF - AFC	6	1	20	0
B2	VConc - AFC	6	2.5	60	0
B3	MConc - MCotto - AFC	7.3	2.5	45	0
B4	MConc - Mcotto - V - AFC	7.4	2	27	1.8

Tabella 2 - Proprietà degli aceti ottenuti nelle 7 miscele iniziali sottoposte a giudizio sensoriale nella fase 4.

Fase 4. Valutazione sensoriale degli aceti prodotti

F4.1 Preparazione della scheda di valutazione per l'analisi sensoriale degli aceti prodotti di cui alla fase 3

Per la valutazione tramite analisi sensoriale degli aceti miscela, di cui alla tabella 2, è stata sviluppata una scheda di degustazione (figure 2, 3) specifica per gli aceti "balsamici" che è quindi stata fornita al gruppo di assaggio appositamente costituito ed addestrato alla valutazione dell'aceto, approntato dal partner A17 in collaborazione con Coldiretti/Impresa Verde Arezzo e la Camera di Commercio di Arezzo che ha messo a disposizione la propria sala ufficiale di assaggio vini. Il panel costituito si compone di 7 assaggiatori e da un Capo Panel, tutti con lunga e provata esperienza nel settore degli alimenti e dei vini. Il panel di progetto, primo ad essere costituito in Toscana sull'aceto, ha dato luogo ad un interesse specifico da parte della CCIAA di Arezzo che sta proponendo una sua ufficializzazione per farne un riferimento istituzionale a livello regionale.

Progetto ACETOSCANA
 PSR 2007-13 PIF 20 Misura 124
 Università di Modena e Reggio Emilia
 I Natali SAS

Assaggiatore	Campione
Data e ora	

OLFATTIVI	+		PUNTI
Pungenza	scarsa	ottimale	
Persistenza	scarsa	lunga	+
Aromi complessivi	scarsi	ottimi	
GUSTO-OLFATTIVI			
Dolcezza	scarsa	ottimale	
Acidità (intensità)	scarsa	ottimale	
Acidità (persistenza)	scarsa	lunga	
Astringenza	assente	gradevole	
Amarezza	assente	gradevole	
VISIVI			
Viscosità	scarsa	ottimale	
Colore	ambrato	scuro	
NOTE	+	+	SUBTOTALE
Copyright Prof. P. Giudici - Dott. F. Lemmetti - Università di Modena e Reggio Emilia			TOTALE

Figura 2 – La scheda di degustazione sviluppata per gli aceti “Acetoscana”

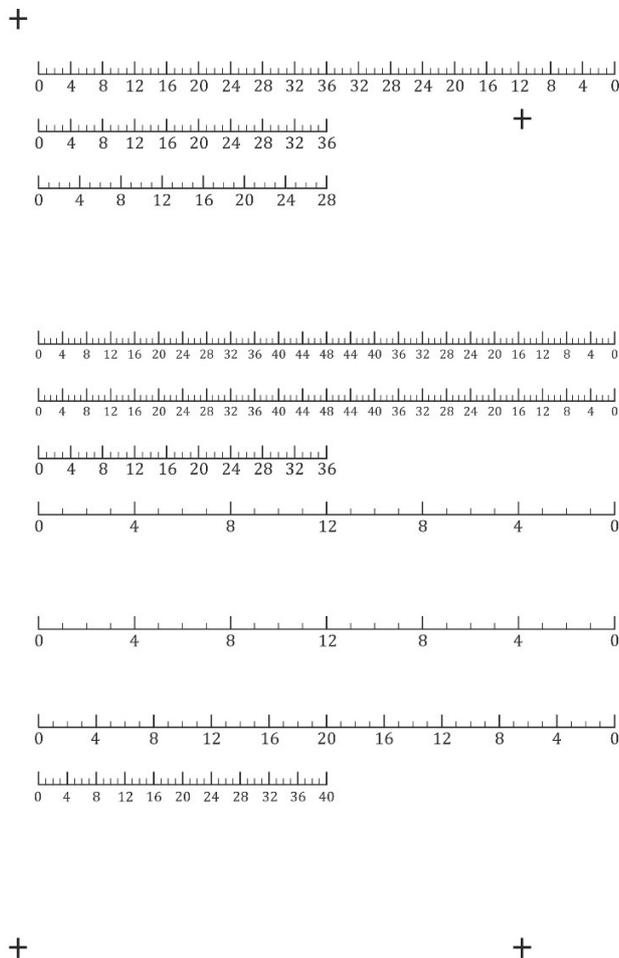


Figura 3 – La maschera di lettura per l’attribuzione del punteggio alla scheda di degustazione sviluppata per gli aceti “Acetoscana”

L’analisi sensoriale dell’aceto

Come per qualunque analisi sensoriale, l’obiettivo più importante da perseguire con la definizione di una nuova procedura è quello di riuscire a valutare aceti anche molto diversi tra di loro, ma senza condizionarne un successivo adeguamento verso un modello unico. Per raggiungere l’obiettivo prefissato sono necessarie almeno due condizioni: che gli assaggiatori conoscano il prodotto nelle sue manifestazioni più diverse e che possano esprimere il loro giudizio in modo libero. La prima condizione è intuitiva e facile da soddisfare: il panel di assaggiatori deve essere addestrato a riconoscere le caratteristiche sensoriali dell’aceto, siano esse visive, olfattive, gustative o trigeminali. L’indipendenza di giudizio presenta invece ostacoli molto subdoli

perché nascosti o difficili da identificare. In primo luogo, l'aspetto visivo condiziona significativamente i risultati delle successive fasi dell'analisi sensoriale, e anche le sensazioni gustative e olfattive si influenzano pesantemente a vicenda, conducendo a risultati in cui i descrittori sono fortemente correlati. E' come se gli assaggiatori, una volta individuato un aceto di loro gradimento dal punto di vista gustativo, visivo od olfattivo, lo premiassero per tutti gli altri attributi sensoriali a prescindere dal giudizio dei singoli descrittori.

Un recente studio, che si è avvalso di circa 60 assaggiatori qualificati, ha portato all'identificazione di diversi descrittori sensoriali dell'aceto balsamico, riferibili all'aspetto, all'aroma, al sapore e alle sensazioni trigeminali. I caratteri più numerosi sono relativi all'aroma (caramello, mosto cotto, prugna secca, miele, mela, liquerizia, vaniglia, mostarda, carruba, spezie, caffè, cioccolata) e sono stati frequentemente riconosciuti da tutto il panel e in molti dei campioni esaminati. Gli altri descrittori comuni sono i quattro consolidati del sapore (acido, dolce, amaro, salato), la percezione tattile della viscosità e le tre sensazioni trigeminali della pungenza, piccantezza e astringenza. D'altronde però, il tempo richiesto per la ricerca di descrittori specifici è troppo esteso e richiede assaggi ripetuti dello stesso campione, rendendo la valutazione sensoriale limitata a uno o due soli campioni a seduta. Sono stati quindi utilizzati solo quei descrittori identificabili, comuni e misurabili. La selezione finale dei caratteri è riportata nel paragrafo relativo alla descrizione della scheda.

Le caratteristiche di una buona scheda

La definizione di una buona scheda per l'analisi sensoriale non può prescindere dall'uso di termini chiari, non equivoci e usati con la stessa accezione da tutti gli assaggiatori; mentre resta nel pieno arbitrio dell'assaggiatore definire se il livello di ogni descrittore sia insufficiente, ottimale o troppo elevato per il campione che sta valutando. La piena libertà di preferenza può essere limitata solo per la valutazione di campioni commerciali, per i quali sia necessario perseguire uno standard. In questi casi l'intensità di un descrittore deve essere paragonato a campioni di riferimento precisi. Un'altra caratteristica importante della scheda è la sua facile compilazione, in modo da non distogliere l'assaggiatore dalle proprie percezioni sensoriali. Infine, la struttura della scheda non deve condizionare l'espressione del giudizio sensoriale, per cui si è optato per l'adozione di una scheda priva di riferimenti numerici, in modo da favorire l'uso di tutta l'ampiezza di scala della variabile sensoriale. Tenendo in considerazione quanto finora esposto è stata formulata la nuova scheda di degustazione, suddivisa in tre sezioni relative a tre distinti esami (olfattivo, gusto-olfattivo e visivo), per ognuno dei quali sono definiti i rispettivi descrittori. L'ampiezza di ogni descrittore è espressa con una scala, rappresentata da una linea orizzontale, su cui l'assaggiatore appone un segno in relazione al proprio gradimento. Immaginando una linea verticale che divide all'incirca a metà la pagina della scheda, i punti di intersezione con le linee orizzontali dei descrittori identificano il giudizio

qualitativo massimo. L'estremo sinistro di ogni linea orizzontale corrisponde invece al giudizio minimo. Inoltre, per alcuni descrittori sono stati inseriti due limiti inferiori di giudizio in una scala di tipo bipolare, corrispondenti al "poco" e al "troppo", posti a sinistra e a destra del punto centrale. Infine, sulla scheda non sono presenti numeri che potrebbero condizionare l'assaggiatore: il corrispondente valore numerico del giudizio si ottiene utilizzando una maschera semitrasparente, che presenta delle scale graduate differenziate per ogni descrittore, da sovrapporre alla scheda compilata (fig. 3). Il punteggio massimo raggiungibile è stato liberamente fissato a 400.

La procedura di assaggio

Durante la procedura di assaggio va favorita al massimo l'indipendenza di giudizio, cioè ogni assaggiatore deve sentirsi completamente libero di esprimere le proprie preferenze sensoriali senza la pressione di essere giudicato a sua volta per il compito svolto. Un assaggiatore condizionato dal timore di sbagliare tende a non esprimere giudizi estremi, molto positivi e/o molto negativi, ma a mantenersi sempre verso valori centrali, rendendo, di fatto, del tutto inutile l'espressione del proprio responso. Per questa ragione è buona cosa che i singoli giudizi della procedura di assaggio restino anonimi al resto del panel. L'assaggiatore deve essere istruito su come procedere con l'analisi sensoriale, in particolare deve farsi carico di esprimersi sulle singole variabili in modo del tutto indipendente l'una dall'altra. A questo proposito è molto utile effettuare l'analisi olfattiva in un contenitore completamente oscurato e compilare la scheda senza ulteriore possibilità di correzione a seguito dell'analisi gustativa, per chiudere con la valutazione visiva. In questo modo si limita sensibilmente l'interferenza tra i singoli attributi sensoriali. La procedura di assaggio deve inoltre prendere in considerazione altri fattori, quali la temperatura del campione, come effettuare i singoli test sensoriali, la quantità di campione, le operazioni di riequilibrio percettivo tra un campione e l'altro, per finire con il numero massimo di campioni da assaggiare per seduta. Nella nuova scheda il giudizio viene espresso singolarmente per ogni descrittore, in sequenza, in modo che il livello di gradimento totale raggiunto dipenda dalla somma di tutti i contributi, evitando di attribuire punteggi "correlati" fra i vari descrittori. Come abbiamo osservato durante le riunioni di sviluppo della scheda, l'utilizzo di descrittori ben definiti e riferiti a precise caratteristiche sensoriali permette di evidenziare le preferenze del singolo assaggiatore e facilita la discussione che segue la degustazione. Agli assaggiatori può essere richiesto di esprimere un giudizio completamente edonistico oppure di riconoscere il livello specifico di determinati descrittori qualitativi in relazione a degli standard di riferimento. Nel primo caso non è necessaria una specifica preparazione: la bravura dell'assaggiatore dipenderà dal grado di sensibilità dei suoi organi di senso nonché dalla capacità di discernere diversi campioni sulla base di caratteri descrivibili. Nel secondo caso, ossia inquadrare un campione incognito in una scala di qualità definita da standard, l'allenamento

degli assaggiatori è una condizione imprescindibile, in quanto la costanza delle performance degli assaggiatori e il loro giudizio analitico è alla base della riuscita di una seduta di analisi sensoriale.

Linee guida alle percezioni sensoriali

Per completezza si riportano di seguito alcune considerazioni ben note riguardo ai fenomeni di risposta degli organi di senso in fase di degustazione. A parte l'esame visivo, durante l'assaggio gli organi di senso coinvolti sono l'olfatto, il gusto e il sistema trigeminale che lavorano all'unisono formando una impressione gustativa globale, che viene poi scomposta a formare i singoli tratti percettivi. Sono comuni fenomeni di ibridazione, di sinergia e di soppressione delle singole molecole nei confronti delle altre; così come, per il principio di Helson, l'effetto sensoriale di uno stimolo gustativo di pari magnitudine varia in base alle leggi dell'assuefazione, della sensibilizzazione e del contrasto con il livello di stimolazione precedente. E' chiaro quindi che la capacità di analisi, intesa come l'abilità di scomporre un'esperienza complessa in altre meno complesse, è un requisito del buon assaggiatore, che deve però essere coadiuvato da uno strumento di valutazione semplice, veloce e oggettivo. Per questo motivo la scheda è stata concepita per favorire l'isolamento di ogni carattere sensoriale e ridurre l'influenza reciproca di ogni sensazione sulla successiva. La naturale sequenza dei test sensoriali è quindi: 1) olfazione; 2) degustazione; 3) esame visivo.

Le sensazioni olfattive sono le più difficili da descrivere in quanto esistono pochi termini per definire un gran numero di aromi. Inoltre, sono ben noti fenomeni che rendono alquanto difficile identificare gli aromi in miscela (antagonismo, sinergia, pseudo-dominio, soppressione, adattamento, ecc.). In aggiunta, l'utilizzo di più descrittori richiede un'organizzazione gerarchica e, per l'attribuzione del punteggio, generare una scala specifica per singolo aroma che renderebbe impossibile compilare la scheda durante l'analisi sensoriale. Il difficile riconoscimento degli aromi del balsamico è probabilmente dovuto alla complessità della miscela e all'effetto dell'invecchiamento, che tende a degradare le sostanze aromatiche che siamo abituati a riconoscere negli alimenti "freschi" ma che non hanno un riscontro in natura in tale forma. Non di meno, l'aroma del balsamico deve avere un ruolo fondamentale nel giudizio, per cui si è deciso di inserire un descrittore riferito agli "aromi complessivi", con cui l'assaggiatore esprime un giudizio di gradevolezza, di profondità e di complessità in un unico passaggio.

Le sensazioni tattili-trigeminali scaturiscono dall'eccitazione di recettori meccanici e chimici collegati al nervo trigemino, che costituisce un apparato sensoriale distinto dagli altri. Si possono quindi distinguere in percezioni fisiche (tattili in senso stretto) e chimiche. Nella prima categoria rientrano le sensazioni relative a consistenza, viscosità, granulosità, untuosità, tessitura, ecc., oltre alla percezione della temperatura reale del campione. Nella seconda categoria trovano posto sensazioni legate a dolore, fastidio e irritazione quali l'astringenza, il pungente, il piccante, il frizzante, il metallico, o di pseudo-calore e pseudo-freschezza. Nel

balsamico i caratteri da valutare in questa famiglia sono sicuramente la pungenza, la consistenza e l'astringenza.

Il gusto è il senso più "grezzo", ossia di per sé il meno raffinato. Permette di fare una prima scansione del sapore di un alimento (acidità, dolcezza, amarezza, salinità – trascurando l'umami e il metallico) ma, per generare il "flavor", esso è completato da percezioni tattili, termiche, trigeminali e olfattive. Il sapore è sempre derivante dalla combinazione dei quattro descrittori fondamentali. Anche una singola sostanza chimica può avere più sapori contemporaneamente. Ad esempio, i sali di sodio e litio sono in genere salati, quelli di potassio danno il salato e l'amaro. Anche gli acidi organici presenti nel balsamico hanno caratteri differenti: l'acido tartarico è forte e secco, il malico è astringente, il citrico è aspro e fresco, l'acido acetico è intenso e pungente, il succinico è tenue con note amare e salate, il gluconico è fresco e dolciastro, l'acido lattico è moderatamente acido. I sali sodici degli stessi acidi variano l'effetto sulla salinità in base alla lunghezza della catena organica. Non tutti i carboidrati, anche se chiamati "zuccheri", sono dolci. Alcune proteine sono usate come dolcificanti, mentre la maggior parte dei peptidi sono amari. Nell'aceto balsamico quindi, che contiene centinaia di sostanze, l'equilibrio fra i sapori è una proprietà fondamentale che va definita in modo rigoroso. Nella scheda perciò viene definita l'intensità dei quattro sapori, oltre a valutare la persistenza dell'acidità, che presumibilmente è il sapore che permane più a lungo dopo la deglutizione.

Sequenza dei sapori

Durante un assaggio, la concomitanza di diversi sapori non si avverte in modo contemporaneo. I quattro sapori hanno infatti tempi di innesco e permanenza in bocca differenziati; nei primi attimi della degustazione il sapore dolce prevale sugli altri, all'incirca fino alla deglutizione (alcuni secondi); successivamente, per qualche secondo, si osserva la diminuzione progressiva dei sapori dolci e l'aumento di quelli acidi e salati, per finire poi con i retrogusti acidi e soprattutto amari. Per facilitare il lavoro di decodifica delle sensazioni dell'assaggiatore, nella scheda di degustazione è stata mantenuta la stessa sequenza delle risposte sensoriali dell'assaggio. Le percezioni sensoriali sono influenzate dalla temperatura del campione: il freddo esalta la freschezza dell'acidità, la secchezza dell'amaro e l'astringenza, mentre mitiga il senso di morbidezza degli zuccheri (e delle altre sostanze che conferiscono sensazioni di pseudo calore come gli alcoli) e di untuosità di sostanze come il glicerolo. Al contrario, il caldo rende meno evidenti l'acidità e l'astringenza, mentre esalta la dolcezza e la consistenza. Le sensazioni caratteristiche dei quattro sapori sono inoltre associate ad una diversa reazione delle mucose orali: il dolce provoca la secrezione di saliva spessa e viscosa, l'acido abbondante e fluida, il salato abbondante e filante, l'amaro provoca generalmente perdita di salivazione in quanto è spesso abbinato alla sensazione di astringenza, non derivante dalla papille gustative ma da altri recettori presenti sulle mucose della bocca.

I test e i descrittori

Per ogni esame sensoriale sono di seguito fornite alcune indicazioni per la sua esecuzione, nonché la descrizione dei caratteri e del relativo punteggio massimo, espresso come percentuale dell'intera valutazione. Il valore ottenuto dalla maschera di lettura corrisponde al punteggio percentuale moltiplicato per 4.

La prova olfattiva si esegue senza aver osservato il campione in precedenza, che durante l'esame è mantenuto in un matraccio oscurato. I tre descrittori relativi possono valere fino al 25% del punteggio totale, e sono la pungenza (9%); la persistenza (9%), intesa come durata complessiva dello stimolo olfattivo e gli aromi complessivi (7%), ossia un giudizio di gradevolezza che tiene conto della presenza più o meno pronunciata dei caratteristici profumi del balsamico. La pungenza è il primo esempio di descrittore a scala piramidale: il punteggio va da zero (scarsa) fino a 36 (ottimale) per poi decrescere nuovamente a zero (eccessiva).

Successivamente all'esame olfattivo si passa all'assaggio, sempre mantenendo il campione oscurato, durante il quale si valutano le sensazioni gustative e si concludono quelle tattili-trigeminali. Il peso complessivo dell'esame gusto-olfattivo è al massimo del 50% del totale, e i relativi descrittori sono: la consistenza (5%), che esprime l'effetto tattile in bocca dovuto principalmente alla densità e viscosità; la dolcezza (12%); l'intensità dell'acidità (12%); la persistenza dell'acidità (9%); l'astringenza (3%); la salinità (6%) e l'amarrezza (3%). Ad esclusione della persistenza e della salinità, che ovviamente non prevedono riduzione di punteggio per eccesso di intensità, tutti gli altri descrittori hanno punteggi piramidali come per la pungenza. Il confine fra le sensazioni derivanti dall'esame olfattivo e dall'assaggio è chiaramente non ben definito in quanto durante il secondo esame si attiva anche la percezione olfattiva retronasale e la risposta trigeminale, ma la capacità dell'assaggiatore sta proprio nel saper inizialmente distinguere le singole sensazioni in modo analitico, prima di creare la sensazione finale.

Il test visivo può valere fino al 25% del punteggio totale, e si effettua per ultimo, perché non condiziona gli esami olfattivi e gustativi. Sono quindi valutate: la viscosità (5%), intesa come capacità di adesione al vetro del matraccio; il colore (10%) e la presenza di riflessi indesiderati; la limpidezza (5%), riferita alla trasparenza del campione; la brillantezza (5%), intesa come lucentezza, ossia capacità di riflettere superficialmente la luce. La viscosità è l'unico test visivo a scala piramidale, che permette cioè di penalizzare sia campioni troppo fluidi che troppo viscosi. Per valutare la limpidezza e la brillantezza è preferibile posare alcune gocce di campione su una superficie trasparente.

F4.2 Reperimento del panel di assaggiatori, organizzazione ed esecuzione della seduta di assaggio

Per mettere a punto le expertises e la composizione del panel di assaggio sono stati fatti una serie di stage teorico pratici coordinati dal Dott. R. Marchesini di Coldiretti/Impresa Verde, seguiti da test degustativi in

Camera di Commercio di Arezzo con sedute tenutesi il 31/10/2013, il 21/03/2013 e il 05/02/2014. Il panel di assaggiatori era composto da 7 membri, oltre al Dott. Roberto Marchesini che fungeva da capo panel. Il gruppo in questione è stato formato con assaggiatori provenienti dal settore vino e olio d'oliva. Nelle sedute-test precedenti il gruppo si era allenato al nuovo mondo dell'assaggio di aceti utilizzando la scheda e la guida forniti dall'Università di Modena e Reggio Emilia.

La degustazione dei prodotti ottenuti dalla miscelazione di cui alla fase 3 si è svolta presso la sala degustazione vini della CCIAA di Arezzo, in data 25/02/2014.

Alla seduta in questione presiedeva il Dott. Lemmetti di Unimore, che ha fornito indicazioni ulteriori sull'utilizzo della scheda, sulla modalità di assaggio, la natura dei campioni e le finalità della degustazione del giorno. In particolare si è sottolineato che il giudizio espresso dagli assaggiatori doveva essere puramente edonistico ed esprimere le preferenze personali. A differenza della modalità di assaggio classica, in cui si definisce la qualità di un prodotto in una scala di valori, per il gruppo di assaggio che è in corso di formazione, fra l'altro l'unico nella regione Toscana, non sono ancora stabiliti i campioni standard su cui fare riferimento per l'assegnazione oggettiva del punteggio, per cui l'assaggio soggettivo è, per adesso, l'unico possibile. Con l'aumentare progressivo del numero di campioni analizzati, sarà in seguito possibile passare all'assaggio classico oggettivo di qualsiasi campione di aceto. Ai fini del progetto, questa fase serve a valutare il livello di gradimento di una serie di campioni di aceto dalle caratteristiche chimico-fisiche molto varie, ottenuti per miscelazione di ingredienti di base zuccherini e acidi, in modo da poter indirizzare l'effettiva produzione in scala prototipale di cantina verso una linea di prodotti dalle proprietà macroscopiche simili a quei tipi che hanno riscosso maggior successo, migliorandone nel contempo le caratteristiche sulla base delle indicazioni fornite dagli assaggiatori del panel.

F4.3 Elaborazione dei risultati dell'analisi sensoriale

Nel complesso, i due campioni che hanno fatto registrare i punteggi medi più alti sono: A5 e B3. Per ottenere indicazioni più utili ai fini del progetto conviene però analizzare il contributo dei tre fattori (olfattivo, gustativo, visivo) in modo separato. Sono state inoltre raccolte note personali degli assaggiatori al fine di determinare particolari sensazioni ricevute. E' stato così possibile evidenziare i punti di forza e di debolezza dei singoli campioni, e definire una strategia di miglioramento.

L'analisi olfattiva premia indiscutibilmente il campione A7, che risulta gradevole come intensità della pungenza (mai eccessiva) e con discreti aromi (fig. 4). Il campione A5 ha invece pungenza eccessiva. L'acidità volatile (data dalla differenza fra quella titolabile e quella fissa) è di circa 5.3 per l'A7 e 6.9 per l'A5: tali valori possono essere considerati i primi punti di riferimento. La gradevolezza degli aromi può invece essere imputato alla presenza di vino, che conferisce quel qualcosa in più che subito si avverte all'olfazione.

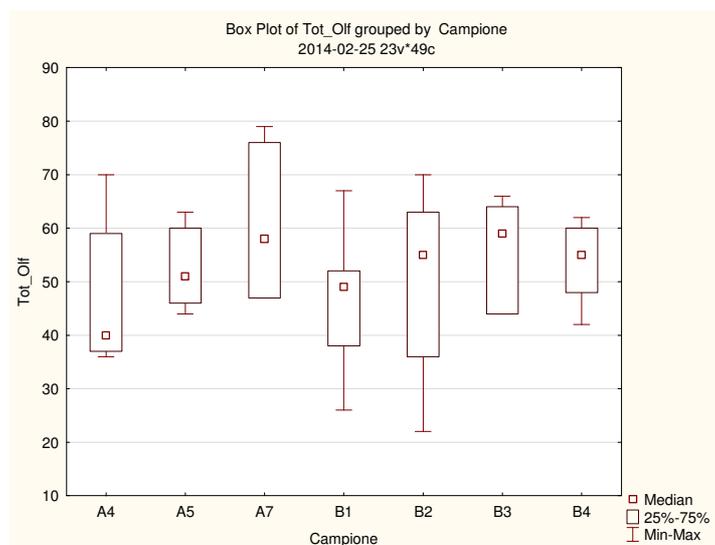


Figura 4 – Risultati del test olfattivo dei 7 aceti-miscele sottoposti a degustazione. I boxplot esprimono le mediane, i percentili e gli estremi del giudizio.

Passando ai gustativi, si conferma la preferenza complessiva per i campioni A5 e B3, insieme al campione B4 (fig. 5).

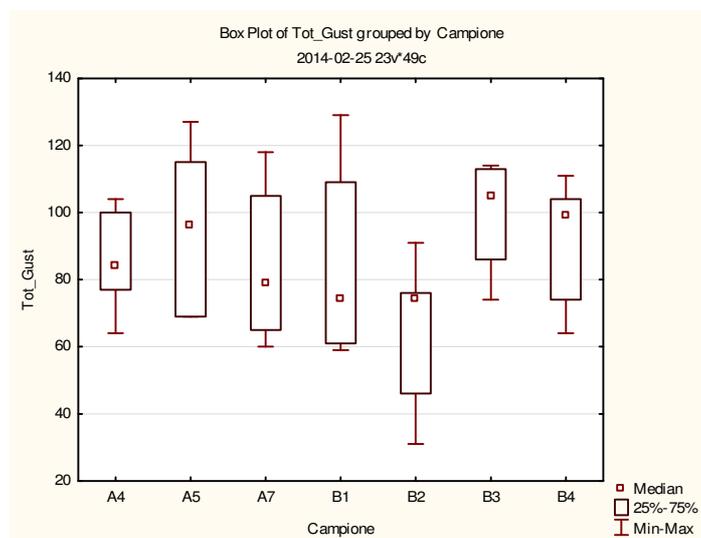


Figura 5 – Risultati del test olfattivo dei 7 aceti-miscele sottoposti a degustazione. I boxplot esprimono le mediane, i percentili e gli estremi del giudizio.

Considerando che la dolcezza e l'intensità dell'acidità sono i descrittori di maggior peso nella sezione dei gustativi, ciò evidenzia che un buon quantitativo di zuccheri (almeno il 30%) è necessario per ottenere un buon risultato in bocca. Inoltre, il campione B4 è stato definito dal panel come quello dal miglior equilibrio dolcezza/acidità. Il campione A7, che aveva riscosso il maggior successo in termini olfattivi, risulta troppo intenso in acidità, confermando che per mitigare un'acidità del 7% circa, servono almeno il 30% di zuccheri.

Inoltre, l'acidità del campione A7 ha una forte componente volatile, mentre i B3 e B4, pur con acidità totale sostenuta, presentano la componente fissa più alta, contribuendo alla gradevolezza gustativa in termini di acidità. In particolare per il B4 è stata evidenziata una gradevole freschezza, non brusca. Questo è un aspetto importante in vista della differenziazione della linea di prodotti che si vuole perseguire. Infine, il campione B2 ha ricevuto un basso punteggio gustativo ma per motivazioni opposte: troppi zuccheri e poca acidità. Quest'ultimo risultato era in parte atteso ma legato alle limitazioni dovute alle materie prime che non hanno consentito di creare una miscela sia molto zuccherina che molto acida. Con le tecniche che verranno utilizzate in cantina sarà invece possibile raggiungere livelli più alti di questi parametri, e i nuovi prodotti saranno nuovamente sottoposti al giudizio degli assaggiatori. La presenza di un prodotto molto zuccherino e viscoso è infatti consigliabile nella linea di "balsamici" in progetto.

Nell'esame visivo (fig. 6) chiaramente i campioni B2 e B3 hanno predominato a causa dell'elevato contenuto di zuccheri che ne aumenta la densità e quindi l'adesività al contenitore. Questo fattore è risaputo avere un grande effetto sul consumatore. Il campione A5 ha comunque raggiunto un buon punteggio nei visivi a causa del colore di un gradevole ambrato.

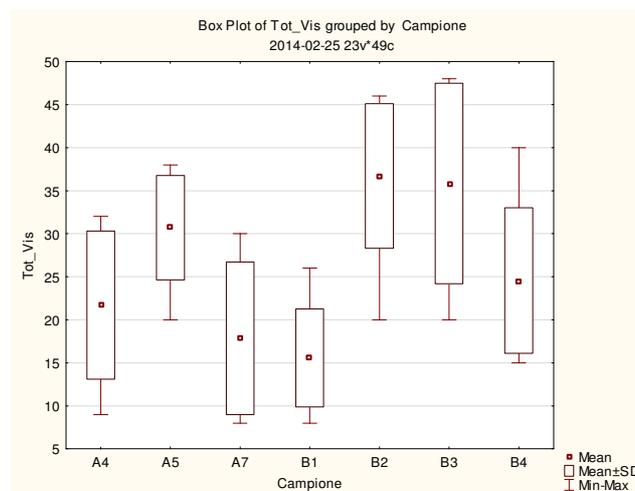


Figura 6 – Risultati del test olfattivo dei 7 aceti-miscele sottoposti a degustazione. I boxplot esprimono le mediane, i percentili e gli estremi del giudizio.

In conclusione, i campioni con acidità fissa sostenuta (superiore a 2%) sono quelli maggiormente apprezzati, corredati di un buon quantitativo di zuccheri (almeno il 30%). L'acidità volatile, responsabile della pungenza, è da considerarsi gradevole fra il 5% e il 6% per il livello di zuccheri considerato. Queste indicazioni sono utilizzate come linee guida per la produzione in cantina.

Fase 5. Produzione degli ingredienti Mosto Fresco (MF) e Vino Base (VB)

Tutte le uve destinate alle lavorazioni del progetto provengono da un vigneto di San Giovese situato in località Tregozzano (Arezzo), molto vicino al centro aziendale in cui è avvenuta la sperimentazione.

Il progetto ha coperto le due campagne di vendemmia degli anni 2013 e 2014. Per il primo anno le avverse condizioni atmosferiche hanno notevolmente ritardato la raccolta rispetto a quanto preventivato, mentre l'anno successivo è stato possibile raccogliere e pigiare l'uva nell'epoca di maturazione richiesta. Una delle caratteristiche peculiari degli aceti del progetto è, infatti, l'elevata componente fissa dell'acidità dei prodotti finali. Per raggiungere tale specifica è necessario operare sin dalla raccolta delle materie prime, preservando un'elevata acidità delle uve. Nel corso della maturazione, l'acidità delle uve (dovuta principalmente alla presenza di acido malico e tartarico) decresce con l'aumentare della concentrazione degli zuccheri (principalmente glucosio e fruttosio), per via di fenomeni di traslocazione, respirazione dell'acido malico, salificazione e diluizione. Tali processi dipendono inoltre fortemente dalle condizioni climatiche e dalle pratiche agronomiche, per cui è necessario monitorare la maturazione delle uve per stabilire il momento della raccolta.

L'ammostatura è avvenuta in assenza di enzimi pectolitici, in modo da raccogliere il solo mosto fiore alla massima acidità.

La fermentazione alcolica è stata innescata su diversi batches di mosto fresco tramite inoculo con colture pure di lieviti selezionati appartenenti alla collezione microbica dell'Università di Modena e Reggio Emilia (UMCC), seguita da monitoraggio ed analisi dei vini ottenuti.

F5.1 - F5.2 - F5.3 Vendemmia, ammostatura e stoccaggio del mosto fresco

Nell'annata 2013 si è verificato, nel corso della maturazione avanzata, un periodo climatico dalla temperatura relativamente alta, che favorisce la respirazione dell'acido malico, seguito da un periodo piovoso che ha ritardato fortemente le operazioni di raccolta. Di conseguenza, il mosto ottenuto in questa annata è risultato molto alto in zuccheri ma dalla ridotta acidità, come riportato nella tabella 3. L'operazione di raccolta, effettuata a mano, è stata suddivisa in due batches per un totale di 30 q di uva e 20 hL di mosto fresco.

Lotto	Quantità mosto hL	Acidità Titolabile g AcAc/100mL	Zuccheri riducenti g/100mL	Brix °Bx
1	10	0.77	23.4	21.6
2	10	0.80	28.2	25.5

Tabella 3 - Caratteristiche dei mosti della campagna di vendemmia 2013

Il mosto prodotto nella prima annata è stato destinato in parte alla vinificazione con un ceppo di lievito selezionato (fasi F5.5 – F5.8), in parte concentrato a freddo (fase F6.3), e una piccola parte congelato per utilizzo successivo come ingrediente accessorio delle miscele finali. Con i prodotti della vinificazione e della concentrazione è stato quindi innescato il processo di fermentazione acetica della fase 9.

Nell'annata 2014 il grado di maturazione dello stesso vigneto usato per l'anno precedente è stato monitorato per effettuare la vendemmia in un periodo molto precoce e mantenere l'acidità fissa elevata, a scapito del contenuto zuccherino, come riportato nella tabella 4.

Data	Brix	pH	TA
19/08/2014	13,8	3,03	1,33
31/08/2014	17,5	3,34	1.03
05/09/2014	17.02	3,22	1.16

Tabella 4 – Monitoraggio della maturazione delle uve della campagna 2014

Nella vendemmia 2014 sono stati raccolti circa 100 q di uve con cui sono stati prodotti: 9 hL di mosto concentrato (F6.3), 16 hL di vino suddiviso in tre batches vinificati in bianco e inoculati con tre diversi lieviti selezionati (fasi F5.5 – F5.8, F5.11), 10 hl di vino vinificato in rosso e 4 hL di mosto fresco congelato.

F5.4 Preparazione della coltura starter di lieviti e scaling-up in scala di laboratorio

Il mosto dell'annata 2013 è stato inoculato con il ceppo di lievito 21T2 proveniente dalla Unimore Microbial Culture Collection (UMCC) di cui si riporta la scheda descrittiva (tabella 5) come da database (<http://biolomics.umcc.unimore.it>). È stato quindi effettuato lo screening di ulteriori ceppi da impiegare nella successiva annata 2014, come riportato nella fase accessoria F5.11, da cui si è deciso di impiegare i ceppi B8805 e B8815 come ulteriori lieviti per l'annata 2014 (tabelle 6 e 7).

Species name :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Status of the strain :	Evolved strain from 20001
Biological Safety Level :	BSL-1
Substrate of isolation :	sicilian wine
Locality :	Reggio Emilia
Country :	Italy
Received from :	Giudici
Isolation year :	2007
Form of supply :	Active

Maintenance conditions :	cryopreservation at -80°C
Media and growth conditions	
Growth medium :	YPDA
Growth temperature :	27°C
References :	
	Mezzetti F., De Vero L., Giudici P. Evolved <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wine strains with enhanced glutathione production obtained by an evolution-based strategy. <i>FEMS Yeast Research</i> (2014),14: 977-987

Tabella 5 – Scheda del ceppo di lievito 21T2 utilizzato per la prima e la seconda annata di vinificazione

Species name :	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
Biological Safety Level :	BSL-1
Substrate of isolation :	traditional balsamic vinegar
Category of substrate :	balsamic vinegar
Locality :	provinces of Reggio Emilia and Modena
Country :	Italy
Form of supply :	Active
Maintenance conditions :	cryopreservation at -80°C
Growth medium :	YPDA
Growth temperature :	27°C

Tabella 6 – Scheda del ceppo di lievito B8805 utilizzato per la seconda annata di vinificazione

Species name :	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
Biological Safety Level :	BSL-1
Substrate of isolation :	traditional balsamic vinegar
Category of substrate :	balsamic vinegar
Locality :	provinces of Reggio Emilia and Modena
Country :	Italy
Form of supply :	Active
Maintenance conditions :	cryopreservation at -80°C
Growth medium :	YPDA
Growth temperature :	27°C

Tabella 7 – Scheda del ceppo di lievito B8815 utilizzato per la seconda annata di vinificazione

Il metodo per l'implementazione delle colture pure starter di lieviti prevede una procedura di scaling-up che, a partire da un piccolo inoculo in un mezzo di coltura appropriato e in condizioni sterili, accresce di

volume nello stesso mosto che andrà poi inoculato in cantina, preventivamente pastorizzato, fino a raggiungere un volume pari a circa 1/10 della massa totale destinata alla vinificazione.

Lo schema seguente illustra le fasi del procedimento di produzione della coltura starter (figura 7).

FASE DI LABORATORIO

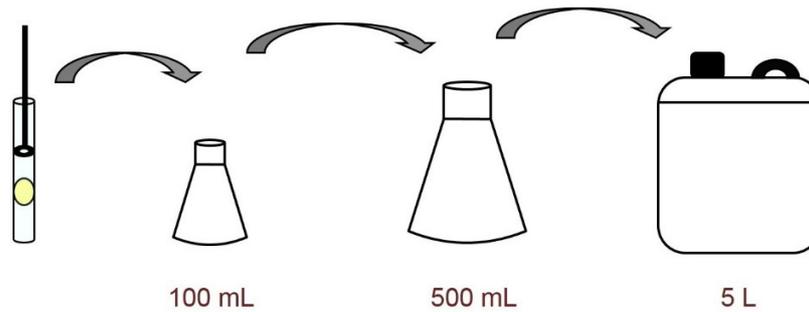


Figura 7 – Procedimento di scaling-up per la produzione di colture starter di lieviti

F5.5 – F5.9 Innesco, incremento del volume, monitoraggio e stabilizzazione della fermentazione alcolica in cantina, stoccaggio del vino base

A differenza di quanto preventivato nella fase F5.7, ossia di incrementare il volume del mezzo fermentante in modo graduale, si è inoculato direttamente l'intera massa dei mosti con una quantità sufficiente di coltura starter, in modo da eliminare la necessità della fase F5.7.

Per l'annata 2013 sono quindi stati inculati circa 8 hL di mosto fresco e vinificati in rosso. Il ceppo 21T2 era già noto per la sua prontezza e velocità di fermentazione, nonché della resistenza all'alcool etilico, così come confermato dal monitoraggio riportato in tabella 8.

Data	Brix	Temperatura	Alcool	Acidità Titolabile	Note
	°Bx	°C	%vol	gAcAc/100mL	
19/10/2013	22,9	19,0	nd	0,79	vendemmia
20/10/2013	20,6	19,3	4,3	0,79	
21/10/2013	17,7	19,0	7,0	0,80	
22/10/2013	14,3	19,5	10,4	0,80	
23/10/2013	12,2	19,7	12,5	0,81	
24/10/2013	10,3	19,6	13,8	0,82	
25/10/2013	9,6	19,4	14,3	0,87	
26/10/2013	9,4	19,2	14,5	0,92	
27/10/2013	9,2	18,8	14,6	0,92	svinatura

Tabella 8 – Monitoraggio della fermentazione alcolica del mosto dell'annata 2013 inoculato con ceppo 21T2

Per questo lotto non è stato necessario arrestare la fermentazione per filtrazione, in quanto l'intento era ottenere vino alla massima gradazione alcolica, da utilizzare in miscela con il mosto concentrato come substrato per la fermentazione acetica della fase 9. Una volta esaurita l'attività fermentativa dei lieviti, si è quindi provveduto alla chiarificazione del vino prodotto, alla svinatura e allo stoccaggio in atmosfera inerte. Per l'annata 2014 sono stati prodotti un nuovo batch di 8 hL di vino base utilizzando lo stesso ceppo 21T2 dell'anno 2013 (uno in bianco e uno in rosso), più due batches di 4 hL ciascuno utilizzando i nuovi ceppi di lieviti B8805 e B8815 risultanti dallo screening descritto nella fase F5.11. I due nuovi ceppi, appartenenti alla specie *Saccharomyces ludwigii*, risultano adatti all'ottenimento di vini base a basso tenore alcolico ed elevato residuo zuccherino, con prevalenza di consumo di glucosio rispetto al fruttosio. I tre batches sono serviti alla formulazione di specifici substrati utilizzati per il mantenimento della fermentazione acetica innescata nell'anno precedente, come descritto nelle fasi 7 e 8.

Come per l'annata 2013, il vino ottenuto con il lievito 21T2 è stato fatto fermentare completamente, mentre quello ottenuto con il B8805 è stato filtrato a 10 µm quando il grado alcolico era prossimo a 9.

Come evidenziato nella fase F5.11, la prontezza e la velocità della fermentazione dei ceppi opzionali B8805 e B8815 risultano inferiori a quelle del ceppo base 21T2, anche in condizioni di ridotto contenuto di zuccheri. Ciononostante, è stato possibile ottenere il grado alcolico desiderato anche impiegando queste colture starter, per cui se ne conferma l'usabilità come ceppi specifici per la produzione di vini base a ridotto contenuto di glucosio e adatti all'acetificazione col metodo messo a punto nel progetto.

F5.10 Analisi dei vini base prodotti

Sui 3 batches di vini base ottenuti nell'annata 2014, inoculati con 3 diversi lieviti selezionati, sono stati determinati i dati analitici riportati nella tabella 9, mediante metodiche in HPLC e classiche.

Componente	Vino base 21T2 (in bianco)	Vino base 21T2 (in rosso)	Vino base B8805	Vino base B8815
Glucosio (g/L)	3.1	3.3	9.3	13.1
Fruttosio (g/L)	4.3	3.9	14.7	19.6
Etanolo (%vol)	10.7	10.2	9.7	9.1
Glicerolo (g/L)	7.8	7.8	6.8	6.7
Ac. Citrico (g/L)	0.52	0.54	0.52	0.53
Ac. Tartarico (g/L)	1.62	1.48	1.55	1.54
Ac. Malico (g/L)	5.3	5.3	4.9	4.9
Ac. Succinico (g/L)	0.44	0.44	0.51	0.52
Ac. Lattico (g/L)	0.63	0.64	0.52	0.48
Ac. Acetico (g/L)	0.13	0.12	0.18	0.18

Ac. Titolabile (gAcAc/100mL)	0.67	0.67	0.87	0.89
Ac. Fissa (gAcAc/100mL)	0.55	0.55	0.66	0.66

Tabella 9 – Determinazioni analitiche sui vini base ottenuti nell'annata 2014

Il ceppo 21T2 ha portato quasi “a secco” il mosto inoculato, il B8815 è stato arrestato per filtrazione mentre il B8805 ha raggiunto un grado alcolico inferiore al ceppo base. Dal valore degli zuccheri residui, si conferma il carattere glucosofilo dei ceppi B8805 e B8815 anche in condizioni di basso tenore zuccherino. Trattandosi di specie osmofile, che normalmente presentano preferenza per il fruttosio, questa è una caratteristica peculiare dei ceppi impiegati, che consente di ridurre la quantità di zuccheri nei prodotti finiti, a parità di grado di dolcezza.

Il glicerolo è prodotto dai lieviti, normalmente in quantità proporzionale all'etanolo, e influisce positivamente sulla palatabilità dei vini, conferendo corposità e viscosità. I valori ottenuti sono medio-alti e contribuiscono alle caratteristiche dei prodotti finali in vari modi, sia come composto a sé che come reagente nella formazione di esteri con gli acidi organici.

Gli acidi tartarico e malico sono i responsabili dell'acidità delle uve, insieme a tracce di acido citrico. Durante la fermentazione alcolica, l'acido tartarico si riduce in seguito a precipitazione dovuta alla variazione di solubilità nel mezzo alcolico; l'acido malico può essere sia metabolizzato che prodotto dai lieviti. I mosti utilizzati avevano un contenuto di acido malico molto alto che si è mantenuto anche a fine fermentazione, contribuendo all'acidità finale dei vini.

Gli acidi succinico, lattico e acetico sono anch'essi prodotti dall'azione dei lieviti e innalzano l'acidità finale dei vini. L'acido succinico ha un effetto positivo sulla proprietà sensoriali, sia come composto a sé sia perché forma con gli alcoli degli esteri responsabili di aromi fruttati.

L'acido lattico è in parte formato dai lieviti e in parte può derivare dalla fermentazione malo-lattica. Normalmente è un acido ricercato nella produzione vinaria, in quanto contribuisce all'acidità ma ha un carattere più “morbido” rispetto all'acido malico.

L'acido acetico nei vini è un fattore molto critico, nel nostro caso non ha nessuna ripercussione negativa in quanto, al contrario, contribuisce ad aumentare l'acidità volatile degli aceti finali.

In definitiva, l'obiettivo principale di questa fase è stato pienamente raggiunto in quanto sono stati ottenuti vini dall'acidità molto elevata, adatti alla produzione di aceti dall'acidità fissa pronunciata.

F5.11 Preparazione di ulteriori colture starter per la fermentazione alcolica

I due ceppi B8815 e B8805 utilizzati nella campagna 2014 sono stati scelti in base ai risultati di screening di fermentazione di mosto fresco arricchito con mosto concentrato di 7 ceppi di lieviti osmofili e glucosofili. Generalmente i lieviti osmofili mostrano preferenza per il fruttosio, nel senso che metabolizzano in modo

preferenziale tale monosaccaride rispetto al glucosio, lasciando quindi a fine fermentazione un residuo zuccherino ricco in glucosio. Questi ceppi sono stati invece selezionati per la loro tendenza opposta, ossia di produrre vini a contenuto zuccherino residuo ricco in fruttosio, nonché per la loro capacità di fermentare mezzi ad alta concentrazione di zuccheri iniziale. La concentrazione di zuccheri iniziali è stata aggiustata a 400 g/L per valutare la capacità dei ceppi in test di fermentare in tali condizioni, che consentirebbero di attuare la fermentazione alcolica della fase 5 su miscele di mosto/mosto concentrato invece che su solo mosto fresco. Il vino dolce risultante da tale fermentazioni, oltre ad avere un rapporto glucosio/fruttosio alterato, sarebbe direttamente utilizzato come substrato per la successiva fermentazione acetica della fase 9. La figura 8 illustra lo sviluppo di etanolo in funzione del tempo per i 7 ceppi in esame. Appare chiaramente che la prontezza della fermentazione è molto scarsa in tali condizioni, anche se poi, in un tempo relativamente lungo, alcuni ceppi riescono a sviluppare un grado alcolico accettabile, fra cui i due scelti.

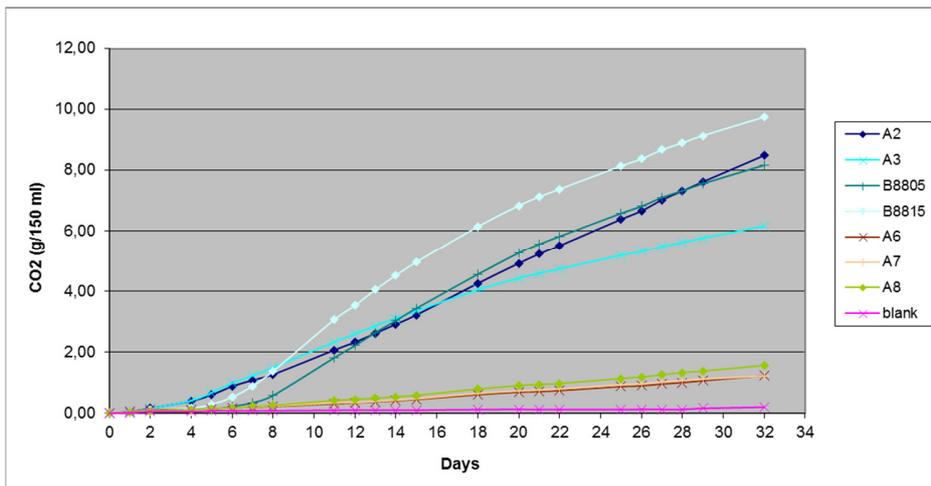


Figura 8 – Curve di fermentazione dei ceppi osmofili e glucosofili in mezzo costituito da mosto fresco e mosto concentrato alla concentrazione zuccherina di 400 g/L. I valori sono la media di tre repliche.

Nella figura 9 sono riportati i valori di glucosio e fruttosio consumati dopo 32 giorni dall'inoculo. Anche in questo caso, i due ceppi B8805 e B8815 risultano i migliori in quanto affiancano all'alto consumo complessivo di zuccheri una forte prevalenza per il glucosio.

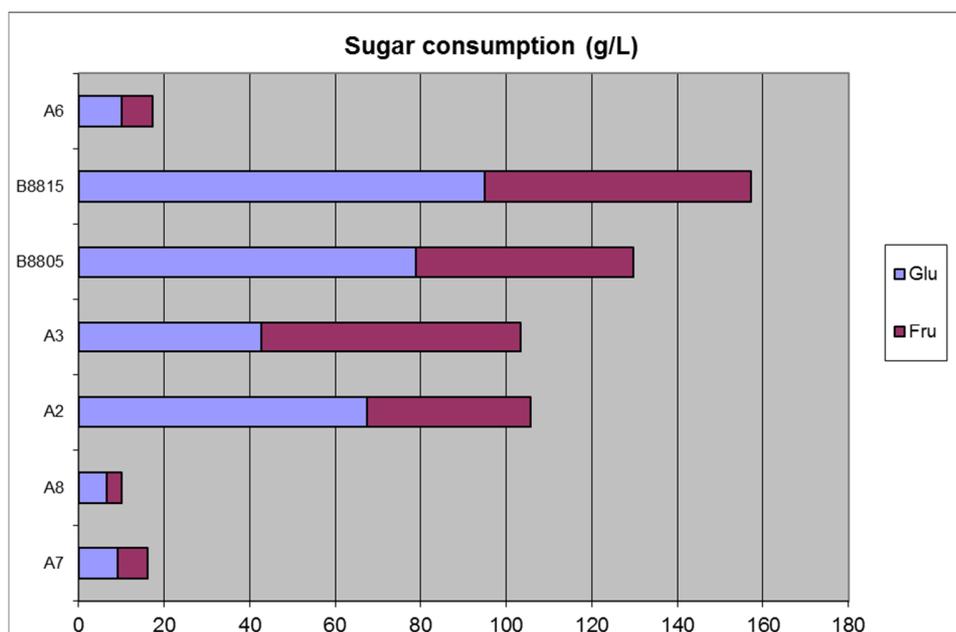


Figura 9 - Consumo di glucosio e fruttosio a 32 giorni dall'inoculo di mosto con 400 g/L di zuccheri iniziali. I valori sono la media di tre repliche.

Nonostante i due ceppi B8805 e B8815 abbiamo dimostrato di possedere le capacità fermentative richieste in termini di produzione di etanolo e alterazione del rapporto glucosio/fruttosio, è stato deciso di non utilizzarli nella cantina sperimentale nelle stesse condizioni di alta pressione osmotica, a causa di possibili problemi di sicurezza alimentare. Infatti, mentre in laboratorio le condizioni sterili della sperimentazione escludono la possibilità di contaminazioni con microrganismi indesiderati, nelle condizioni di cantina la forte latenza iniziale della fermentazione potrebbe dare il tempo ad altri microrganismi (in particolare muffe) di sviluppare nel mosto altamente zuccherino, prima che la concentrazione di etanolo raggiunga valori inibenti per gli stessi. Si è quindi scelto di utilizzare comunque i ceppi accessori B8805 e B8815, ma sul mosto fresco tal quale, in modo che la concentrazione zuccherina non rallenti lo sviluppo iniziale dei lieviti che possono quindi innescare prontamente la produzione di etanolo.

Come illustrato nelle fasi 7 e 8, l'aggiunta di zuccheri ai vini base per l'ottenimento dei substrati per la fermentazione acetica, è stata fatta in concomitanza della fase 9, ossia aggiungendo vino e mosto concentrato e/o cotto direttamente nel reattore di fermentazione acetica, dove la presenza di acido acetico prodotto dai batteri acetici preclude lo sviluppo di microrganismi alteranti anche in presenza di zuccheri non fermentati.

Test fermentativi di ceppi produttori di Glutazione

Con la stessa modalità descritta nella fase F5.4 sono state preparate altre colture starter con i seguenti ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* Mo21T2-5 (=UMCC 2581) e Mo21T2-12 (=UMCC 2585), ottenuti con strategia di evoluzione adattativa, a partire dal ceppo enologico 21T2.

Negli ultimi anni le tendenze del mercato enologico sono state fortemente influenzate dalle esigenze dei consumatori sempre più attenti alla qualità dei vini e, sulla scia di queste tendenze, oltre che delle innovazioni tecnologiche di produzione, sono stati improntati i nuovi criteri di selezione dei lieviti enologici da utilizzare come coltura starter per i processi fermentativi. D'altra parte, la selezione di una coltura starter, come di qualsiasi altro "biocatalizzatore", è un processo multi-disciplinare che non include solo l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione della performance metabolica e fermentativa dei ceppi, ma anche lo studio dei determinanti genici di ogni carattere e l'implementazione di tecniche di miglioramento genetico.

Le caratteristiche principali richieste a un ceppo di lievito da impiegare in vinificazione sono sensibilmente cambiate nel tempo, infatti, i primi ceppi di lievito selezionati negli anni '50 e '60 dovevano possedere caratteristiche fondamentali quali una buona tolleranza alla SO₂, una buona energia fermentativa, tempi brevi di fermentazione ed assenza di aromi sgradevoli. Queste caratteristiche erano certamente in sintonia con le tecnologie e le esigenze dell'enologia del passato. Più attuali sono invece le richieste di ceppi criotolleranti, da impiegare su larga scala nelle fermentazioni a bassa temperatura o di ceppi che non producono solfiti, i cui effetti negativi sulla salute sono noti ai ben informati consumatori.

Recentemente, è anche aumentato l'interesse per i lieviti in grado di produrre elevate quantità di glutatione (GSH) poiché i ceppi con queste caratteristiche possono potenzialmente rappresentare un'alternativa all'impiego dell'anidride solforosa, limitatamente al suo ruolo antiossidante. Dal punto di vista chimico, il glutatione è un tripeptide sintetizzato a partire dagli amminoacidi cisteina, glicina e acido glutammico ed è presente in tutte le cellule viventi principalmente nella sua forma ridotta. Nei mosti e nei vini bianchi, la notorietà del GSH deriva dalla sua capacità di controllare i danni ossidativi e di limitare l'imbrunimento tramite la riduzione competitiva degli o-chinoni prodotti dall'azione della polifenolo ossidasi sugli acidi idrossi-cinnamil tartarici. Queste azioni si traducono, fondamentalmente, in un rallentamento della formazione del sotolone e degli altri caratteri di invecchiamento atipico, e in una effettiva protezione nei confronti dei diversi composti aromatici del vino. Il raggiungimento di efficaci concentrazioni di GSH nel vino non è però di facile ottenimento. L'apporto iniziale dato dalle uve, i processi tecnici usati in cantina e il ceppo di lievito impiegato nella fermentazione sono tutti fattori capaci di introdurre una forte variabilità nella concentrazione finale. In primo luogo, il contenuto di GSH evidenziato nelle diverse varietà di *Vitis vinifera* è estremamente variabile in funzione della componente genetica, del livello di maturazione dell'uva, della nutrizione o degli stress ambientali, tanto per citare alcuni dei fattori determinanti. Nel mosto, i fattori che possono alterare la concentrazione del GSH sono l'esposizione all'ossigeno, l'attività tirosinasi dell'uva, le operazioni di pigiatura e la macerazione delle bucce durante il periodo pre-fermentativo. Anche durante la fase fermentativa è possibile osservare una variazione del contenuto di GSH legata all'attività del lievito: evidenze sperimentali riportano un diverso comportamento dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

relativamente alla capacità di assimilare o rilasciare GSH nel mezzo, sostenendo l'importanza della scelta del lievito giusto da utilizzare. Ciò nonostante, allo stato attuale, sono ancora pochi i dati relativi all'ottenimento di lieviti per uso enologico, alto produttori di glutatione, in grado di combinare questa prerogativa, oltre che alle immancabili performance fermentative e alla non produzione di composti olfattivi indesiderati. Tra questi, quelli chiamati maggiormente in causa sono i solfuri, direttamente coinvolti, insieme ai solfiti e al GSH, nel pathway metabolico dei solfati.

In *S. cerevisiae* il GSH è naturalmente presente in concentrazioni elevate che vanno dallo 0,1% all'1% del peso secco cellulare, rappresentando più del 90% dei tioli a basso peso molecolare. Il GSH ha un ruolo fondamentale per i lieviti stessi, in quanto coinvolto in molte funzioni cellulari essenziali come il controllo del potenziale ossidoriduttivo, l'azione antiossidante e la capacità detossificante di xenobiotici e metalli pesanti. Proprio in virtù delle sue molteplici implicazioni, modifiche nel metabolismo del GSH non sono semplici da ottenere, e gli effetti indiretti non sempre prevedibili in tutti i loro aspetti. Ad esempio, i lieviti capaci di apportare significativi aumenti nelle quantità finali di GSH durante la fermentazione di un determinato mosto, spesso non confermano questa attitudine al variare del mezzo fermentativo. Le ragioni di questa variabilità, ancora oggi non del tutto chiare, sono legate, con buona probabilità, alla complessità metabolica del mosto e alle articolate interazioni che intercorrono tra composizione iniziale del mosto, componente genetica del ceppo di lievito e parametri ambientali quali pH, temperatura e pressione osmotica che influenzano la crescita dei microrganismi.

Diverse strategie di miglioramento genetico dei lieviti, che implicano le tecniche di mutagenesi e di ingegneria genetica, sono state ampiamente descritte per l'ottenimento di lieviti alto produttori di glutatione. In particolare le tecniche di mutagenesi puntano ad inserire mutazioni casuali nel genoma per poi selezionare i ceppi migliori mediante screening successivi. Un approccio opposto è quello dell'ingegneria genetica, con cui grazie alle tecniche del DNA ricombinante si over-esprimono i geni chiave delle vie metaboliche di interesse. Nel caso del GSH, i risultati migliori sono stati ottenuti over-esprimendo, oltre ai due enzimi direttamente implicati nella biosintesi, anche gli enzimi chiave della pathway di assimilazione dei solfati, in virtù della stretta relazione tra queste due vie metaboliche. La maggior parte delle strategie impiegate per le produzioni industriali non sono però applicabili all'industria enologica a causa di limitazioni giuridiche, culturali, scientifiche o di processo.

Le strategie di evoluzione adattativa, invece, sono ampiamente utilizzate per il miglioramento dei lieviti enologici, riscuotendo anche il consenso dei consumatori, dato che non portano alla produzione di organismi geneticamente modificati. I vantaggi delle strategie di evoluzione adattativa sono quelli di non introdurre geni ricombinanti estranei nel genoma dei microrganismi e di non richiedere una preventiva conoscenza dei geni coinvolti nell'espressione dei fenotipi desiderati. Infatti, sottoponendo i microrganismi a colture seriali o continue per diverse generazioni, in presenza di una specifica pressione selettiva, si

selezionano i ceppi evoluti esprimenti il carattere d'interesse. Tuttavia, poiché lo screening dei microrganismi evoluti richiede necessariamente l'espressione di fenotipi selezionabili, ossia facilmente riconoscibili, tali strategie non sono applicabili per l'ottenimento di caratteristiche enologiche legate a variazioni e ricombinazioni genetiche non direttamente selezionabili. Esempi specifici di tali limiti riguardano l'ottenimento di ceppi alto produttori di GSH, ceppi con attività β -glicosidasi o con alta capacità di produrre composti sensorialmente attivi, per i quali ogni singola variante ottenuta mediante randomizzazione deve essere testata individualmente per il fenotipo di interesse con un dispendio di tempo consistente.

Ciò nonostante questo limite è superabile individuando, nella pathway biosintetica del metabolita di interesse, uno o più step in cui applicare la pressione selettiva in modo da selezionare i ceppi evoluti potenzialmente in grado di esprimere il fenotipo desiderato. Questa strategia basata sull'evoluzione adattativa è stata recentemente messa a punto e applicata per la selezione di ceppi di lievito basso produttori di solfiti e solfuri. La strategia descritta si basa sulla formazione di ricombinanti attraverso la riproduzione sessuale e sulla successiva individuazione dei ricombinanti di interesse attraverso uno screening rapido e altamente selettivo. In particolare, i metalli come il cromato e il molibdato, tossici per le cellule nella forma ionica esavalente, applicati come pressione selettiva, consentono di selezionare i ceppi evoluti con un metabolismo alterato relativamente alla pathway di assimilazione dei solfati e della biosintesi del GSH. Questi metalli, infatti, essendo strutturalmente analoghi del solfato, possono attraversare la cellula utilizzando le stesse specifiche permeasi di membrana e stimolare la produzione di GSH che, ricordiamolo, tra i suoi vari ruoli ha anche quello di intervenire attivamente nei processi di detossificazione della cellula. Il GSH prodotto viene principalmente concentrato nei mitocondri dove svolge importanti azioni antiossidanti, ma è presente in quasi tutti i compartimenti cellulari, in particolar modo nel vacuolo, dove viene immagazzinato, se in eccesso, o inglobato in forma complessata a metalli pesanti o xenobiotici.

Con la strategia di evoluzione adattativa descritta sono quindi stati ottenuti ceppi di lievito alto produttori di GSH. In particolare 2 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, Mo21T2-5 (=UMCC 2581) e Mo21T2-12 (=UMCC 2585), ottenuti a partire dal ceppo enologico 21T2, sono stati testati per le loro performance fermentative. Nelle prove di microvinificazione hanno evidenziato delle buone performance fermentative paragonabili a quelle del ceppo parentale. Inoltre, i due ceppi Mo21T2-5 e Mo21T2-12 hanno evidenziato un incremento della produzione di glutazione in vino, rispettivamente del 100% e del 36% in confronto al ceppo parentale (fig. 10).

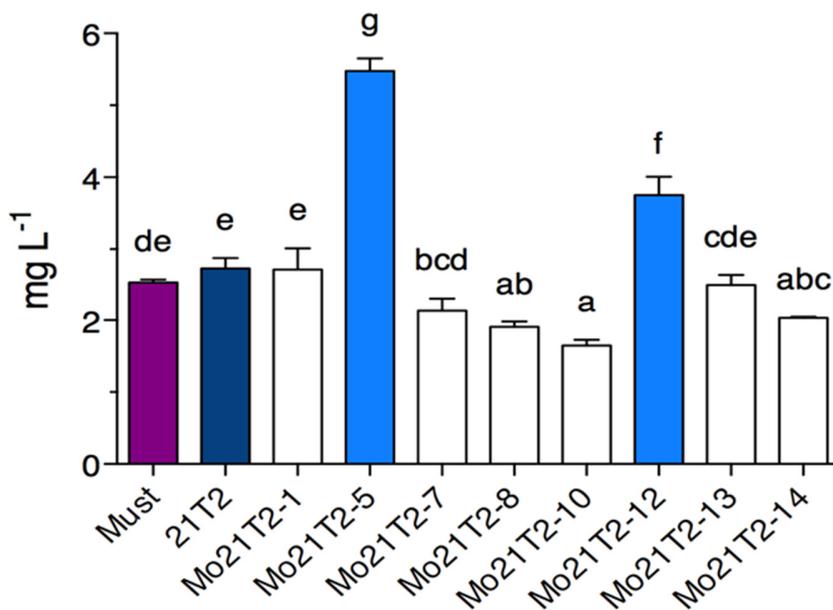


Figura 10 - Glutazione extracellulare (mg/L) determinato a fine fermentazione nella prova di microvinificazione di mosto inoculato con ceppi selezionati ottenuti con la strategia di evoluzione adattativa a partire dal ceppo parentale di *Saccharomyces cerevisiae* 21T2.

Questi ceppi selezionati sono stati depositati nella collezione microbica UNIMORE del Dipartimento di Scienze della Vita (Unimore Microbial Culture Collection – UMCC - website: www.umcc.unimore.it) e saranno oggetto di sperimentazione in cantina per verificare su larga scala gli effetti benefici dell'aumentato rilascio di GSH, sia relativamente alla prevenzione dell'imbrunimento dei vini bianchi e sia relativamente alla protezione dei composti aromatici.

Fase 6. Produzione degli ingredienti Mosto Concentrato (MConc) e Mosto Cotto (MCotto)

La concentrazione e la cottura del mosto fresco sono processi fondamentali nella produzione di aceti agrodolci in quanto forniscono il mosto concentrato e il mosto concentrato e cotto. Tali ingredienti, miscelati ai vini che fungono da substrati per la fermentazione acetica e/o impiegati nelle miscele finali, sono necessari ad innalzare il contenuto zuccherino e l'acidità fissa dei prodotti finali e, nel caso degli aceti simil-balsamici, a fornire gli aromi di cotto caratteristici di tale tipologia di aceto.

F6.1 – F6.4 Analisi e concentrazione del mosto fresco, stoccaggio del mosto concentrato

Il mosto concentrato è stato ottenuto usando parte dei mosti freschi delle campagne di vendemmia 2013 e 2014. L'apparecchiatura impiegata è un concentratore a pompa di calore operante sotto vuoto spinto con evaporazione a freddo, che consente di concentrare il mosto fino a circa 65 °Bx evaporando circa 100 L/h di acqua alla temperatura di 22-24°C, sia in modalità di ricircolo che in linea (figure 11 e 12). L'evaporazione a bassa temperatura consente di preservare le sostanze volatili aromatiche presenti nel mosto e non provoca il danneggiamento termico dei composti labili, mantenendo pressoché inalterate le proprietà sensoriali e chimico-fisiche del mosto.



Figura 11 - Concentratore termico sottovuoto utilizzato per ottenere i mosti concentrati



Figura 12 - Mosto concentrato a 62°Bx, densità 1,3 e acidità 4,9 g/100mL, dal brillante colore rosso rubino

In enologia, la concentrazione dei mosti serve generalmente per aumentare la concentrazione di zuccheri fermentescibili in mosti carenti. Nel caso della produzione degli aceti speciali del progetto, il mosto concentrato è impiegato anche per innalzare notevolmente l'acidità fissa dei prodotti finali. Il processo di concentrazione, infatti, interessa ovviamente tutti i composti presenti nel mosto fresco. Sebbene gli zuccheri siano la parte preponderante dei soluti del mosto, anche gli acidi organici e gli altri composti minoritari aumentano di concentrazione, in proporzione alla quantità presente nel mosto fresco iniziale, a parte l'acido tartarico che invece tende a precipitare a causa della bassa solubilità. Come si vede dalla tabella 10, che riporta le caratteristiche dei mosti prima e dopo la concentrazione nelle due campagne di vendemmia, si possono ottenere mosti concentrati dall'acidità fissa estremamente alta.

Proprietà	Mosto fresco 2013	Mosto conc 2013	Mosto fresco 2014	Mosto conc 2014
Quantità (hL)	-	3.5	-	9
Soluti (°Bx)	22.9	61	17.2	62
Zuccheri riducenti (g/100mL)	25.0	78.1	18.3	80.1
Acidità (g AcAc/100mL)	0.79	2.10	1.05	4.89

Tabella 10 – Produzione di mosto concentrato delle due campagne di vendemmia

È bene tener presente che i mosti concentrati normalmente usati per la produzione di aceti agrodolci sono a bassissima acidità (intorno a 1), in quanto provengono dalla concentrazione di mosti ottenuti da uve surmature a bassa acidità. Questo tipo di mosti concentrati ha un'influenza minima sull'acidità titolabile degli aceti di cui vanno a far parte, per i quali l'acidità deriva essenzialmente dall'acidità volatile dell'aceto secco usato nella miscela. Nel progetto Acetoscana, invece, l'acidità dei mosti determina il 30% e più dell'acidità totale degli aceti prodotti, sotto forma di acidità fissa costituita da acidi organici diversi dall'acido acetico e dalle peculiari proprietà sensoriali.

I mosti concentrati sono stati stoccati in semplici contenitori d'acciaio ben chiusi e sanitizzati, senza particolari misure di conservazione in quanto l'alta pressione osmotica derivante dalla concentrazione zuccherina inibisce la crescita di microrganismi nocivi. Al massimo si può verificare una lieve fermentazione alcolica da parte di lieviti fortemente osmotolleranti, che difficilmente potranno produrre più di 1-2 gradi alcolici.

Il mosto concentrato dell'annata 2013 è stato impiegato per alimentare, insieme al vino base dello stesso anno, uno dei quattro reattori di fermentazione acetica (precisamente il 3A), così come esposto nella fase 9. Il mosto concentrato dell'annata 2014 è stato impiegato per continuare ad alimentare il reattore 3A e l'omologo 3B, nonché produrre il mosto cotto come descritto nella fase F6.5.

F6.5 Trattamento termico del mosto concentrato, ottenimento dell'ingrediente Mosto Cotto e sua conservazione

Il mosto cotto è un ingrediente fondamentale nella produzione degli aceti "balsamici". Nel caso dell'Aceto Balsamico Tradizionale DOP (di Modena e di Reggio Emilia) il mosto cotto è l'unico ingrediente utilizzato, che viene ottenuto per cottura diretta a pressione atmosferica del mosto fresco. Il mosto cotto viene quindi sottoposto a fermentazione alcolica, fermentazione acetica e concentrazione per invecchiamento prolungato con metodo tipo Solera.

Nell'Aceto Balsamico di Modena IGP il mosto cotto è invece miscelato ad aceto secco di vino e caramello, quindi invecchiato per breve tempo in condizioni statiche. Il disciplinare di produzione IGP consente di utilizzare "mosto concentrato e/o cotto" ma non permette di cuocere il mosto concentrato.

L'obiettivo della cottura del mosto è duplice: aumentare la concentrazione dei soluti (in particolare degli zuccheri) e innescare l'imbrunimento non enzimatico che conferisce il colore scuro e gli aromi caratteristici di cotto. I due fenomeni sono in realtà strettamente connessi dal punto di vista chimico-fisico: l'imbrunimento deriva dal processo di degradazione degli zuccheri causato dal trattamento termico che innesca le reazioni di Maillard, accelerate dalla perdita di acqua per evaporazione.

Nel progetto Acetoscana si è scelto di separare il più possibile i due processi, in modo da ottimizzare entrambi. Dapprima quindi il mosto fresco è stato concentrato a freddo (fase F6.3) e poi cotto in batches via via che se ne rendeva necessario l'utilizzo come ingrediente del substrato di acetificazione del reattore 1A (fase 9). La separazione dei processi di concentrazione e di cottura presenta infatti numerosi vantaggi. In primo luogo la concentrazione a freddo del mosto fresco preserva le caratteristiche sensoriali senza degradare gli zuccheri e gli altri composti presenti, oltre a fornire un prodotto (il mosto concentrato) che può essere stoccato senza particolari accorgimenti, a differenza del mosto fresco. In secondo luogo, la cottura del mosto concentrato necessaria all'imbrunimento è molto più rapida di quella del mosto fresco, in quanto il calore latente di evaporazione dell'acqua richiede molta energia dal sistema riscaldante. La ridotta quantità di acqua presente nel mosto concentrato, inoltre, velocizza le reazioni di imbrunimento per polimerizzazione dei precursori dei composti di Maillard, che prevedono l'espulsione di molecole d'acqua. Infine, la separazione dei processi consente di avere a disposizione due ingredienti diversi (il mosto concentrato e il mosto concentrato e cotto) che sono stati utilizzati per preparare delle miscele finali differenziate fra loro, sia dal punto di vista degli aromi che del colore (fase 10).

Per la cottura del mosto concentrato è stato inizialmente testato uno scambiatore di calore a fascio tubiero immerso in un liquido diatermico, in cui il mosto concentrato veniva fatto circolare tramite una pompa peristaltica. Questo sistema si è rivelato inadeguato in quanto l'imbrunimento avveniva troppo lentamente ed era necessario il ricircolo prolungato del mosto parzialmente cotto, con conseguente dilatamento del tempo di trattamento termico. È stato quindi approntato un altro sistema, costituito da una sorta di

pastorizzatore di circa 100 L di volume (fig. 13), munito di agitatore meccanico interno, capace di innalzare la temperatura del mosto concentrato fino a 110°C in meno di 1 ora e mezzo.



Figura 13 – Riscaldatore utilizzato per la cottura del mosto concentrato

Per determinare le migliori condizioni di cottura, sono stati effettuati due batches di cottura utilizzando il mosto concentrato dell'annata 2014: il primo test è stato effettuato a 80°C per 3 ore e mezzo, il secondo a 100°C per 2 ore. Sui due batches è stato misurato il colore e il contenuto di 5-idrossimetil-2-furfurale, come riportato nella fase F6.7.

Tutti i successivi batches di cottura sono stati eseguiti nella modalità suggerita dalle analisi dei batches di prova. Alla data di fine del progetto sono stati prodotti 300 L di mosto cotto, che viene continuamente utilizzato per alimentare uno dei reattori di acetificazione e per preparare le miscele finali.

F6.7 Analisi del Mosto Cotto

Uno degli aspetti fondamentali del processo di cottura del mosto, su cui si è concentrato il presente progetto, è riferito alla formazione di composti nocivi, in particolare del 5-idrossimetil-2-furaldeide (5-HMF). Tale composto deriva dal processo di degradazione termica del fruttosio e del glucosio, che può avvenire tramite meccanismi di reazione diversi (ad esempio disidratazione e ciclizzazione, oppure attraverso forme endioliche e successive ciclizzazioni). D'altra parte, il 5-HMF è un prodotto intermedio dell'intera catena della reazione di Maillard, e genera i prodotti di imbrunimento per reazione con gruppi amminici e polimerizzazione. In ogni caso, l'accumulo di 5-HMF dipende da molti fattori (tra cui il pH e la composizione zuccherina e amminoacidica) ma in larga parte dipende dalla temperatura e dal tempo di esposizione al calore, nonché dall'attività dell'acqua.

Allo scopo di verificare le condizioni di miglior compromesso fra grado di imbrunimento e accumulo di 5-HMF, sono stati effettuati due batches di cottura da 50 L di mosto concentrato a 62 °Bx, impostando i seguenti parametri:

- 1) Temperatura massima 80°C, tempo 210 minuti
- 2) Temperatura massima 100°C, tempo 120 minuti

All'incirca ogni mezz'ora sono stati prelevati i campioni, su cui è stato determinato il colore tramite misura di assorbanza a 420 nm, e la concentrazione di 5-HMF con metodo strumentale in HPLC.

La figura 14 indica il decorso della temperatura nel tempo dei due batches. La temperatura di 80°C e 100°C viene raggiunta in 51 e 66 minuti, rispettivamente. A causa dell'inerzia termica della massa in riscaldamento, la temperatura massima effettiva raggiunta è superiore a quella impostata dalla sonda di temperatura, rispettivamente 91°C e 104°C.

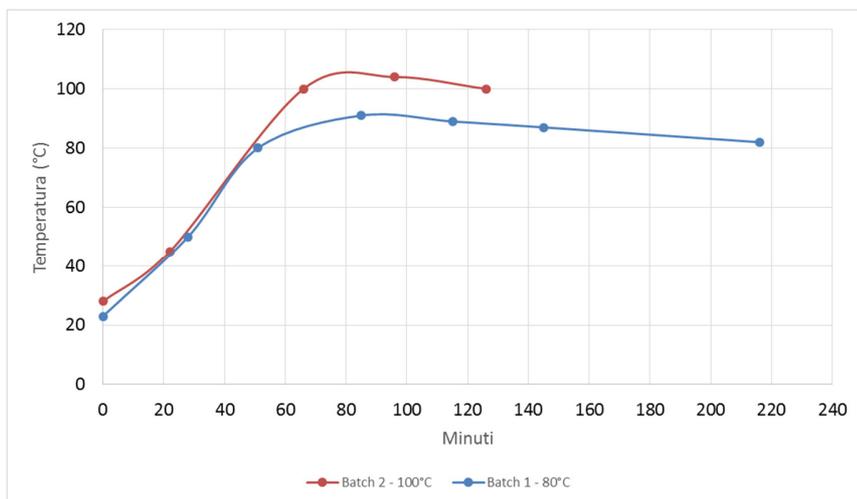


Figura 14 - Profilo di riscaldamento dei due batches di mosto concentrato

Le figure 15 e 16 mostrano il grado di imbrunimento e la concentrazione di 5-HMF nei due batches di cottura. L'incremento più accentuato dell'intensità di colore avviene quando la temperatura raggiunge i 100°C, ma al contempo anche l'aumento di 5-HMF diventa molto pronunciato. Nel batch a minor temperatura, sebbene protratto per un tempo quasi doppio rispetto a quello a maggior temperatura, il grado di imbrunimento risulta meno della metà, mentre l'accumulo di 5-HMF è pari a 1/3.

In entrambi i casi, si assiste ad un iniziale discoloramento dovuto probabilmente all'inattivazione degli enzimi polifenolossidasi, responsabili dell'imbrunimento enzimatico, seguito dall'incremento dell'intensità di colore per l'innescò dell'imbrunimento non-enzimatico.

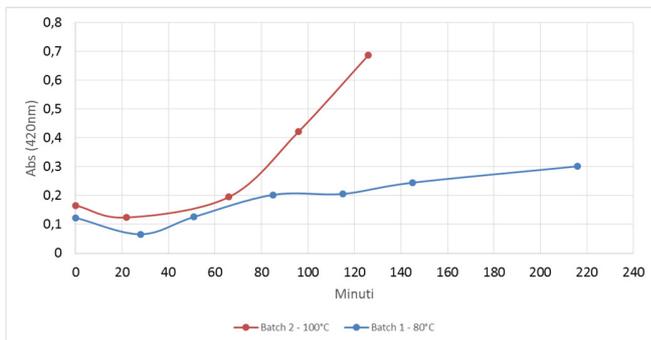


Figura 15 – Incremento dell'intensità di colore nei due batches di cottura

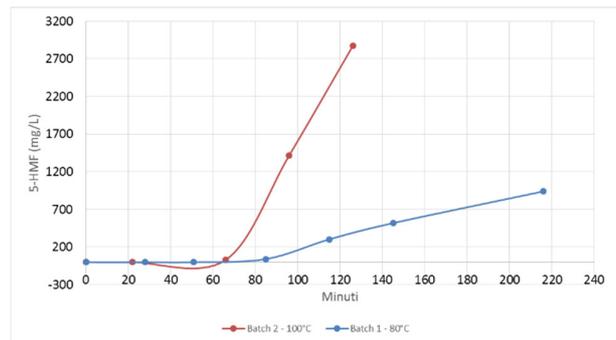


Figura 16 – Incremento della concentrazione di 5-HMF nei due batches di cottura

Evidentemente, la temperatura intorno ai 100°C è imprescindibile per l'innescare della reazione di degradazione degli zuccheri che produce sia 5-HMF che incremento dell'intensità di colore. Anche se, nel batch a minor temperatura, la produzione di 5-HMF è molto bassa, ciò non giustifica l'adozione di tali parametri per la cottura, in quanto: i) il grado di imbrunimento è troppo basso; ii) il tempo di cottura si protrae riducendo la produttività; iii) la concentrazione di 5-HMF nel batch ad alta temperatura non è eccessivo, considerando che il mosto cotto costituisce al massimo il 50% degli aceti finali, con conseguente dimezzamento e oltre della concentrazione di 5-HMF nei prodotti finiti.

La separazione dei processi di concentrazione e cottura risulta conveniente per vari motivi: favorisce la gestione dei flussi di materie prime; la cottura del mosto concentrato riduce sensibilmente i tempi aumentando la produttività e limita la perdita di sostanze volatili che avviene nei processi di cottura prolungati; l'accumulo di sostanze nocive risulta limitato.

Tutti i batches di cottura (alla data di fine progetto ammontano a 300 L) sono stati quindi effettuati per 2 ore impostando la temperatura a 100°C.

Fase 7. Miscelazione ingredienti e ottenimento substrati per la fermentazione alcolica S1, S2, S3, S4

Fase 8. Fermentazione alcolica substrati e ottenimento dei vini intermedi V1, V2, V3, V4

In origine il progetto prevedeva di ottenere i vini intermedi destinati alla fermentazione acetica della fase 9 in un processo a due fasi. Nella prima fase si miscelano gli ingredienti mosto fresco, mosto concentrato e mosto cotto in diverse percentuali per ottenere quattro diverse miscele di substrati; nella seconda fase si effettua la fermentazione alcolica dei substrati per ottenere i quattro diversi vini dolci intermedi da destinare alla fermentazione acetica.

Durante il progetto, abbiamo deciso di adottare una strategia alternativa che conduce agli stessi risultati ma migliora la sicurezza, la stabilità e la versatilità del processo produttivo. In particolare, invece di preparare in anticipo e stoccare i substrati alcolici-zuccherini Vx per alimentare i reattori della fermentazione acetica, sono stati miscelati i vini base della fase F5.9, il mosto concentrato della fase F6.4 e il mosto cotto della fase F6.6 “in situ” direttamente nei reattori di fermentazione acetica, adeguando le percentuali di miscelazione alle esigenze di ciascun prodotto finale. Tale approccio introduce notevoli vantaggi:

- i) non è necessario occupare quattro ulteriori contenitori per i quattro substrati della fermentazione acetica, in quanto le diverse miscele sono ottenute a partire dagli stessi ingredienti ma senza la premiscelazione iniziale;
- ii) lo stoccaggio prolungato dei vini dolci a basso contenuto di alcol avrebbe potuto dare problemi di stabilità microbiologica per attacco di microrganismi indesiderati, la stabilità dei singoli ingredienti (vini base e mosti) tenuti separati è invece superiore;
- iii) è possibile intervenire sulla composizione dei substrati di fermentazione acetica in qualsiasi momento, variando la percentuale di miscelazione che andrà a modificare lo stato del reattore interessato;
- iv) il punto iii consente di aumentare gradualmente la concentrazione zuccherina nei reattori, in modo da far adattare la coltura di batteri acetici ad una pressione osmotica crescente, individuando i limite accettabili di compromesso fra performance fermentativa e concentrazione zuccherina;
- v) gli aceti prodotti nei reattori possono essere utilizzati tal quali oppure ulteriormente miscelati con gli ingredienti iniziali per innalzare maggiormente la concentrazione zuccherina o ampliare la gamma dei prodotti ottenibili, come specificato nella fase 10.

La fase 7 si va quindi a sovrapporre alla fase 9, mentre la fermentazione alcolica della fase 8 non risulta più necessaria in quanto effettuata nella fase 5. Il processo produttivo modificato è riportato nella figura 17.

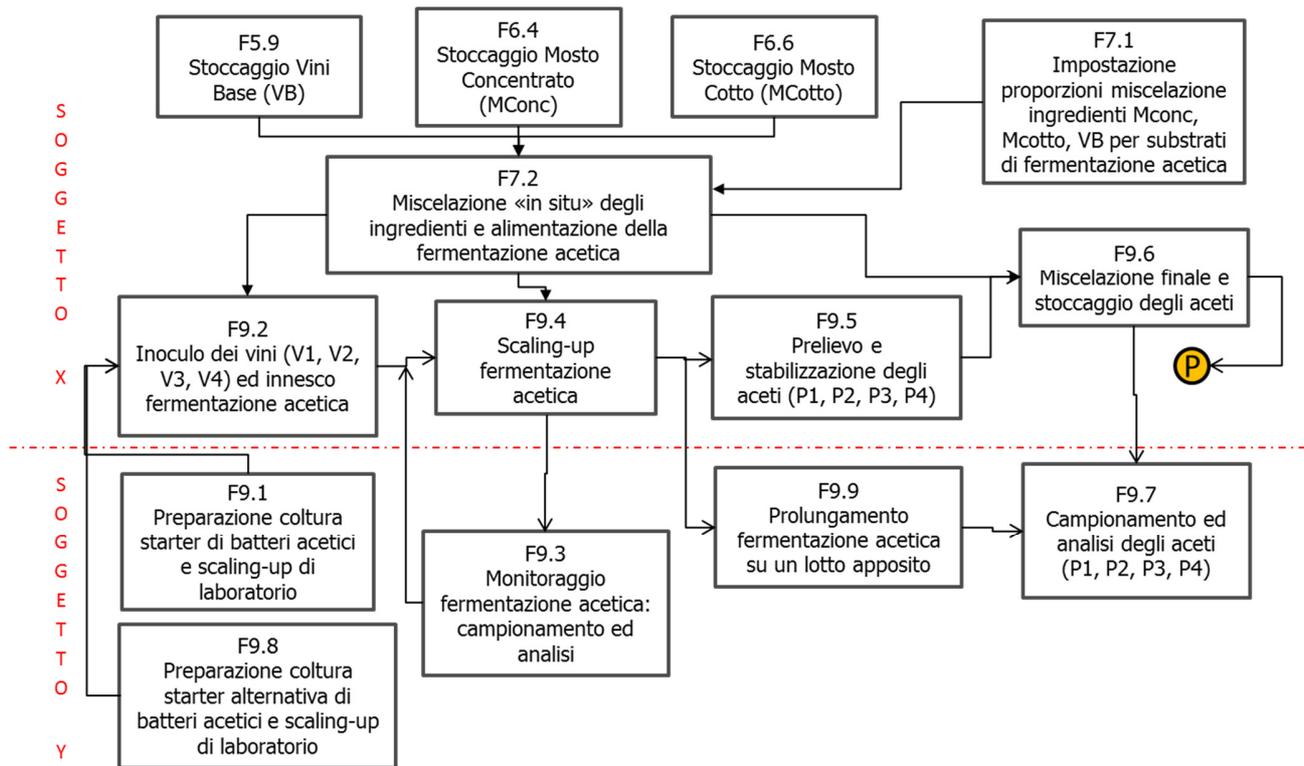


Figura 17 – Le fasi progettuali 7, 8 e 9 riunite in un unico schema progettuale modificato e migliorato

F7.1 impostazione delle proporzioni di miscelazione degli ingredienti

F7.2 Miscelazione “in situ” degli ingredienti per alimentare le fermentazioni acetiche

In base al contenuto zuccherino e all’acidità degli ingredienti mosto concentrato e mosto cotto; degli zuccheri residui, acidità e grado alcolico dei vini base, nonché delle proprietà richieste sui prodotti finali, si impostano le percentuali di miscelazione per l’alimentazione dei quattro reattori di fermentazione acetica, utilizzando un foglio di calcolo che indica i volumi degli ingredienti da aggiungere alle colture starter di batteri acetici per mantenere acidità, etanolo e zuccheri negli intervalli desiderati (allegato 1). In particolare, per mantenere vitali e attive le colture batteriche, il livello di etanolo deve essere mantenuto fra il 2 e il 5 % in volume, mentre l’acidità non deve scendere sotto il 2,5 % per mantenere il suo effetto conservante e proteggere i fermentati da contaminazioni microbiche.

La differenziazione adottata nei quattro prodotti della fermentazione acetica è illustrata nella tabella 11, dove è riportato il tipo di vino base e di mosto utilizzato per il mantenimento di ognuno dei quattro reattori termostatati a 27-28°C, nonché il livello di zuccheri target. Sono quindi in produzione continua due aceti dolci (uno con mosto cotto e uno con mosto concentrato) e due aceti secchi. Tali prodotti sono la base dell’intera produzione che può quindi differenziarsi in molti modi, sia dalla miscelazione degli aceti stessi,

sia per aggiunta di ulteriore mosto fresco, mosto concentrato e mosto cotto. I prodotti attualmente stoccati sono descritti nella fase F9.6.

Reattore	Vino Base	Tipo di Mosto	Zuccheri target (%vol)
1A	21T2 (in rosso)	Mosto cotto	30
2A	21T2 (in rosso)	-	-
3A	21T2 (in rosso)	Mosto concentrato	30
4A	21T2 (in bianco)	-	-

Tabella 11 - Ingredienti utilizzati per alimentare i quattro reattori termostatati per la fermentazione acetica

Quattro ulteriori reattori di fermentazione acetica, denominati 1B, 2B, 3B, 4B sono mantenuti a temperatura ambiente e sono oggetto di ulteriori test non direttamente previsti dal progetto ma molto utili per il mantenimento di una scorta di colture starter, nonché per studiare l'andamento delle fermentazioni in diverse condizioni.

Fase 9. Fermentazione acetica vini e ottenimento prodotti

In questo capitolo vengono illustrate le procedure di preparazione delle colture starter di batteri acetici usate nel progetto, il loro utilizzo nella cantina sperimentale e il monitoraggio effettuato, l'ottenimento degli aceti di base e il loro utilizzo come prodotto finito o in miscelazione ad altri ingredienti.

F9.1 Preparazione della coltura starter di batteri acetici e scaling-up in scala di laboratorio

In totale sono state preparate quattro colture starter, una per ogni reattore di fermentazione presente nella cantina sperimentale.

La scelta del ceppo di batteri acetici è stata condotta mediante screening di 34 ceppi presenti all'interno della collezione microbica UMCC del Dipartimento di Scienze della Vita (Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia). Una copia di ogni coltura è stata prelevata da condizioni di conservazione a -80°C e reidratata in terreno liquido GYC (glucosio 10%, estratto di lievito 1%). È stata valutata la modalità di sviluppo, il consumo di carbonato di calcio ed i giorni di incubazione (aerobiosi/ 28°C) richiesti per lo sviluppo. Tutti i ceppi sono stati testati per la produzione di cellulosa. Sono state allestite micro prove di acetificazione in vino sterile all'8.5% (vol/vol) di etanolo.

Sulla base dei risultati riscontrati è stato scelto il ceppo UMCC 1754 (AB0220/DSMZ 25273) appartenente alla specie *Acetobacter pasteurianus*, le cui caratteristiche sono riportate in tabella 12.

Caratteristica	UMCC1754
Forma	rod
Reazione di gram	-
Reazione KOH	+
Reazione catalasi	+
Pigmenti solubili	-
Produzione acido acetico	+
Ossidazione acido acetico a CO_2 e H_2O	+
Produzione di cellulosa	-
Crescita in D-glucosio (%)	
20	+
25	+

Tabella 12 - Caratteristiche fenotipiche ceppo AB0220

Per l'allestimento della coltura starter in sistema statico superficiale, utilizzata nel reattore 3A, un'aliquota di coltura del ceppo è stata coltivata in 5 ml di terreno liquido GYC e dopo sviluppo trasferita in beuta da 100 ml, contenente 50 ml dello stesso terreno (figure 18 e 19).



Figure 18 e 19 - Fasi di preparazione della coltura starter in sistema statico

Lo scaling-up è stato effettuato in beute partendo da un volume di 50 ml ed eseguendo aggiunte di vino filtrato (etanolo 8.5% (vol/vol; acidità titolabile 0.36 (wt/wt)) in modo tale da mantenere i parametri nel range 1,5 - 2% (vol/vol) di etanolo e 2.5-3.0 % (w/v) di acidità titolabile. Mediante questa procedura è stato ottenuto un volume finale di 10 litri (etanolo 2% (vol/vol); acidità titolabile 7.5% (wt/wt)) che è stato trasferito per l'implementazione della fermentazione acetica nel sistema prototipale della cantina.

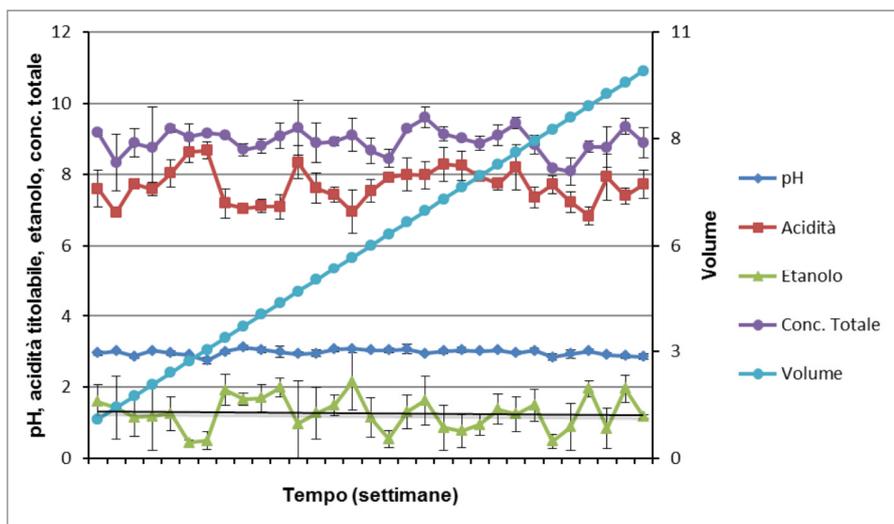


Figure 20 - Scaling-up in sistema statico della coltura starter AB0220. I dati sono medie di 3 valori e la barra di errore indica la deviazione standard. Unità di misura: Acidità titolabile (g/100ml), Etanolo (%v/v), Volume (L).

La seconda coltura starter in sistema sommerso, utilizzata nei reattori 2A e 4A, è stata preparata a partire dalla coltura ottenuta in sistema statico, come descritto precedentemente, e trasferita in fermentatore pilota CETOTEC dalla capacità pari a 7 litri (figura 21). Lo scaling-up è stato effettuato utilizzando il metodo di fermentazione in sommerso denominato semi-batch. La fase di avviamento (start-up) della fermentazione acetica è stata condotta utilizzando una miscela composta da:

- a. 1/3 coltura starter;
- b. 2/3 vino filtrato sterile.



Figura 21 - Fermentatore pilota CETOTEC® impiegato per la preparazione della coltura starter in sistema sommerso

La fase di avviamento ha avuto durata di 2 settimane (figura 22). La fase di fermentazione acetica (figura 23) è stata condotta come descritto di seguito. All'inizio di ogni ciclo fermentativo la concentrazione di etanolo è stata portata nel range 4,5 – 5,5% (vol/vol), mentre quella dell'acido acetico a 3,5 – 4,5%(wt/wt); la concentrazione totale (somma della concentrazione di etanolo e della concentrazione di acido acetico) è stata mantenuta costante durante ogni ciclo. Ogni ciclo fermentativo è stato concluso a valori di etanolo prossimi all'1% (vol/vol) ed acido acetico 8% (wt/wt) ed è stato prelevato 1/3 del volume totale. La temperatura è stata

mantenuta costante (30°C) per tutta la durata del processo. In fase di avviamento la somministrazione di aria è stata regolata manualmente mantenendo il volume d'aria pari al 50% del valore massimo, invece in fase di fermentazione è stato aumentato all'80%.

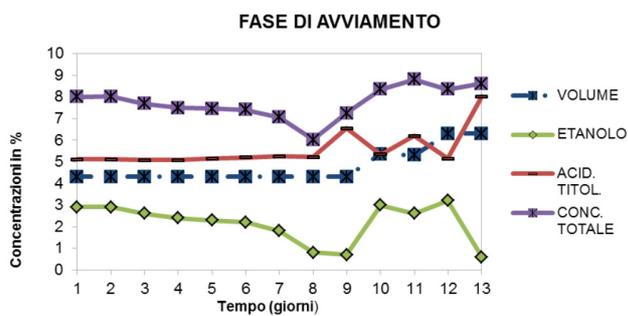


Figura 22 - Avviamento della fermentazione in sistema sommerso

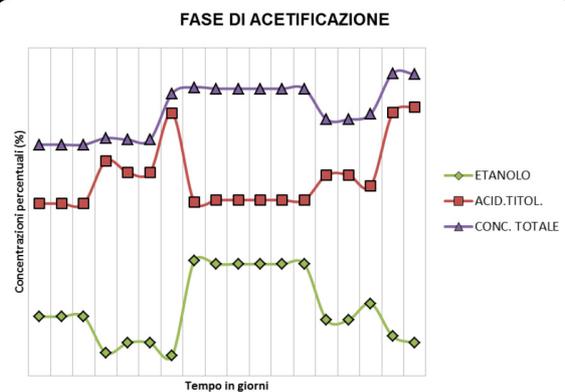


Figura 23 - Fase di acetificazione in sistema sommerso

La preparazione della terza coltura starter ad alta concentrazione di zuccheri (20% e 30%), utilizzata nel reattore 1A, è stata preparata con la stessa metodica di quella precedente ma impiegando una miscela di vino e mosto cotto come substrato di acetificazione.

Per lo scaling-up sono stati necessari 28 cicli fermentativi per ottenere circa 40 L di coltura starter.

A differenza delle colture precedenti, non è stato utilizzato vino filtrato come substrato di ossidazione, ma una miscela composta da vino 21T2 (non microfiltrato) e mosto cotto concentrato, entrambi prodotti nella cantina sperimentale. La miscela è stata opportunamente preparata in modo da mantenere la concentrazione zuccherina nel range 20-30%. Gli zuccheri riduttori sono stati determinati regolarmente ad intervalli di 15 giorni (tabella 13).

Tempo (giorni)	Zuccheri riducenti (g/100mL)
1	24,16±0,22
17	24,5±0,23
31	22,41±0,21
47	22,71±0,19
63	25,34±0,25
77	25,77±0,23
94	22,4±0,2
107	25,7±0,24
121	27,86±0,3

Tabella 13 - Zuccheri riducenti durante la fermentazione in sommerso in presenza di zuccheri. I dati si riferiscono alla media di 3 valori

Mediante l'impiego della coltura starter sopra descritta è stato possibile sviluppare sia la fermentazione acetica in presenza di solo etanolo che la fermentazione acetica in presenza di etanolo e zuccheri. Questo aspetto è di particolare interesse applicativo per l'impiego di colture starter per la produzione di aceti differenti nelle caratteristiche chimico-fisiche. Altro aspetto di particolare importanza è legato al fatto che non ci sono esperienze precedenti sia in scala di laboratorio che in scala industriale di conduzione della fermentazione acetica in sistema sommerso in presenza di zuccheri. La diversa durata dei singoli cicli di fermentazione e il maggior tempo necessario per l'ottenimento di adeguati volumi di coltura in presenza di zuccheri, rispetto alla fermentazione in presenza di solo etanolo, è dovuta all'effetto dell'alta quantità di solidi solubili presenti.

F9.2 Innesco della fermentazione acetica dei substrati Vx

F9.3 Monitoraggio delle fermentazioni acetiche

F9.4 Aumento del volume dei substrati in fermentazione (scaling-up)

Per l'avvio delle fermentazioni acetiche nella cantina sperimentale, le colture starter preparate nella fase F9.1 sono state trasferite in ognuno dei quattro reattori di fermentazione ed alimentate con gli ingredienti e nelle modalità descritti nella fase F7.2. Le aggiunte degli ingredienti (vino base + mosto concentrato o cotto) sono state effettuate in quantità proporzionali al volume corrente in fermentazione, stando a attenti

a mantenere i livelli di acidità, etanolo e zuccheri riducenti richiesti. Una volta raggiunto il volume massimo del reattore (circa 220 L), si provvede al parziale scarico e stoccaggio dell'aceto base prima di effettuare nuove aggiunte di substrato. Nelle figure dalla 24 alla 31 sono riportati gli andamenti dei volume dei reattori in fermentazione e dei loro parametri di riferimento (acidità, alcol e zuccheri). Tutti i dati analitici sono stati raccolti in un sistema di archiviazione online condiviso (Google Drive) fra i partner del progetto.

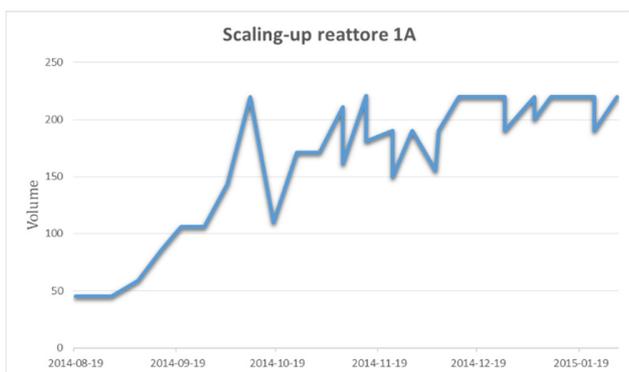


Figura 24 – Scaling-up e mantenimento della fermentazione acetica del reattore 1A

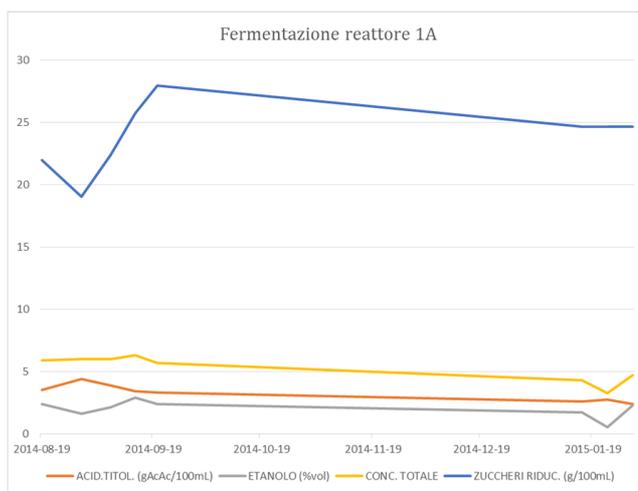


Figura 25 – Andamento dei parametri di monitoraggio del reattore di fermentazione 1A

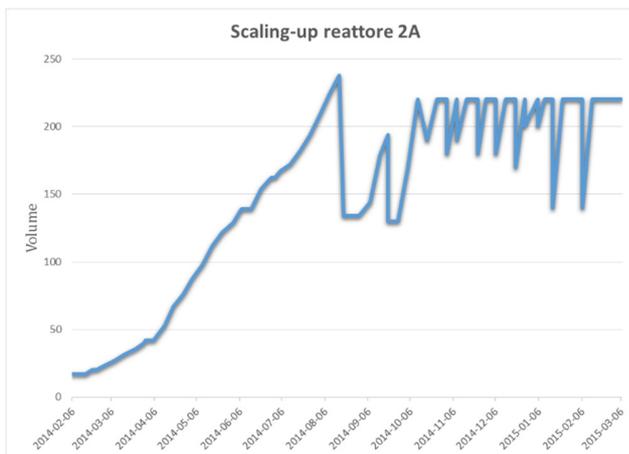


Figura 26 – Scaling-up e mantenimento della fermentazione acetica del reattore 2A

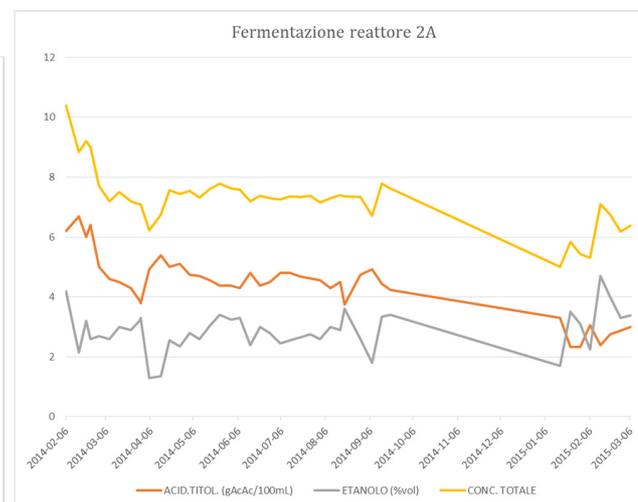


Figura 27 – Andamento dei parametri di monitoraggio del reattore di fermentazione 2A

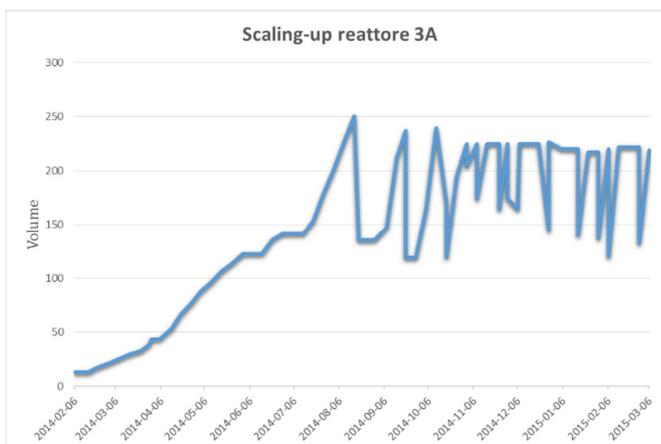


Figura 28 - Scaling-up e mantenimento della fermentazione acetica del reattore 3A

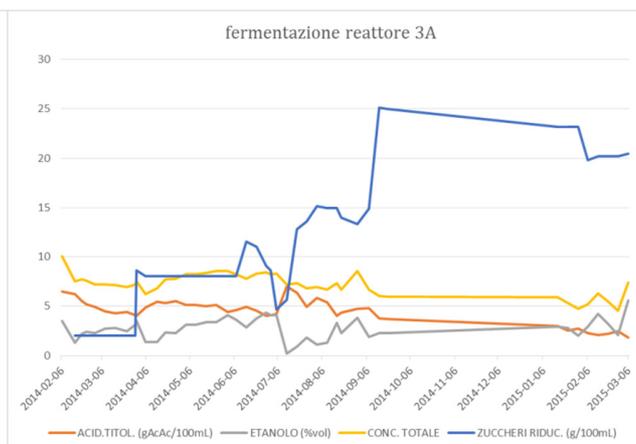


Figura 29 - Andamento dei parametri di monitoraggio del reattore di fermentazione 3A

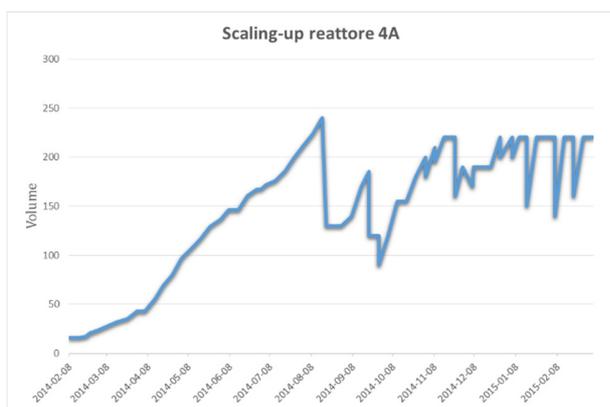


Figura 30 - Scaling-up e mantenimento della fermentazione acetica del reattore 3A

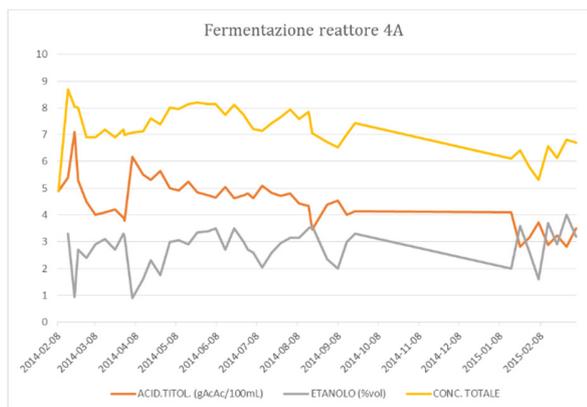


Figura 31 - Andamento dei parametri di monitoraggio del reattore di fermentazione 3A

La produttività dei reattori in termini di aceto base prodotto e valutata dal primo scarico effettuato in corrispondenza del raggiungimento del volume massimo del reattore si assesta su valori buoni per il tipo di fermentazione effettuata. Normalmente infatti, la fermentazione in sistema statico è molto lenta ma, attraverso il monitoraggio e l'alimentazione continua, nonché le favorevoli condizioni di temperatura e aerazione imposte dal sistema prototipo, si sono ottenute produttività medie di 110, 105, 170 e 100 L/mese per i reattori 1A, 2A, 3A e 4A, rispettivamente.

Nel caso del reattore 1A, l'adattamento della coltura alla presenza di zuccheri da mosto cotto è avvenuta direttamente in fase di preparazione della coltura starter in laboratorio, mentre per il reattore 3A l'adattamento agli zuccheri da mosto concentrato è avvenuto direttamente in cantina, mediante incrementi progressivi della concentrazione, come si vede dalla figura 29.

La vitalità delle colture acetiche nei reattori è ben visibile dallo sviluppo del velo superficiale, dove avviene l'ossidazione ad opera dei batteri acetici (figura 32). La produzione di cellulosa, elemento indesiderato nella

produzione di aceto, si è rivelata assente o molto limitata, confermando le ottime caratteristiche del ceppo di batteri acetici selezionato.

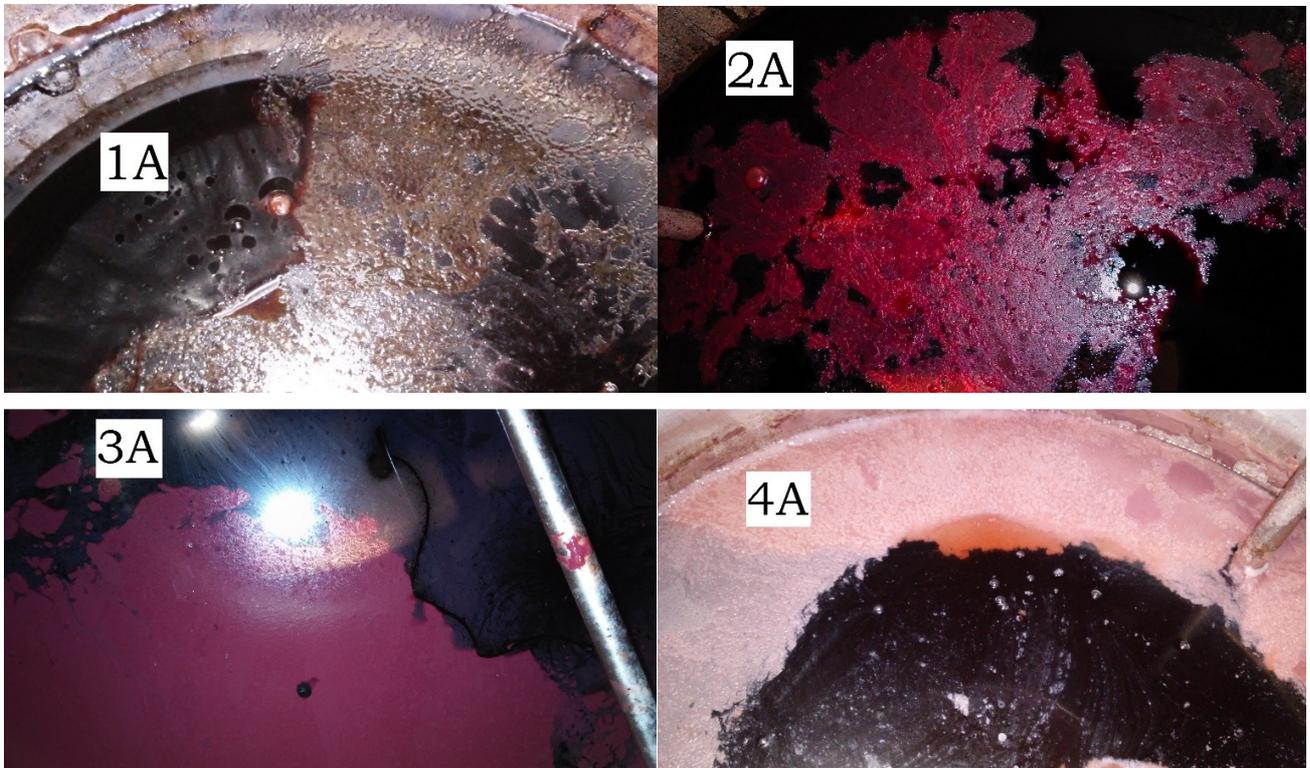


Figura 32 – Sviluppo dei veli superficiali nei reattori di fermentazione

Test di persistenza dei ceppi inoculati

Il mantenimento in buone condizioni delle colture presenti nei reattori di fermentazione è un risultato molto importante e non scontato, in quanto i sistemi microbiologici sono facilmente suscettibili di modificazioni, contaminazioni e cali di attività.

Per verificare che le specie batteriche presenti nei reattori siano le stesse di quelle preparate in laboratorio, dopo un periodo relativamente lungo (qualche mese), è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico da campioni provenienti dai quattro reattori della cantina sperimentale e l'analisi molecolare mediante amplificazione degli elementi REP (GTG)⁵.

L'estrazione del DNA genomico è stata condotta mediante lisi enzimatica. I ceppi sono stati coltivati in terreno liquido GYC per 3-5 giorni a 28°C e le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione (12000g per 5 min). Il DNA genomico è stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio. Dall'analisi molecolare mediante amplificazione degli elementi REP (GTG)⁵ sono stati ottenuti i profili elettroforetici complessi per tutti i campioni (figura 33).

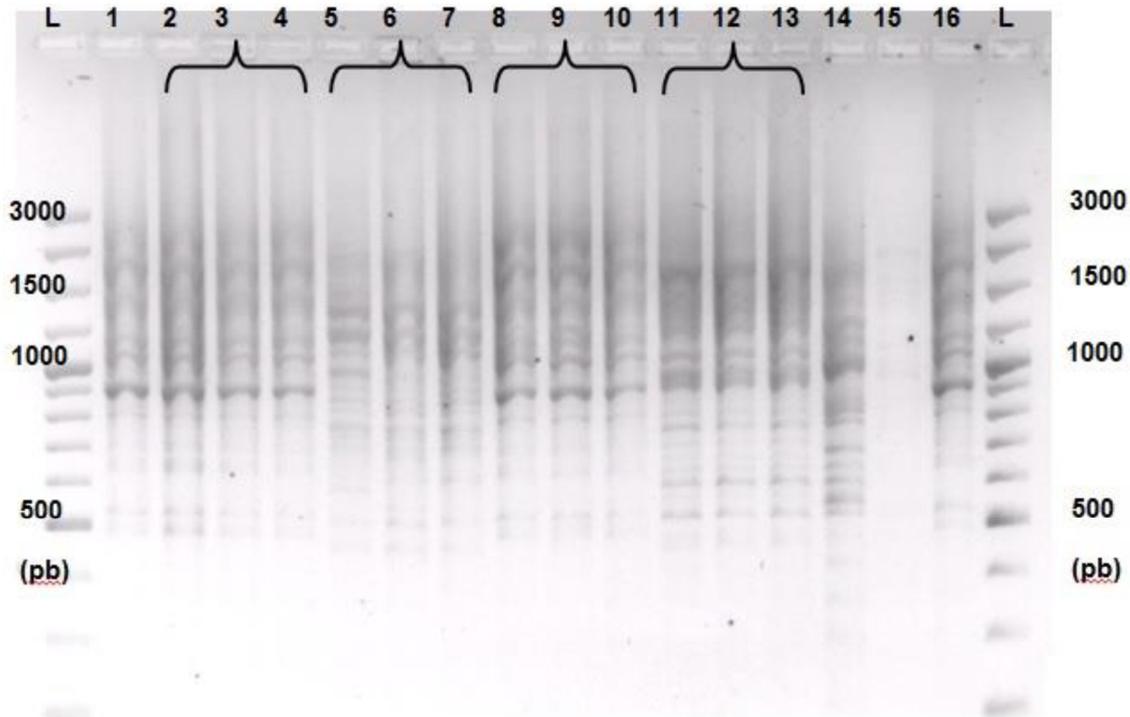


Figura 33 - Pattern elettroforetico analisi GTG⁵.

L. 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA).

1. AB0220 (coltura in purezza); 2, 3 e 4. (campione 4 A in triplo); 5, 6 e 7. (campione 3 A in triplo); 8, 9 e 10. (campione 2 A in triplo); 11, 12 e 13. (campione 1 A in triplo); 14. AB0220; 15. Controllo negativo; 16. aDSMZ 11825T (*A. pomorum*)

La semina eseguita in terreno GYC di aliquote dei campioni ha messo in evidenza sviluppo in tutte le piastre e consumo di carbonato di calcio come indicato da aloni di chiarificazione del terreno. L'osservazione al microscopio ottico (100x) ha evidenziato presenza di cellule di forma a bastoncino. La quantità di DNA estratto, è stata misurata mediante misura spettrofotometrica ed i valori del rapporto A260/280 ha messo in evidenza un buon indice di purezza del DNA da tutti i campioni.

Il profilo di migrazione del ceppo UMCC 1754, il cui DNA è stato estratto da una coltura generata da coltivazione in purezza, è stato confrontato con i profili di migrazione ottenuti amplificando il DNA genomico dei campioni provenienti dai reattori. La grandezza degli ampliconi ottenuti è stata compresa tra 3000 e 200 paia di basi. I profili relativi ai campioni 4A, 2A e 1A sono risultati comparabili a quello ottenuto per il ceppo in purezza. Il profilo ottenuto dal campione 3A è risultato complesso, con pattern di migrazione composto da un maggiore numero di bande e differente dagli altri profili, indicando la copresenza di DNA proveniente da cellule batteriche differenti dallo starter.

Infatti, il DNA sul quale è stata testata la stabilità è stato estratto dopo arricchimento in piastra recuperando parte della coltura sviluppata e non è stata prelevata una singola colonia. Questa procedura è stata adottata per verificare un eventuale contaminazione della coltura starter. Visto che i campioni provengono da un periodo totale di scaling-up e acetificazione molto lungo, è probabile che ci possa essere stata contaminazione proveniente dagli ambienti aziendali. Tale eventuale contaminazione tuttavia, non ha interferito con il processo di fermentazione poiché sono stati ottenuti i valori di acidità titolabile e degli altri parametri chimici desiderati.

F9.5 Prelievo degli aceti dai reattori di fermentazione e loro stabilizzazione

F9.6 Stoccaggio degli aceti prodotti

La produzione di aceto nei reattori di fermentazione è un processo in semi-batch, nel senso che si tratta di un sistema continuo ma oscillante. In particolare, la concentrazione di acido acetico aumenta a scapito del consumo di etanolo; quando la concentrazione di etanolo raggiunge il 2% circa, nuovo substrato alcolico viene aggiunto fino a riportarne la concentrazione al 5% circa. Questo provoca ulteriore produzione di acido acetico e conseguente riduzione di etanolo, in un processo che si ripete continuamente. Per questo motivo, l'aceto che viene via via rimosso dal reattore ha ancora una quantità considerevole di etanolo da convertire in acido acetico, per cui è necessario stoccare temporaneamente il prodotto e attendere la fine dell'ossidazione dell'etanolo prima di stabilizzare l'aceto tramite filtrazione.

L'aceto prelevato dai reattori è quindi stato trasferito in contenitori di acciaio e barriques di rovere rigenerati. Quando l'etanolo residuo è sceso a meno dell'1%, gli aceti sono stati filtrati tramite doppio housing a campana e cartucce filtranti a porosità 5 µm, per poi essere stoccati in barriques. Alla data di fine progetto sono stati prodotti 200 L di 1A, 500 L di 2A, 600 L di 3A, 450L di 4A, 300 L di 2B, 300 L di 3B, 350 L di 4B.

Oltre ai quattro aceti prodotti direttamente dai reattori di fermentazione, sono stati preparati finora tre ulteriori prodotti, ottenuti dalla miscelazione degli aceti base con altri ingredienti, come riportato nella tabella 14. Tali prodotti sono stati stoccati in 7 caratelli da 50 L ciascuno.

Infine, come opzione accessoria per valutare l'effetto di un'acidità molto elevata sulle caratteristiche sensoriali, un lotto di 100 L di aceto 1A è stato sottoposto a crioconzentrazione.

Per una caratterizzazione organolettica e definirne le potenzialità di utilizzo sono state fatte ulteriori due sedute del panel di assaggiatori presso la camera di Commercio di Arezzo il 13/11/2014 ed il 10/02/2015 da cui sono emerse indicazioni specifiche sulle tipologie di aceto prodotte, oltre che apprezzamenti sui livelli qualitativi e di innovazione che in particolare alcune tipologie di aceto presentano.

Prodotto	Origine	Ingredienti	Caratteristiche e finalità d'uso
1A	Fermentatore	-	Aceto semidolce dagli aromi di cotto, similibalsamico e bassa acidità. Colore ambrato scuro tendente al marrone. Adatto a riduzioni e cotture di carni e brasati o condimento.
2A	Fermentatore	-	Aceto secco da vinificazione in rosso, spiccata acidità fissa e volatile, colore rosso acceso. Adatto come condimento per insalate e verdure.
3A	Fermentatore	-	Aceto semidolce, fresco e moderatamente acido, dal colore rosso rubino vivace. Buona acidità e discreto equilibrio. Adatto come condimento per verdure, pinzimonio, tartare, carpacci e macedonie.
4A	Fermentatore	-	Aceto secco da vinificazione in bianco, fresco ma dal sapore deciso, di colore rosa tenue. Consigliato per condire insalate, insalate di mare e pesce alla griglia.
S1	Miscelazione	Aceto 3A – 60% Mosto cotto – 40%	Aceto agrodolce e relativamente corposo, simile ai prodotti balsamici. Persistente. Colore ambrato scuro. Adatto a formaggi erborinati, stagionati e Parmigiano reggiano. Perfetto sulle fragole e fois grois.
S2	Miscelazione	Aceto 3A – 50% Mosto cotto – 50%	Aceto molto dolce, a maggior contenuto di zuccheri rispetto all'S1 e minore acidità. Lunga persistenza e perfetto equilibrio tra dolcezza e acidità. Colore ambrato. Apprezzato su carni e piatti a più alto tenore di grassi, utilizzandolo sia come aggiunta a fine cottura, sia come ingrediente per la preparazione di fondi di cottura per la selvaggina e animali da cortile. Creme e frutta.
S3	Miscelazione	Aceto 4A – 60% Mosto cotto – 20% Mosto conc. – 20%	Aceto dolce con note fruttate dovute all'impiego di mosto fresco concentrato. Buona acidità. Color miele tendente all'ambrato. Adatto a fragole, macedonie e gelato gusto crema.

Tabella 14 – La gamma di aceti sinora prodotti nell'ambito del progetto Acetoscana

Alla luce delle valutazioni e considerazioni fatte e dei primi riscontri effettuati, la scelta di andare verso una tipologia produttiva che trovi una sua identificazione specifica e sia una evoluzione di quanto viene fatto in materia di aceti balsamici sembra dare dei primi risultati oltremodo positivi. Dai risultati ottenuti è possibile puntare sullo sviluppo di alcune tipologie di aceto con caratteristiche simil-balsamiche assolutamente innovativi, che mantengono l'idiotipo e il riferimento ai prodotti dell'enologia toscana, andando ad ampliarne la gamma, come peraltro era previsto tra gli obiettivi del progetto. La gamma di aceti prodotti è stata presentata ai convegni organizzati nel progetto (vedi fase 11) e sono in programma numerose partecipazioni a fiere ed eventi del settore della ristorazione. La varietà degli aceti prodotti e degli ingredienti eventualmente miscelati consentirà di correggere e modificare l'attuale produzione in base alle preferenze riscontrate durante le attività di divulgazione e di presentazione ai consumatori.

F9.7 Analisi degli aceti prodotti

Nella tabella 15 sono riportati i risultati delle analisi effettuate sugli aceti prodotti, riguardo al contenuto in zuccheri, acidi organici ed altri composti secondari.

Componente/Prodotto	1A	2A	3A	4A	S1	S2	S3
Glucosio (g/100mL)	10.3	3.2	11.1	3.0	21.5	23.7	13.9
Fruttosio (g/100mL)	12.5	3.9	12.7	3.9	24.0	27.8	18.0
Etanolo (%vol)	0.86	0.91	0.86	0.91	0.74	0.77	0.77
Glicerolo (g/L)	6.1	7.8	6.3	7.9	4.5	4.2	5.1
Ac. Citrico (g/L)	0.38	0.49	0.36	0.51	0.55	0.54	0.54
Ac. Tartarico (g/L)	1.44	1.48	1.43	1.50	1.56	1.56	1.60
Ac. Malico (g/L)	10.2	5.2	12.6	7.1	21.2	22.8	20.9
Ac. Succinico (g/L)	0.77	0.35	0.80	0.38	0.29	0.28	0.28
Ac. Lattico (g/L)	0.24	0.33	0.23	0.32	0.18	0.15	0.17
Ac. Acetico (g/100mL)	3.92	5.94	4.66	4.95	2.88	2.38	2.74
Ac. Titolabile (gAcAc/100mL)	5.7	6.9	6.0	6.8	5.2	5.0	5.2
Ac. Fissa (gAcAc/100mL)	1.3	0.9	1.2	0.8	2.3	2.5	2.3

Tabella 15 – Composizione degli aceti prodotti e attualmente in stoccaggio

Si conferma una leggera prevalenza di fruttosio rispetto al glucosio nel residuo zuccherino, ma soprattutto l'elevato contenuto di acidi organici diversi dall'acido acetico, che contribuiscono all'acidità fissa dei prodotti finali conferendo aromi e sensazioni di acidità non solo pungente ma molto più complessa e gradevole. L'acidità titolabile non ha raggiunto valori molto elevati, che avrebbe favorito il processo di miscelazione finale per ottenere maggior concentrazione di zuccheri e ancora più elevata acidità fissa. Questo perché la resa del processo di trasformazione microbiologica che porta dall'etanolo all'acido acetico non è risultata ottimale, molto probabilmente a causa dell'eccessiva aerazione del reattore che, abbinata al riscaldamento, provoca eccessivo strippaggio di etanolo e/o di acido acetico. Anche se i risultati raggiunti sono comunque sufficienti ai fini del progetto, sono in corso delle prove di controllo forzato dell'aerazione e riduzione della temperatura per ridurre le perdite.

F9.8 - F9.9 Preparazione di un ulteriore coltura starter per la fermentazione acetica capace di formare acido gluconico

In questa fase è stato valutato l'andamento dei principali parametri analitici durante un processo di acetificazione in sistema statico, condotto con una coltura indigena di batteri acetici, al fine di valutare la capacità di convertire parte del glucosio in acido gluconico.

L'acido gluconico è un acido organico impiegato, oltre che in campo alimentare, anche in campo medico, tessile ed edile. Può essere prodotto mediante fermentazione in sommerso impiegando funghi o batteri. Tra i batteri acetici, *G. oxydans*, grazie alla capacità di ossidazione diretta di glucosio in glucono- δ -lattone, che è ossidato in acido gluconico, è sfruttato industrialmente per la produzione di acido gluconico mediante fermentazione in sommerso.

A sostegno della produzione di acido gluconico a fini alimentari vi sono alcuni studi che mostrano potenziali azioni benefiche sulla salute dell'uomo. L'acido gluconico è scarsamente assorbito nell'intestino tenue; di seguito raggiunge l'intestino crasso, dove è fermentato dalla microflora intestinale principalmente ad acido butirrico. Quindi l'ingestione di acido gluconico avrebbe una duplice azione salutistica: supporta la microflora intestinale ed indirettamente stimola la crescita epiteliale nell'intestino crasso dell'uomo, poiché è convertito in acido butirrico, il quale è la principale fonte di energia per le cellule epiteliali.

Nel succo d'uva, ceppi appartenenti a specie di *Gluconobacter* sono stati descritti come alto produttori di acido gluconico, con una capacità di trasformazione del glucosio dal 41 al 100%, ed una quantità di acido gluconico prodotta superiore a 100 g/l; mentre è stata altresì osservata una bassa o nulla attività di conversione del fruttosio. Pertanto un'ulteriore prospettiva di impiego a fini salutistici risiede nella possibilità di produrre acido gluconico mantenendo quasi inalterato il contenuto in fruttosio e riducendo drasticamente quello di glucosio.

Il metodo adottato prevede che una coltura indigena di batteri acetici (800 mL) in fase di acetificazione sia addizionata di mosto d'uva cotto (250 mL) ed incubata alla temperatura di 25°C in condizioni di aerobiosi. Successivamente la coltura è stata suddivisa in tre beute ed aliquote di mosto cotto sono state aggiunte gradualmente, in accordo ai valori riscontrati di acidità titolabile ed etanolo. Raggiunto il volume desiderato (6 litri), la coltura è stata miscelata e ripartita in tre beute, alle condizioni precedentemente riportate e sottoposte alle analisi chimiche ad intervalli di tempo regolari (tabella 16).

	T=0 (miscela)	T=1 (7giorni)	T=3 (21giorni)	T=4 (28giorni)	T=6 (42giorni)	T=12 (84giorni)	T=15 (105giorni)
^a Acidità titolabile	39.00±1.18	40.17 ± 2.72	74.57 ± 2.06	82.63 ± 0.83	81.80 ± 3.20	85.86 ± 1.28	85.55 ± 3.85
^b Acidità titolabile	643.56 ± 10.10	668.94 ± 45.30	1241.80 ± 34.30	1376.02 ± 13.82	1362.20 ± 53.29	1429.81 ± 21.32	1424.65 ± 64.11
pH	3.35 ± 0.01	3.25 ± 0.06	3.02 ± 0.02	3.02 ± 0.02	3.02 ± 0.06	3.07 ± 0.01	3.10 ± 0.01
Brix	17.20 ± 0.01	17.20 ± 0.10	17.20 ± 0.08	17.18 ± 0.08	17.25 ± 0.43	18.00 ± 0	19.67 ± 0.14
Etanolo	850.66±20.10	791.75 ± 35.55	137.07 ± 36.75	2.03 ± 0.35	0.65 ± 0.08	ND	ND
Acido acetico	506.00 ± 16.14	567.20 ± 33.10	1113.34 ± 19.28	1262.14 ± 38.85	1305.01± 54.68	1225.17 ± 70.33	1027.00 ± 49.57
Acido gluconico	15.85 ± 0.40	16.50 ± 0.38	35.69 ± 1.19	53.68 ± 2.09	53.90 ± 2.69	54.64 ± 0.41	55.50 ± 1.75
Glicerolo	74.36 ± 2.6	78.80 ± 4.61	74.37 ± 3.75	74.42 ± 4.75	69.29 ± 2.44	69.46 ± 1.25	69.46 ± 1.79
Glucosio	264.11 ± 4.99	277.00 ± 5.01	266.26 ± 14.80	251.29 ± 17.40	227.22 ± 23.66	223.42 ± 6.71	228.61 ± 0.68

Fruttosio	406.83 ± 6.80	423.79 ± 7.62	445.83 ± 5.42	471.77 ± 34.56	433.51 ± 45.53	426.61 ± 9.91	437.60 ± 2.98
Acido citrico	2.46 ± 0.08	2.47 ± 0.11	1.71 ± 0.32	1.68 ± 0.13	1.57 ± 0.11	1.22 ± 0.10	1.44 ± 0.07
Acido succinico	3.08 ± 0.04	3.51 ± 0.18	3.54 ± 0.06	3.53 ± 0.29	3.69 ± 0.05	3.59 ± 0.25	3.60 ± 0.11
Acido malico	43.45 ± 1.20	41.67 ± 1.57	39.26 ± 0.71	40.92 ± 2.40	38.60 ± 1.67	40.20 ± 1.47	37.06 ± 4.06
Acido D-lattico	3.95 ± 0.02	3.97 ± 0.04	1.96 ± 0.02	1.74 ± 0.16	1.63 ± 0.04	1.90 ± 0.05	1.88 ± 0.07
Acido L-lattico	3.19 ± 0.01	3.28 ± 0.06	1.82 ± 0.04	1.67 ± 0.07	1.80 ± 0.08	2.10 ± 0.06	2.26 ± 0.23

Tabella 16 -Determinazioni analitiche e valori di diversi composti (mmol/L) normalizzati al fattore di concentrazione

^aacidità titolabile espressa in g/L. ^bAcidità titolabile espressa in mmol/L acido acetico

Consumo di etanolo e produzione di acido acetico

Come riportato in figura 34 è stato osservato un aumento di acidità titolabile con un picco tra T1 ed T3 corrispondente al maggior decremento in etanolo (i due parametri sono inversamente correlati: $r = -0.99646$; $p < 0.0001$).

Contemporaneamente al consumo di etanolo si è osservata la maggior formazione di acido acetico. Da T0 a T6 l'etanolo è diminuito di 850,01 mmol/L e nello stesso range l'acido acetico è aumentato di 799,01 mmol/l. Il calo di acido acetico osservato da T6 a T15 (278,01mmol/L) è statisticamente significativo ($p < 0,05$) e può essere correlato al fenomeno della surossidazione, caratteristico dei batteri acetici in presenza di alte quantità di ossigeno ed assenza di etanolo come fonte di carbonio. In queste condizioni infatti, l'acido acetico formatosi viene ossidato a livello citoplasmatico.

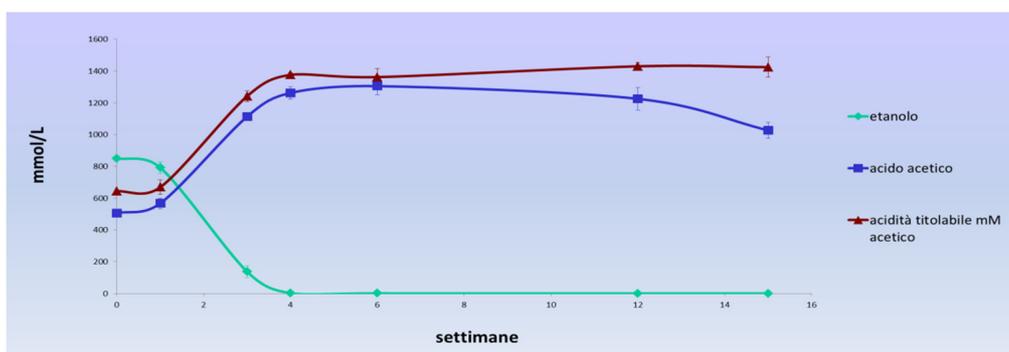


Figura 34 - Andamento nel tempo della concentrazione di etanolo, acido acetico e acidità titolabile espressa come mmol/L di acido acetico

Acidi organici

Per quanto riguarda gli altri acidi organici, l'acido D-lattico è quello che ha subito la maggiore variazione, diminuendo significativamente a partire da T3 fino a T15. Questo acido organico viene in parte metabolizzato a piruvato dai batteri acetici.

Tutti gli altri acidi organici, compreso il malico, hanno subito un leggero calo che spesso è significativo solo tra T0 e T15. Il basso utilizzo degli acidi organici da parte dei batteri acetici è pressoché insignificante, considerato anche la lunga durata della prova (105 giorni); la spiegazione risulta nel fatto che nel mezzo il glucosio è abbondante e rimane la fonte di carbonio preferita dopo l'esaurimento di etanolo.

Consumo di glucosio e produzione di acido gluconico

Una diminuzione di glucosio statisticamente significativa ($p < 0,0001$) pari a 35,50 mmol/L è stata osservata dal T0 a T15. Nello stesso intervallo di tempo l'acido gluconico (prodotto dell'ossidazione parziale del glucosio) è aumentato di 39,65 mmol/L. I due valori non sono statisticamente diversi, quindi la quantità di glucosio consumata è stata convertita in una quantità equimolare di acido gluconico (figura 35).

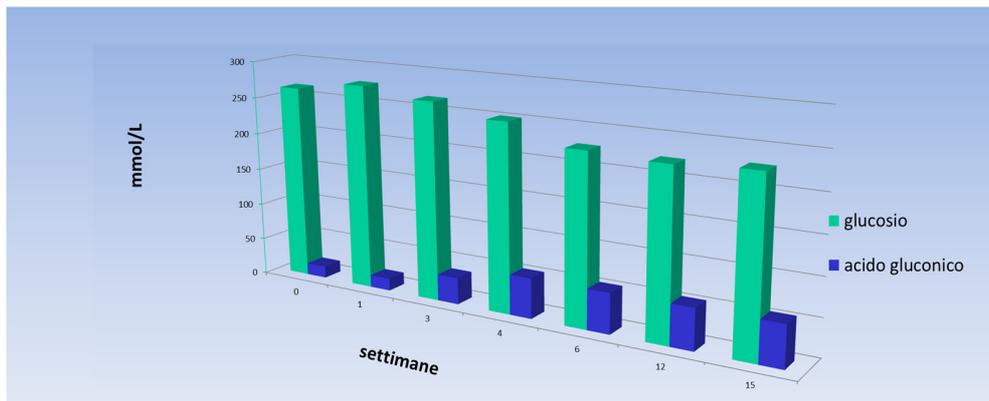


Figura 35 - Andamento nel tempo della concentrazione di glucosio e acido gluconico

Nell'intervallo di tempo tra T0 e T6, in cui l'etanolo si esaurisce, si ha il maggior incremento di acido gluconico (38.05 mmol/L) e il maggior decremento di glucosio (36.89 mmol/L). In definitiva, l'acido gluconico formatosi (39,65 mmol/L) contribuisce per il 9,2% all'acidità titolabile espressa come mmol/L di gluconico. Un contributo importante in considerazione del fatto che questo composto è stato proposto come indicatore di genuinità negli aceti balsamici tradizionali. La formazione di acido gluconico risulta di particolare rilevanza nei processi di acetificazione condotti con colture indigene. In questo contesto infatti emerge il contributo significativo, superiore al 9%, dell'acido gluconico sull'acidità titolabile. Tale evidenza supporta l'impiego dell'acido gluconico come indicatore di avvenuta fermentazione acetica, confermando la sua utilità come indicatore di qualità degli aceti a matrice zuccherina.

Fase 10. Invecchiamento prodotti

I quattro aceti prodotti direttamente nei reattori di fermentazione acetica (1A, 2A, 3A, 4A) e i tre ulteriori prodotti di miscelazione (S1, S2, S3) sono entrati nella fase di invecchiamento in barriques e caratelli nel mese di novembre 2014, per cui non è stato possibile verificare l'andamento della maturazione prima della fine del progetto. Sarà cura della cantina sperimentale effettuare le analisi necessarie in seguito.

Comunque, alcune analisi preliminari sugli aceti xA hanno evidenziato una leggera diminuzione di acidità (che non riduce l'effetto sensoriale di pungenza), accompagnata da un miglioramento degli aromi generali all'assaggio e una perdita di brillantezza per gli aceti che non contengono mosto cotto.

In seguito a tali osservazioni, è stato deciso di rimuovere l'aceto 3A dalle barriques e procedere allo stoccaggio in contenitori inerti di acciaio o vetro.

Durante le fasi di invecchiamento dei prodotti sono state fatte prove di tenuta, stabilità e conservabilità all'imbottigliamento ed alle diverse situazioni fisiche ed ambientali che possono verificarsi durante la vita del prodotto fino al suo consumo.

Queste prove e verifiche sono ancora in fase di esecuzione e di completamento, dati i tempi che necessitano ed il breve periodo avuto a disposizione.

Fase 11. Divulgazione dei risultati

F11.1 Organizzazione di un convegno tecnico-scientifico

Il progetto è stato presentato in due convegni, tenutisi il giorno 22 novembre 2014 presso la sala riunioni di Coldiretti Arezzo e il giorno 6 febbraio 2015 presso la Camera di Commercio di Arezzo (figure 36 e 37).

Le presentazioni orali dei convegni sono raccolte negli allegati 2 e 3.



Figura 36 – La locandina del convegno del progetto Acetoscana del 22 novembre 2014

Programma del convegno

Presentazione del progetto

Eleonora Lisi (I Natali s.a.s. Società Agricola di Lisi Eleonora)

Gli aceti e i balsamici

Prof. Paolo Giudici (Università di Modena e Reggio Emilia)

L'importanza degli attributi sensoriali nella definizione dei nuovi prodotti

Dott. Federico Lemmetti (Università di Modena e Reggio Emilia)

Sviluppo e gestione della fermentazione acetica in sistema statico e sistema sommerso

Dott.ssa Maria Gullo (Università di Modena e Reggio Emilia)

Le basi scientifiche e tecnologiche dei nuovi aceti

Dott. Federico Lemmetti (Università di Modena e Reggio Emilia)

Introduzione alla degustazione

Roberto Marchesini (Responsabile Panel)

Coordinamento

Dott. Mario Rossi (Direttore Coldiretti Arezzo)



Figura 37 – La locandina del convegno del progetto Acetoscana del 6 febbraio 2015

Programma del convegno

Presentazione del progetto

Eleonora Lisi (I Natali s.a.s. Società Agricola di Lisi Eleonora)

Gli aceti oggi

Prof. Paolo Giudici (Università di Modena e Reggio Emilia)

Le basi scientifiche e tecnologiche del progetto

Dott. Federico Lemmetti (Università di Modena e Reggio Emilia)

Le fermentazioni del progetto

Dott.ssa Maria Gullo (Università di Modena e Reggio Emilia)

Degustazione

Eleonora Lisi (I Natali s.a.s. Società Agricola di Lisi Eleonora)

Coordinamento

Dott. Roberto Marchesini (Coldiretti Arezzo)

In entrambi i convegni sono stati inoltre presentati i seguenti posters:

- Impiego di una coltura starter selezionata di batteri acetici in sistema combinato, statico e sommerso, per la produzione di aceti innovativi. Gabriele Zanichelli, Elena Verzelloni, Maria Gullo
- Evoluzione degli acidi organici in un processo di acetificazione in sistema statico. Elena Verzelloni, Maria Gullo
- Unimore Microbial Culture Collection. Luciana De Vero, Paolo Giudici

In entrambi i convegni sono state fatte delle degustazioni guidate dal Dott. R. Marchesini, somministrando in appositi cucchiari di porcellana tre degli aceti prodotti, al fine di ottenere delle valutazioni sia di ordine generale che specifico sulle caratteristiche dei prodotti ottenuti, sul loro grado di apprezzamento e sul livello di interesse che può suscitare sui consumatori. In queste degustazioni è stata fornita una scheda di valutazione su cui tutti i partecipanti hanno potuto esprimere il loro giudizio e le loro valutazioni sui prodotti in assaggio che hanno dato luogo a utilissime informazioni ed indicazioni aggiuntive anche rispetto a quelle fornite dal panel di assaggiatori. Copia della scheda fornita e l'elaborazione dei risultati e delle valutazioni ottenute sono allegate alla presente relazione nel folder " Convegni-Degustazioni Guidate ". E' da puntualizzare l'apprezzamento riscosso da questa iniziativa da parte di tutti i partecipanti che hanno avuto la possibilità di "toccare con mano" i risultati del progetto.

I risultati delle degustazioni ed il gradimento dei convegni sono raccolti negli allegati 4 e 5.

F11.2 Organizzazione di seminari e workshop per divulgare ed illustrare i risultati ottenuti

SITO WEB

Per il progetto Acetoscana è stato registrato il dominio pubblico www.acetoscana.com e www.acetoscana.it.

Il sito web è stato progettato e realizzato con pagine intuitive e semplici in modo da consentire una facile lettura delle attività che si stavano svolgendo nel corso del progetto; e nel corso dello stesso sono stati pubblicati i vari stati di avanzamento dello stesso.

Attraverso il sito è avvenuta anche la divulgazione preliminare degli argomenti trattati nei convegni. Per ciascun evento sono state riportate le locandine di invito e pubblicati i programmi.

Attualmente è in corso un'ulteriore revisione del sistema per trasformare il sito da divulgativo per il progetto di sviluppo a divulgativo per la presentazione dei nuovi prodotti/prototipi innovativi realizzati nel progetto Acetoscana.

Lo sviluppo di questa nuova fase ha visto anche il coinvolgimento del nuovo portale "Created in Italia" nel quale ci sarà un speciale locandina di divulgazione del progetto che arriverà a tutta Europa; il link da questo

portale al nostro sito Acetoscana consentirà di diffondere la conoscenza di questo progetto a una popolazione molto vasta e attenta alle novità realizzate in Italia ed in Toscana.

EXPORURALE 2013



Per la presentazione all'Exporurale 2013, tenutosi a Firenze dal 12/09/2013 al 15/09/2013, quando ancora il progetto era nelle prime fasi del suo sviluppo, è stato realizzato un poster che potesse rappresentare l'idea progettuale e le componenti innovative che conteneva (figura 38). Tale poster è stato mostrato alla Fortezza da Basso di Firenze nel corso di una rassegna e di seminari in cui sono stati rappresentati progetti sulle innovazioni nel sistema agroalimentare toscano, promosso dalla Regione.

Figura 38 – Il poster Acetoscana presentato a Exporurale 2013

TIRRENO CT - OSPITALITA' ITALIA

Il progetto Acetoscana e i prodotti ottenuti sono stati presentati e sono stati oggetto di divulgazione da parte del capofila (soggetto attuatore A17) alla 35° Edizione TIRRENO CT - OSPITALITA' ITALIA, tenutosi dal 22 al 26 febbraio 2015 presso il centro Fieristico di Carrara. Si tratta di una delle maggiori rassegne di enogastronomia che vengono fatte in Italia rivolte agli operatori e ai professionisti della ristorazione, del settore alberghiero, dei Bar e della cultura gastronomica in genere. Oltre agli operatori del settore, l'evento è partecipato dalla CON.PA.IT confederazione pasticceri italiani, A.M.I.R.A. Associazioni Maitres Italiani Ristoranti ed Alberghi, Assi.Pan Associazione Italiana Panificatori, F.I.S.A.R. Federazione Italiana Sommelier Albergatori Ristoratori, F.I.B. Federazione Italiana Barman, F.I.C. Federazione Italiana Cuochi, N.I.C. Nazionale Italiana Cuochi, ristorazione Italiana Magazine, Federazione Italiana Pasticceria Gelateria Cioccolateria.

La partecipazione a questa manifestazione specializzata ha consentito di testare con specialisti del comparto enogastronomico e operatori economici di questo settore il progetto realizzato e soprattutto i

prodotti ottenuti con chef di primari e prestigiosi locali a livello regionale, nazionale ed internazionale, riscontrando apprezzamenti per il grande livello di innovazione dei tre prototipi di prodotti presentati e oggetto di valutazione (3A, 3A1 E S2).

L'occasione è stata utile per divulgare il progetto ed i prodotti ma anche per affinare ulteriormente lo sviluppo di queste produzioni e valutare ulteriori loro inserimenti nella gastronomia e nella formulazione di preparazioni, piatti e dessert di varie tipologie in cucine di alto livello.

VINITALY E SAPORI D'ITALIA

Come previsto dallo schema progettuale per le attività di divulgazione e disseminazione dei risultati, è stata organizzata la partecipazione al Vinitaly 2015 dal 22 al 25 marzo. In tale contesto è stata sviluppata un'attività di disseminazione del progetto e si è tenuto uno specifico workshop divulgativo e informativo

con Sapori d'Italia, nota rivista dedicata ai prodotti Agroalimentari Tradizionali Italiani, alle piccole produzioni di spicco, ai cibi sani e genuini. Sapori d'Italia ha infatti ricevuto mandato da Verona Fiere per gestire l'area Agorà 2015 per la Fiera Sol&Agrifood (figura 39). Agorà è un'area di degustazione in cui il produttore, coadiuvato da uno chef, presenta e "racconta" il proprio prodotto a giornalisti e operatori nazionali e internazionali. Il progetto Acetoscana e i prodotti ottenuti sono stati oggetto di uno workshop specifico a cui è seguita una degustazione guidata in un tris di antipasti domenica 22 marzo.

Tali workshop e presentazione del progetto e dei prodotti Figura 39 – Pubblicazione Acetoscana su Sol&Agrifood 2015 saranno oggetto di una rappresentazione sul prossimo libro Sapori d'Italia.

Domenica 22 AGORÀ
L'insolito aceto tradizionale toscano
The unusual traditional Tuscan Vinegar

DEGUSTAZIONE / TASTING 2
DOMENICA 22 Marzo ore **12:00/12:40**

MENU A TRE
ANTIPASTO: L'INSOLITO ACETO TRADIZIONALE TOSCANO DI ELEONORA LISI
MENU WITH THREE - ELEANORA LISI AND HER UNKNOWN BALSAMIC VINEGAR

I NATALI SAS
 Società Agricola di Lisi Eleonora
 Località Tregozzano, 32/A - 52100 Arezzo (AR)
 www.acetoscana.com - info@acetoscana.com

SOL & AGRIFOOD
 MADE OF BUSINESS

sapori d'Italia

Figura 39 – Pubblicazione Acetoscana su Sol&Agrifood 2015

BROCHURE

In occasione di TIRRENO - CT e Vinitaly sono state preparate delle brochure informative (figura 40) in cui si racconta il progetto, l'idea aziendale e i caratteri innovativi del progetto Acetoscana cercando di trasmettere la novità e la peculiarità di quanto effettuato e del prodotto ottenuto: un aceto toscano di alta qualità che fa leva sulle nuove conoscenze scientifiche in materia, sulle elevate caratteristiche qualitative delle uve e dei vini toscani, sulle loro peculiarità intrinseche ed estrinseche, con proprietà organolettiche peculiari inimitabili e perfettamente riconoscibili, con l'obiettivo di ampliare la gamma dei prodotti riconducibili ai *Tuscan Wines*.

Con questo materiale informativo si è voluto fare una rappresentazione sintetica sia degli scopi ed obiettivi su cui è stato impostato e si fonda il progetto di innovazione ACETOSCANA, sia dei risultati ottenuti in termini di prodotti e delle potenzialità che il lavoro fatto può costituire per la vitivinicoltura della Toscana.



Figura 40 - La brochure informativa del progetto Acetoscana

Il progetto Acetoscana è stato descritto nella presentazione del volume “I balsamici. Fermentazione acetica,

viscosità e parametri sensoriali”, Aemilia University Press (2014), che raccoglie gli atti del convegno omonimo organizzato a Reggio Emilia dal gruppo di ricerca coinvolto nel progetto stesso (figura 41).

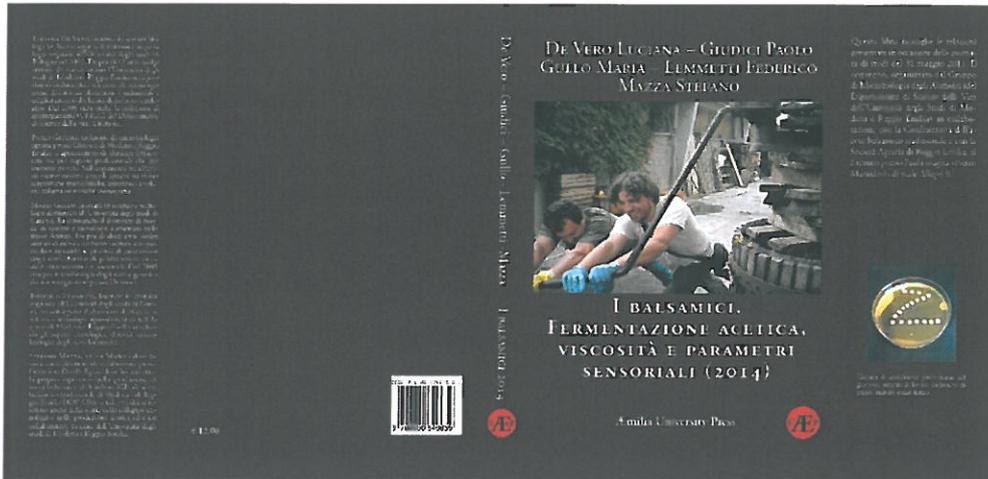


Figura 41 – Copertina del volume degli atti contenente la presentazione del progetto Acetoscana

IL CAPOFILA

I Natali S.a.s. Soc. Agr. Di Lisi Eleonora

Lisi Eleonora