



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**Valutazione delle attitudini fermentative di ceppi di
Saccharomyces cerevisiae a diverse temperature di
fermentazione**

**Evaluation of the fermentation aptitudes of *Saccharomyces
cerevisiae* strains at different fermentation temperatures**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Giulia Ausili

Giulia Ausili

Relatore:

Chiar. Mo Prof.

Maurizio Ciani

Maurizio Ciani

Correlatore:

Dott.ssa Laura Canonico

Laura Canonico

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

CAPITOLO 1: Introduzione	4
1.1. Processo di vinificazione	4
1.2 Fermentazione vinaria	5
1.3 Biochimica della fermentazione alcolica	8
1.4 Fermentazioni spontanee	10
1.5 Fermentazioni inocolata	13
1.6 Fermentazione in co-inoculo o sequenziali (o fermentazioni miste)	18
1.7 Prodotti secondari della fermentazione alcolica	23
CAPITOLO 2: Scopo del lavoro	34
CAPITOLO 3: Materiali e metodi	35
3.1 Ceppi	35
3.2 Precolture	37
3.3 Preparazione del Biggy Agar	37
3.4 Il mosto	39
3.5 Condizioni fermentative	42
3.5.1 Fermentazione a 22°	42
3.5.2 Fermentazione a 16°	43
3.6 Analisi microbiologiche	45
3.7 Analisi chimiche	47
3.7.1 Determinazione dell'anidride solforosa	47
3.7.2 Analisi acidità volatile	48
3.7.3 Determinazione dell'acetaldeide	51
3.7.4 Determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili	53
3.7.5 Determinazione dell'ammonio	54
3.7.6 Determinazione dell'etanolo	56
3.7.7 Determinazione dei volatili	57
3.7.8 Determinazione del D-glucosio e del D-fruttosio	59
CAPITOLO 4: Risultati	63
4.1. Produzione di idrogeno solforato	63
4.2. Valutazione della produzione di idrogeno solforato durante la fermentazione	67

4.3. Cinetica fermentativa	71
4.4. Acidità volatile	75
4.5. Anidride solforosa	77
4.6. Acetaldeide	79
4.7. Ammonio e azoto prontamente assimilabile (APA)	81
CAPITOLO 5: Discussione e conclusione	90
CAPITOLO 6: Bibliografia	97

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1. Processo di vinificazione

La vinificazione è un processo biochimico di trasformazione del mosto d'uva in vino; tale processo si attua attraverso la fermentazione alcolica conseguente alla presenza e all'attività di determinati lieviti che metabolizzano gli zuccheri e gli altri componenti presenti nel mosto d'uva in etanolo, anidride carbonica e centinaia di altri prodotti secondari, fondamentali per determinare l'unicità e il carattere del vino. La vinificazione prevede delle fasi come la raccolta delle uve, la preparazione del mosto, la fermentazione, la maturazione e l'invecchiamento del vino (*Lambrechts et al., 2000*).

La prima fase del procedimento della vinificazione è la vendemmia, dove viene prevista la raccolta delle uve nelle ore meno calde, in apposite cassette. Durante questo passaggio occorre verificare che l'uva sia matura e che abbia la giusta concentrazione di zucchero, occorre inoltre evitare di danneggiare gli acini per schiacciamento; si procede poi depositando il tutto in contenitori non troppo capienti per evitare macerazioni e/o fermentazioni premature prima dell'arrivo nei locali specifici di vinificazione. Durante questa fase avverrà una importante selezione delle uve da portare in cantina eliminando quelle immature o danneggiate (*Grisafi G., 2013*).

Terminata la raccolta delle uve, il passaggio che segue è il trasporto in cantina che deve avvenire rapidamente per evitare la rottura degli acini e fermentazioni non

gradite. A questo punto segue la pigiatura, ovvero la rottura degli acini, quindi il rilascio di succo dall'uva e della polpa dagli acini con l'ottenimento del mosto.

La diraspatura, un aspetto secondario del processo di pigiatura prevede la separazione degli acini dai raspi, dal succo e dalle bucce e l'isolamento e la raccolta degli stessi per lo smaltimento (*Boulton R. et al., 1996*).

1.2 Fermentazione vinaria

Il processo della fermentazione vinaria prevede la trasformazione, degli zuccheri, in etanolo e anidride carbonica e può essere riassunto da questa reazione complessiva.



Tuttavia, la fermentazione alcolica risulta essere un processo molto più complesso. Contemporaneamente al procedere di questa reazione complessiva, si verificano molti altri processi biochimici, chimici e fisico-chimici, che consentono di trasformare il mosto d'uva in vino. Vengono prodotti, oltre all'etanolo e all'anidride carbonica molti altri composti durante la fermentazione alcolica come alcoli superiori, esteri, glicerolo, acido succinico, diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo. Queste sostanze permettono al vino ottenuto di assumere particolare interesse organolettico. L'inizio del processo di vinificazione vede presenti diverse specie di lievito nel succo d'uva. Molteplici sono i fattori da cui dipende questa biodiversità, quali il vitigno, la fase di maturazione durante la vendemmia, i trattamenti antimicotici, le condizioni climatiche durante

l'anno, lo sviluppo di piaghe fungine e le pratiche viticole (*Sapis-Domerq 1980; Pretorius et al. 1999; Zamora F., 2009*).

La fermentazione vinaria, come descritto in precedenza è caratterizzata da una successione di microrganismi: inizialmente i lieviti *non-Saccharomyces* che colonizzano la superficie dei grappoli d'uva, successivamente questi lieviti vengono soppiantati dai lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, in particolare dai *S. cerevisiae*, che conducono fermentazioni alcoliche di successo fino a quando lo zucchero dell'uva è praticamente consumato (*Fleet, 2003*).

Durante la fermentazione alcolica, la dominanza di lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, attualmente, è dovuta all'impiego di fermentazioni controllate e ad alcune pratiche enologiche (*P'erez-Ortin' et al., 2002*).

Ma il principale controllo microbiologico è stato lo sviluppo di starter di lievito per vino (*Varela et al., 2004; Mas A., Portillo M.C., 2022*).

La procedura consistente nella fermentazione alcolica, utilizza come principale lievito *S. cerevisiae*, grazie alla sua elevata capacità fermentativa (*Sablayrolles J. M., 2008*).

I possibili fattori che influenzano lo sviluppo dei lieviti durante la fermentazione alcolica sono numerosi. La composizione iniziale della popolazione presente nel mosto d'uva, l'inoculo del mosto con colture starter selezionate, la composizione chimica del mosto che prevede la presenza di fungicidi e pesticidi, l'aggiunta di anidride solforosa, la temperatura di vinificazione, le interazioni esistenti tra i lieviti.

L'evoluzione dei lieviti in vinificazione dipende quindi da alcuni fattori specifici. I fattori di natura chimica sono i nutrienti, gli zuccheri, l'anidride solforosa, i composti dell'azoto, l'ossigeno, le vitamine, gli elementi minerali, gli acidi organici, l'etanolo, l'anidride carbonica. I fattori di natura fisica sono la temperatura e la pressione osmotica mentre i fattori di natura biologica sono la composizione della popolazione iniziale e le interazioni con altri microrganismi.

Tra questi fattori un'importanza particolare viene data al parametro dell'etanolo, infatti la produzione di etanolo ad opera dei *S. cerevisiae* è il principale fattore che condiziona lo sviluppo dei lieviti *non-Saccharomyces* durante la fermentazione. Infatti, i lieviti *non-Saccharomyces* hanno in genere una bassa tolleranza nei confronti dell'etanolo e la loro crescita è spesso legata a questo parametro. Oltre all'etanolo, come parametro importante, nell'evoluzione delle diverse specie di lievito troviamo anche l'ossigeno. Durante la fermentazione alcolica del vino, nel mosto, si hanno basse concentrazioni di ossigeno, e la successione di lieviti che si osserva durante questo processo, oltre ad essere legata alla bassa resistenza dell'etanolo da parte dei lieviti *non-Saccharomyces*, è anche legata alla scarsa tolleranza che questi lieviti hanno nei confronti di concentrazioni di ossigeno minime presenti nel substrato di crescita. Il vigoroso sviluppo di *S. cerevisiae* consuma rapidamente l'ossigeno presente nel mosto e questo contribuisce alla scomparsa dei lieviti *non-Saccharomyces* (Suzzi G. et al. 2018).

I lieviti anaerobici facoltativi, riescono a metabolizzare gli zuccheri in modo aerobico e anaerobico, questo perché possiedono l'equipaggiamento genetico adatto per intraprendere entrambi i percorsi (Boulton et al., 1996); possono consumare gli

zuccheri utilizzando due diverse vie metaboliche: respirazione e fermentazione (Racker, 1974). Respirazione e fermentazione iniziano, ambedue, con la glicolisi, che genera piruvato come prodotto finale. Durante la fermentazione alcolica, che avviene nel citoplasma, si procede in assenza di ossigeno ed il piruvato può essere trasformato grazie all'enzima piruvato decarbossilasi in acetaldeide e anidride carbonica, di seguito l'acetaldeide può essere ridotto ad etanolo (Barnett e Enzian, 2005).

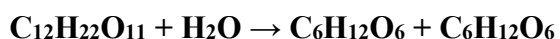
Nel processo della respirazione invece il piruvato, grazie all'enzima piruvato deidrogenasi può anche essere trasformato in acetil-coA e anidride carbonica. La reazione riduce il NAD^+ a NADH e deve incorporare il coenzima A. L'acetil-coA prodotto, è incorporato nel ciclo di Krebs, questo determina la formazione di anidride carbonica e coenzimi ridotti quali NADH e FADH_2 . Conseguentemente i coenzimi ridotti vengono riossidati nella catena respiratoria, riducendo l'ossigeno molecolare ad acqua (Barnett e Entian 2005). In questo ultimo caso si ha bisogno di ossigeno come substrato. Un punto chiave per la regolazione del metabolismo dei lieviti è la trasformazione del piruvato in acetaldeide o acetil-coA (Ribereau Gayon et al. 2000; Zamora F., 2009).

1.3 Biochimica della fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica si svolge in 2 fasi, una aerobica e una anaerobica, che viene indicata come la vera e propria fermentazione.

Nella prima fase, gli zuccheri complessi, ossia i disaccaridi come il saccarosio, vengono scissi dal lievito, tramite l'enzima invertasi. Questo primo passaggio porta alla produzione di zuccheri semplici come glucosio e fruttosio.

La reazione che caratterizza la prima fase è:



A partire dagli zuccheri semplici, precedentemente descritti, avviene la formazione di etanolo o alcool etilico, questa è la seconda fase del processo, la vera e propria fermentazione.

Nel citoplasma dell'organismo anaerobico, avviene la glicolisi a partire dal glucosio. Con la glicolisi si avrà la defosforilazione di una molecola di glucosio in 2 molecole di ATP e 2 di acido piruvico, ciò avviene in assenza di ossigeno, per cui non viene intrapreso il normale ciclo di Krebs e la normale via della respirazione cellulare aerobica ma la via fermentativa. Con la fermentazione si avrà la decarbossilazione del piruvato e la conseguente formazione di acetaldeide, che viene poi arricchita di due ioni idrogeno, la cellula a questo punto ricarica le molecole di NAD e forma come sottoprodotto l'etanolo. La formula generale che sintetizza la produzione di etanolo e CO₂ a partire dal glucosio è stata stilata dal chimico-fisico francese Louis Gay-Loussac:



(Moschetti G. et al., 2015)

1.4 Fermentazioni spontanee

Le specie indigene di lieviti *non-Saccharomyces*, conducono la fermentazione alcolica spontanea del vino. Queste diverse specie di lieviti competono e cooperano tra loro, progressivamente vengono sostituite da *S. cerevisiae*, la specie che ha maggiore capacità fermentativa. Il profilo analitico del vino è collegato alla presenza di queste specie di lievito *non-Saccharomyces* durante la vinificazione (Evangelia et al., 2021).

Il processo di fermentazione spontanea è quindi affidato ai lieviti presenti naturalmente sugli acini d'uva e/o ai lieviti che si trovano sulle superfici e sulle attrezzature delle cantine (Erten et al. 2002).

Il succo d'uva favorisce la crescita di una grande quantità di microrganismi, il basso pH (da 3 a 3,5) e l'alto contenuto zuccherino (in media 200 g/l) esercitano pressione selettiva sulle popolazioni microbiche. Il vino viene tradizionalmente ottenuto facendo crescere i microrganismi naturalmente presenti negli acini d'uva. Nel succo d'uva, i principali microrganismi che sono in grado di crescere sono lieviti, funghi, batteri acetici e batteri lattici. Le condizioni di anaerobiosi che si vanno a creare, una volta avviata la fermentazione, permettono di avere ancora maggiore pressione selettiva per questo vengono inibiti i microrganismi non in grado di attuare un metabolismo fermentativo, come funghi e batteri acetici. Con il progredire della fermentazione i nutrienti si esauriscono, questo comporta un aumento della concentrazione di etanolo, che diventa un carattere selettivo per la crescita dei lieviti, a dimostrazione di questo si osserva l'inibizione delle specie sensibili all'etanolo (Henschke, 1997). La fermentazione viene avviata da lieviti dei generi *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, essi sono

poco tolleranti all'etanolo, per questo quando la concentrazione di etanolo raggiunge il 3-4% (vol/vol), le specie etanolo tolleranti diventano predominanti, soprattutto *S. cerevisiae* (Flotta et al., 1993; Mortimer et al., 1994).

Altri lieviti come *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces Spp*, *Saccharomyces ludwigii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Brettanomyces spp.* possono essere presenti durante le fasi successive della fermentazione (Fleet et al., 1993; Henschke, 1997). Il ruolo principale nella fermentazione spontanea è svolto comunque dal lievito *S. cerevisiae* (Rainieri S., Pretorius I.S., 2000).

Nei mosti in fermentazione quindi, la successione dei lieviti, vede prima come protagonisti lieviti apiculati come *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, sostituiti poi dai i lieviti ellittici come *S. cerevisiae* che diventano i maggiori colonizzatori del mosto e dominano il processo fermentativo (Kunkee et al., 1977; Martini, 1993).

Negli stadi intermedi e finali delle fermentazioni troviamo lieviti appartenenti ai generi *Metschnikowia*, *Candida Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* e possono influire negativamente sulle caratteristiche sensoriali e qualitative del vino finito (Fleet et al., 1993; Comitini F., 2007).

Negli ultimi anni gli studi si sono concentrati sulle specie *non-Saccharomyces*, e sul loro utilizzo durante la fermentazione alcolica, nonostante questi lieviti, in passato, fossero considerati come fonti di problemi microbiologici e nonostante le loro

problematiche relative al basso potere alcoligeno, alla scarsa resistenza alla solforosa e alla produzione in eccesso di composti secondari. Gli studi si sono molto concentrati sui lieviti *non-Saccharomyces*, a causa delle critiche riguardanti le fermentazioni guidate, attraverso massicci inoculi iniziali di starter di *S. cerevisiae*; infatti queste fermentazioni possono condurre ad una standardizzazione delle caratteristiche sensoriali dei prodotti finiti, soprattutto riguardanti l'aspetto sensoriale olfattivo. Lo sviluppo e la successione di diverse specie durante la fermentazione spontanea, invece determina una maggiore complessità e distinzione stilistica al vino. Louis Pasteur nel 1866 riportava in *Études Sur Le Vin*: “*esistono un gran numero di fermenti distinti che provocano trasformazioni variabili secondo la loro natura e il loro organismo*”. L'affermazione riportata dallo studioso, indica, che le diverse specie di lievito presenti durante il processo condotto in modo spontaneo, determinano variazioni qualitative e quantitative sulle componenti significanti dal punto di vista sensoriale nel vino per via della loro diversità metabolica. I lieviti possono generare composti primari e secondari sensorialmente importanti, trasformando i composti presenti nell'uva. Le interazioni dei lieviti con il mosto d'uva si dividono in due tipologie; la prima tipologia di interazione prevede la trasformazione da parte dei lieviti dei componenti principali del mosto quali zuccheri, acidi, aminoacidi producendo composti come etanolo, acidi fissi e volatili, aldeidi, chetoni, esteri, alcoli superiori, che caratterizzano lo scheletro organolettico del vino. La seconda tipologia di interazione invece, riguarda le componenti presenti nel mosto in quantità minore ma che hanno spesso un forte impatto sensoriale e che vanno a caratterizzare le varie tipologie di vini, non sempre in modo positivo. Vengono prodotti composti a grande impatto organolettico, come

glicerolo, acetaldeide, acido acetico, esteri, alcoli superiori ed altri ancora. La pratica della fermentazione spontanea, risulta un processo incontrollato, in cui non è possibile assegnare ad ogni specie determinate caratteristiche. Questo processo presenta grandi rischi in vendemmie ad alto contenuto di zucchero, infatti ceppi selvaggi *Saccharomyces* e *non-Saccharomyces* potrebbero portare ad arresti fermentativi a causa del mancato esaurimento degli zuccheri presenti (Vaudano et al. 2014).

Questa difficoltà nel controllo del processo può causare la formazione di off-odour o off-flavour, ossia note aromatiche non desiderate, creando anche difetti organolettici nel prodotto finito. Tutto questo ha determinato il ricorso ad una fermentazione in purezza, impiegando lieviti commerciali selezionati da inoculare in modo massivo nel mosto, per avere una qualità riproducibile e costante del vino (Moschetti G. et al., 2015).

I ricercatori hanno svolto studi per evitare problematiche relative alla qualità del prodotto finito, dove viene proposto l'uso di inoculo contemporaneo o sequenziale di starter formati da più specie, in questo modo durante le fermentazioni, una o più specie selezionate in precedenza, di *non-Saccharomyces*, permettono di ottenere obiettivi sensoriali o tecnologici specifici, mentre *S. cerevisiae* permette un'adeguata conclusione della fermentazione (Vaudano et al. 2014).

1.5 Fermentazioni inoculate

Müller-Thurgau nel 1890, introdusse per primo il concetto di lievito selezionato in campo enologico (Pretorius et al., 1991); questo lievito può condurre fermentazioni

dei mosti e dei vini con risultati prevedibili e programmabili. Proprietà fisiologiche, biochimiche ed enologiche ottimizzate sono alla base di questi starter selezionati, per ottenere una corretta fermentazione. Stati Uniti, Nuova Zelanda e Australia furono i primi ad impiegare i lieviti come starter, in vinificazioni industriali, nel xx secolo. In Europa, le colture starter inizialmente non ottennero molto successo, la situazione cambiò quando queste colture divennero di facile applicazione e conservazione, infatti da umidi panetti di lievito concentrati si passò a bustine con all'interno lievito secco attivo (LSA). Due ceppi della specie *S. cerevisiae*, denominati *Montrachet* e *Pasteur Champagne*, furono i primi ceppi ad essere presentati in busta e sottovuoto, e presto si diffusero in tutto il mondo enologico, arrivando anche in Italia (D.M. 10 ottobre 1977).

Attualmente nelle cantine con produzione su larga scala, vengono utilizzati lieviti commerciali per avere fermentazioni rapide e una qualità costante del prodotto (*Pretorius, 2000*).

Le cantine che mettono ancora in pratica il processo della fermentazione spontanea, dove si ha una successione di varie specie di lieviti naturalmente presenti negli acini d'uva e/o nell'ambiente cantina, sono poche, visto che i rischi associati a questa procedura sono elevati, infatti il vino ottenuto come prodotto finale può presentare difetti organolettici e alterazioni ma soprattutto non si può ottenere una qualità costante nel tempo. Il vino è l'espressione dell'ambiente viticolo da cui si origina e l'effetto del lievito commerciale incide anche sulla biodiversità microbica del vigneto. La quantità di qualsiasi starter microbico che viene inoculata nel mosto è di 10^8 cellule/ml di mosto, ma prima dell'inoculazione del mosto con il ceppo selezionato, si aggiunge

anidride solforosa in quantità tra i 20 e 120 mg/L, questo inibisce la crescita dei lieviti naturalmente presenti sulle uve e quindi nel mosto. Questa procedura crea le condizioni tali per cui, l'inoculo di decine di miliardi di cellule vive, di ceppo selezionato nel mosto, avvia rapidamente la fermentazione assicurandone il corretto svolgimento. L'anidride solforosa ha un'azione sulle cellule microbiche complessa, essa è un antisettico. *S. cerevisiae* reagisce diversamente nei confronti dell'anidride solforosa, il lievito può condurre una fermentazione il cui andamento non risente di nulla in presenza di questo composto, ma può anche inibire la crescita di altri microrganismi (Zambonelli et al., 2000; Moschetti G. et al., 2013).

L'anidride solforosa (SO₂) svolge contemporaneamente un'azione antisettica e una antiossidante. Per utilizzare al meglio questo composto occorre conoscere il pH del vino, la temperatura, il grado alcolico, la quantità di SO₂ molecolare presente e la quantità di SO₂ molecolare paralizzante, cioè necessaria a bloccare la crescita dei microrganismi presenti nel vino. Questo ultimo parametro va valutato in modo diverso per ogni tipo di microrganismo. L'azione antisettica di questo composto prevede che esso sia efficace nei confronti batteri e lieviti determinando alterazioni diverse, come alterazioni dell'attività enzimatica o alterazioni della permeabilità della membrana. Mentre l'azione antiossidante consiste nel fermare le reazioni a catena provocate dall'ossidazione chimica o enzimatica a carico delle sostanze fenoliche contenute nel vino. Le sostanze fenoliche in presenza di ossigeno, si ossidano velocemente producendo perossidi e radicali ossigenati, più reattivi e dannosi dell'ossigeno

molecolare, ossidando a cascata altre sostanze fenoliche, alcool etilico e sostanze aromatiche alterando la qualità organolettica del vino (Scotti B., 2004).

La fermentazione alcolica innescata da lieviti *S. cerevisiae* genera una forte contaminazione dell'ambiente e dell'attrezzatura di cantina. I rischi legati alla fermentazione spontanea e all'omologazione sensoriale dovuta ai lieviti commerciali, grazie ad un adeguato uso delle biotecnologie, possono essere superati, questo è reso possibile perché si possono isolare, selezionare, ed impiegare in cantina, dei ceppi di lieviti "autoctoni". Il termine "autoctoni" è utilizzato perché questi lieviti sono adatti alla fermentazione dei mosti da cui sono stati isolati, impartendo ai vini caratteri sia di qualità che di tipicità. La selezione di questi microrganismi, è una selezione naturale dovuta a fattori legati all'ambiente, alla tradizione, alle pratiche di campo e di cantina. Molti studi sostengono che nel corso del tempo ogni zona pedoclimatica così come ogni cantina, può aver selezionato un lievito definito "indigeno", che determina risultati enologici migliori se utilizzato nella stessa area da dove è stato isolato, piuttosto che utilizzare un lievito commerciale di altra origine geografica (Francesca et al., 2010).

Alcuni ceppi di lievito, secondo alcuni studi, possono essere legati ad uno specifico ambiente viticolo o di cantina, (Lopes et al., 2002), diventare stabili nel tempo (Schuller et al., 2005) e dominare, negli anni, il processo fermentativo spontaneo (Mercado et al., 2007).

Tutto questo supporta l'idea che il terroir influisce sulla qualità di un vino anche a livello microbiologico (*Renouf et al., 2006; Mazzei et al., 2010*).

Un ceppo di lievito autoctono deve essere caratterizzato da caratteri enologici che lo rendono facilmente applicabile e sicuro dal punto di vista enologico quanto una coltura commerciale selezionata e soprattutto deve rafforzare le caratteristiche peculiari dei vini locali. Verranno quindi selezionati lieviti autoctoni, ogni ceppo è specifico per le varietà d'uva, per la zona di produzione e per la tecnica di vinificazione. Di solito i lieviti starter anche se autoctoni appartengono alle specie *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Le caratteristiche che deve possedere un lievito autoctono per essere considerato adeguato sono: garantire un rapido avvio della fermentazione alcolica, permettere la completa trasformazione degli zuccheri in alcool etilico, evitare la presenza di off-odour e off-flavour, determinare tipicità e riconoscibilità nel vino del lievito *S. cerevisiae* possiede un'elevata variabilità ed i suoi caratteri enologici sono stati ben individuati grazie a studi biometrici (*Zambonelli et al., 2000*).

I caratteri enologici possono essere di due tipologie, "tecnologici" e "di qualità". La prima tipologia indicata comprende parametri che influiscono sull'andamento della fermentazione e grazie ad essi la fermentazione può essere programmata. Essi sono: competitività (potere fermentativo o alcol-tolleranza, vigore fermentativo, resistenza all'anidride solforosa), tipo di sviluppo (a cellule disperse, flocculento, a catene di cellule, potere filmogeno), sviluppo ad alte e basse temperature, carattere killer. Mentre la seconda tipologia, comprende la capacità di produrre durante la fermentazione glicerolo, acido succinico, acido acetico, aldeide acetica, composti dello

zolfo, sostanze che incidono sulla qualità finale del vino e la capacità di agire su alcune sostanze dei mosti e questo determina cambiamenti nella composizione chimica (Moschetti G. e Nicola F., 2013).

1.6 Fermentazione in co-inoculo o sequenziali (o fermentazioni miste)

La scarsa complessità organolettica, spesso rinvenuta nei vini ottenuti tramite la fermentazione controllata, condotta da colture pure di *S. cerevisiae* ha posto l'attenzione verso i vini ottenuti con la fermentazione spontanea, caratterizzati da note aromatiche differenti apportate dai vari lieviti che sviluppano il processo della fermentazione. Questo ha determinato una rivalutazione dei lieviti *non-Saccharomyces*, precedentemente descritti come lieviti non adatti per la loro bassa efficienza di fermentazione e per la produzione di sostanze indesiderate. In realtà questi microrganismi determinano un profilo aromatico e sensoriale particolare nei vini, grazie alla produzione di composti aromatici diversi da quelli prodotti dai *S. cerevisiae*. Da qui nascono le fermentazioni miste controllate, condotte da lieviti *non-Saccharomyces* e *S. cerevisiae*, che aumentano la complessità aromatica e sensoriale dei vini sfruttando le caratteristiche di entrambe le tipologie di lievito (Pietrafesa A., 2020).

D'altra parte è stata evidenziata la partecipazione dei lieviti *non-Saccharomyces* non solo durante le vinificazioni naturali ma anche in vinificazioni inoculate con colture selezionate, ciò è stato dimostrato da diversi studi (Fleet et al. 1984; Pardo et al. 1989; Mora et al. 1990; Ciani e Rosini 1993).

Questi lieviti *non-Saccharomyces*, se utilizzati in fermentazioni miste controllate, rendono l'aroma dei vini più complesso e migliorano la qualità del prodotto finito (Romano et al., 1997; Egli et al. 1998; Ciani e Maccarelli 1998; Henick-Kling et al. 1998). Le loro attività enzimatiche inoltre sono risultate interessanti. Alcuni *non-Saccharomyces* in ambito vinario secernono enzimi come proteasi, esterasi e beta-glucosidasi che contribuiscono positivamente sulle qualità del vino (Rosi et al. 1994; Fernandez et al. 2000; Strass et al. 2001; Ferriera et al. 2001; Zohre et al., 2002).

La ricerca delle interazioni tra le due specie di lievito *non-Saccharomyces* e *S. cerevisiae* è alla base di molti studi, che hanno come obiettivo quello di migliorare la qualità del vino. Le specie di lieviti maggiormente studiati sono quelle rappresentate nelle uve e nei mosti nelle diverse fasi della fermentazione, tra cui *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Lachancea* e *Metschnikowia* (Evangelia A., 2021).

Sono stati condotti quindi vari studi per osservare l'impatto di questi lieviti sulla composizione e le proprietà sensoriali del vino (Swiegers et al. 2005; Renouf et al. 2007; Domizio et al. 2007; Fleet 2008). I lieviti *non-Saccharomyces* svolgono infatti un ruolo importante nella complessità aromatica del prodotto finale. L'utilizzo di inoculi misti controllati di starter di *S. cerevisiae* insieme a lieviti *non-Saccharomyces* risulta essere un approccio enologico rilevante per raggiungere prodotti con caratteristiche originali e peculiari. Un'elevata variabilità, già conosciuta per i *Saccharomyces*, è stata rilevata anche all'interno delle specie *non-Saccharomyces*, per cui anche in questo caso vengono operate azioni di selezione dei ceppi con interessanti potenzialità applicative (Ciani e Maccarelli 1998; Romano 2002).

L'impiego degli inoculi misti, permette da una parte di migliorare e dall'altra di tipizzare i vini, aumentando la produzione di composti positivi e/o riducendo quelli indesiderati. Si ha la possibilità di replicare la fermentazione naturale, controllando però l'andamento della fermentazione rendendo il processo ripetibile. Conoscere le attitudini enologiche dei lieviti *non-Saccharomyces* è fondamentale per l'utilizzo di questo tipo di inoculi (Ribereau Gayon e Peynaud 1960; Fleet 1993; Ciani 1997).

Le caratteristiche su cui si basa la selezione di lieviti *non-Saccharomyces* è la capacità di produrre grandi quantità di composti secondari desiderati e contemporaneamente di produrre basse quantità di composti negativi tra cui acido acetico e acetaldeide. In generale questi lieviti sono rappresentati da un andamento fermentativo più lento e da una purezza di fermentazione minore rispetto *S. cerevisiae*. La selezione di determinati ceppi e la creazione delle condizioni ottimali per gli inoculi sequenziali potrebbe essere un'ottima tecnica per permettere ai lieviti *non-Saccharomyces* di produrre particolari composti che rendono migliori le qualità del vino senza però diminuire le capacità fermentative dei lieviti *S. cerevisiae* (Blasi S., 2012; Domizio P. et al., 2012).

Torulaspota delbrueckii tra i lieviti *non-Saccharomyces* grazie al suo elevato potenziale fermentativo è una delle specie più apprezzate per svolgere le fermentazioni miste. In co-inoculazione con *S. cerevisiae* rende più intenso l'aroma del vino. Ha elevata tolleranza all'etanolo e questo lo fa resistere alla competizione con *S. cerevisiae* ed ha anche la capacità di produrre tossine killer. La presenza di entrambe le popolazioni aumenta la durata delle fermentazioni, indipendentemente dal ceppo di *T. delbrueckii* usato (Zhang et al., 2021).

In queste fermentazioni miste le associazioni tra le due specie di lievito dipendono molto dalle caratteristiche del ceppo di *S. cerevisiae* che avvia processi di formazione di alcoli superiori (Zhang et al., 2021).

Durante la fermentazione del vino *T. delbrueckii* influenza le modalità con cui *S. cerevisiae* reagisce alle disponibilità dell'azoto, portando cambiamenti alla fermentazione (Ruiz et al., 2021).

T. delbrueckii avvia l'utilizzo di azoto rendendo attive vie metaboliche diverse da quelle preferite da *S. cerevisiae* (Álvarez-Fernández et al., 2021).

Varie specie del genere *Hanseniaspora* aumentano l'acidità volatile del vino e i livelli di esteri acetato, e sono usate in fermentazioni miste con *S. cerevisiae*. *Hanseniaspora* è caratterizzata da un'elevata presenza ed efficienza di enzimi come la β -d-glucosidasi, questi enzimi aumentano il carattere aromatico dei vini e migliorano la resa della fermentazione alcolica durante le prime fasi. *H. vineae* o *H. uvarum* assieme a *S. cerevisiae* porta al miglioramento del colore del vino. Per migliorare la produzione di biomassa da parte di *Hanseniaspora*, nelle colture miste con *S. cerevisiae* si può utilizzare come tecnica l'aerazione (Yan et al., 2021).

Si possono avere fermentazioni bloccate quando viene praticata un'eccessiva ossigenazione, per cui è importante impostare una soglia di ossigeno al di sopra della quale, la produzione di biomassa da parte di *Hanseniaspora* potrebbe essere non necessaria. Una elevata densità cellulare e una sopravvivenza prolungata di *Hanseniaspora* sono fondamentali per una buona produzione di composti aromatici,

ma una loro elevata produzione può risultare sgradita nel prodotto finale. In queste fermentazioni in coltura mista tra *S. cerevisiae* con *H. uvarum* o *H. opuntiae* c'è anche un aumento nella produzione di glicerolo e una migliore resa fermentativa (Harle et al., 2021).

Grazie alla sua grande capacità di produrre acido lattico *Lachancea thermotolerans* è usata per l'acidificazione dei vini nel miglioramento dell'intensità del colore dei vini rossi. Può produrre altri metaboliti o determinare alterazioni desiderate per creare un profilo sensoriale specifico nei vini. Quindi *L. thermotolerans* è molto utilizzato nel co-inoculo con *S. cerevisiae*; se inoculato simultaneamente o in sequenza determina comunque un miglioramento nella struttura e nel profilo dei vini. *S. cerevisiae* dopo l'inoculazione di *L. thermotolerans* nel mosto d'uva ha un comportamento, che dipende dal suo accesso a fonti di azoto. L'attività killer dei ceppi di *L. thermotolerans* combinata all'elevata produttività di acido lattico, caratteristica anche questa tipica del ceppo, può essere una risorsa importante, rendendo competitivo questo lievito e permettendo ad esso una sopravvivenza lunga durante la fermentazione.

Metschnikowia pulcherrima è in grado di rilasciare una sostanza antimicrobica, l'acido pulcherriminico che sequestra il ferro ferrico e forma un pigmento rosso-marrone, quindi questo lievito riduce la disponibilità del ferro per gli altri microrganismi. Nei vini fermentati con *M. pulcherrima* insieme a *S. cerevisiae* si hanno aumenti dei livelli di glicerolo, prodotto in grandi quantità da entrambi i lieviti. Durante queste fermentazioni combinate si ha anche una riduzione dei livelli di etanolo. Nella fermentazione del mosto d'uva Prokupac, aumenta la quantità di polifenoli, antociani

e flavonoidi e migliora la qualità cromatiche del vino grazie all'attività di *M. pulcherrima*, questo è spiegato dalla bassa efficienza di *M. pulcherrima* di assorbire gli antociani nella parete cellulare (Karabegovic et al., 2021; Evangelia A. et al., 2021).

1.7 Prodotti secondari della fermentazione alcolica

I lieviti non solo convertono gli zuccheri in etanolo e anidride carbonica, ma producono anche una serie di metaboliti minori, importanti però a livello sensoriale, che conferiscono al vino un particolare carattere (Lambrechts e Pretorius, 2000).

Lieviti, batteri e funghi contribuiscono all'ecologia microbica della produzione del vino e ne determinano la composizione chimica, ma i lieviti rappresentano l'influenza maggiore perché conducono la fermentazione alcolica. I lieviti contribuiscono alla formazione dell'aroma del vino con diversi meccanismi, quali, produrre enzimi che portano alla trasformazione dei composti neutri dell'uva in composti aromatici attivi, produrre molti prodotti secondari importanti per la composizione aromatica (acidi, alcoli, esteri, polioli, aldeidi, chetoni, composti solforati volatili, fenoli volatili), la produzione di etanolo e di altri solventi che aiutano a far sì, che le componenti aromatiche dei solidi dell'uva vengano estratte (Lambrechts e Pretorius 2000).

I sottoprodotti della fermentazione sono principalmente rappresentati da etanolo, glicerolo e acido acetico che a livello quantitativo sono in maggiore presenza, oltre ad essi sono presenti anche altri metaboliti in quantità minori (Romano P. et al., 2019).

Nel corso del tempo si ha avuto la necessità di migliorare la comprensione della fermentazione alcolica e di creare strategie per migliorare la qualità del prodotto finito (*Zamora F., 2009*).

I sottoprodotti della fermentazione alcolica.

-Etanolo

L'etanolo è il principale componente del vino, la sua quantità può oscillare dall'8 al 15% v/v nei vini normali, mentre in quelli più liquorosi si attesta sul 20%, questo sottoprodotto della fermentazione determina viscosità nel vino. Attualmente, i vini con maggior concentrazione di etanolo, sono una conseguenza dell'aumento delle concentrazioni di zucchero nell'uva, a causa dei cambiamenti climatici in tutto il mondo. Queste elevate concentrazioni di zucchero, oltre ad aumentare lo stress osmotico che il lievito deve affrontare nelle prime fasi della fermentazione, vanno ad incrementare anche il contenuto di metaboliti in primis etanolo seguito da glicerolo e acido acetico (*de Orduña R. M., 2010*).

Alti livelli di etanolo influiscono negativamente nella percezione dell'aroma e del sapore del vino, infatti viene cambiata la percezione che si ha di un vino, da fruttato ad erbaceo (*Goldner et al. 2009*), aumenta poi la sensazione di astringenza, piccantezza e amarezza (*Obrique-Slier et al. 2010; Romano P. et al., 2019*).

-Glicerolo

Esso è il sottoprodotto più abbondante della fermentazione. E' un composto che influisce sulla sensazione di corposità e dolcezza del vino (*Styger et al. 2011; Romano P. et al., 2019*).

E' un composto non volatile privo di proprietà aromatiche, ma contribuisce ugualmente alla qualità del vino modificandone la pienezza e lo dolcezza (*Ribereau Gayon et al. 1972*).

A livello quantitativo, dopo l'etanolo e l'anidride carbonica è il composto maggiormente presente. Ha impatto positivo sulla qualità del vino, modifica la corposità, la tessitura ed il pienezza del prodotto. Per i vini corposi le caratteristiche sensoriali migliorano con una produzione elevata di glicerolo. La produzione di questo sottoprodotto dipende dal ceppo di lievito da cui deriva, ogni ceppo produce quantità diverse di questo composto, dal contenuto zuccherino del mosto e dalle varietà di uva. Un'elevata produzione di glicerolo si ha con l'aumento della temperatura, ed elevati livelli di questo composto determinano dei vantaggi sensoriali come una migliore percezione al palato e un aumento della complessità del vino. *S. cerevisiae* produce un quantitativo di glicerolo che oscilla tra i 2 e gli 11 g/l ma le concentrazioni ottimali sono tra i 4 e i 9 g/l. La produzione di glicerolo è legata alla disponibilità di zuccheri fermentescibili, essa aumenta all'aumentare della concentrazione di zucchero, così come al crescere della temperatura (*Dequin S., 2014*).

-Acido acetico

E' il principale acido volatile del vino, è un acido organico, e anche se la quantità di acidi organici non sia elevata nel vino, sono acidi sufficientemente volatili per contribuire all'aroma. Sono presenti in piccole quantità anche l'acido propionico, butanoico e lattico. L'acido acetico svolge un ruolo importante nell'aroma del vino, un'eccessiva concentrazione di questo determina un carattere simile all'aceto e una sensazione sgradevole in bocca. Esso è un rappresentante degli acidi volatili, la cui concentrazione generalmente nei prodotti finiti è bassa, in quantità compresa tra 0,25 e 0,50 g/l ma in determinate condizioni di fermentazione può aumentare. La quantità di acido acetico compresa tra 0,7 e 1,1 g/l risulta essere non idonea, la concentrazione ottimale è compresa tra 0,2 e 0,7 g/l. Il limite massimo accettabile per l'acidità volatile nella maggior parte dei vini è di 1,2 g/l di acido acetico (*Romano P. et al., 2019*).

-Alcoli superiori

Essi sono prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica, a partire da una deviazione del metabolismo degli amminoacidi, vengono prodotti quando i chetoacidi, corrispondenti allo scheletro di carbonio dei diversi amminoacidi, vengono deaminati, decarbossilati e ridotti. Questi sottoprodotti, di solito sono al di sotto del loro limite di rilevabilità ma sono precursori di alcuni esteri che incidono molto a livello sensoriale nel vino (*Zamora F., 2009*).

Per alcool superiore ci si riferisce ad alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio, con un punto di ebollizione più elevato rispetto all'etanolo ed elevato peso

molecolare. Questa categoria di composti comprende alcoli alifatici e aromatici e nelle bevande alcoliche risultano il più grande gruppo di composti aromatici quantitativamente presente. I più importanti sono gli alcoli alifatici che includono, propanolo, alcool isoamilico, isobutanolo e alcool amilico, mentre il tirosolo e il 2-feniletanolo sono i principali alcoli aromatici. *S. cerevisiae* durante la fermentazione produce grandi quantità di alcoli superiori, che hanno un importante effetto sulla qualità sensoriale e sul carattere del vino (Pretorius et al., 2005; Swiegers et al., 2005).

Questi composti possono avere effetti sia positivi che negativi sull'aroma e sul sapore del vino; se presenti in elevate concentrazioni possono determinare un odore ed un gusto forte e pungente mentre se presenti in quantità normali conferiscono caratteri fruttati. La concentrazione di alcoli superiori che conferisce un buon livello di complessità al vino è inferiore a 300 mg/l mentre concentrazioni superiori a 400 mg/l hanno effetti dannosi. L'alcool isoamilico, l'alcool amilico e l'isobutanolo sono i prodotti di degradazione degli amminoacidi a catena ramificata, rispettivamente leucina, isoleucina e valina e sono quindi noti anche come alcoli a catena ramificata (Romano P. et al., 2019).

-Esteri

Il maggior contributo al bouquet fermentativo del vino viene dato dagli esteri (Nykänen, 1986) perchè sono i composti più presenti nel vino (Romano P. et al., 2019).

Questi sottoprodotti sono sintetizzati da acil-coA e alcoli, grazie ad enzimi come le alcol-acilcoA transferasi (Barre et al., 1998; Zamora F., 2009).

Durante la fermentazione alcolica vengono prodotte elevate quantità di esteri. Le due categorie principali di esteri presenti nelle bevande fermentate sono gli esteri dell'acetato e gli esteri etilici degli acidi grassi. Per l'aroma del vino gli esteri dell'acetato sono più importanti rispetto agli esteri etilici degli acidi grassi, che derivano dalla coniugazione di un alcol con un acido. Nella loro formazione il gruppo acile deriva dall'acetato come acetil-coA mentre il gruppo alcolico è l'etanolo o un alcol complesso derivato dal metabolismo degli aminoacidi. Gli esteri dell'acetato più significativi sono: l'acetato di etile che sprigiona aromi fruttati o aromi simili ai solventi, l'acetato di isoamile che produce aroma di banana e il 2-feniletile acetato che si presenta con aromi del miele e aromi fioriti. Mentre nella formazione degli esteri etilici degli acidi grassi, il gruppo alcolico è l'etanolo mentre gli acidi grassi a catena media forniscono il gruppo acile. In questo gruppo sono presenti l'etil esanoato e l'etil ottanoato che producono un aroma che si avvicina all'odore della mela. Gli esteri, maggiormente rispetto agli alcoli superiori, hanno grande impatto sull'aroma del vino anche se presenti in quantità non elevate. Questi composti possono mascherare la complessità del vino se presenti in grandi concentrazioni; l'acetato di etile è l'estere più abbondante nel vino, ha effetti positivi sul prodotto finale a concentrazioni inferiori a 80 mg/l, mentre è considerato problematico nei vini se presente in quantità superiori ai 90 mg/l o 200 mg/l di esteri totali. Al profilo aromatico dei vini bianchi contribuisce maggiormente l'acetato di isoamile (*Romano P. et al., 2019*).

-Acetaldeide

L'acetaldeide è uno dei composti più importanti a livello sensoriale che si formano durante la vinificazione e costituisce il 90% delle aldeidi contenute nel vino (*Nykanen, 1986*).

I livelli di acetaldeide nelle varie tipologie di vino sono diversi, infatti nei vini bianchi la concentrazione di questo composto corrisponde a circa 80 mg/l, nei vini rossi 30 mg/l e per lo sherry 300 mg/l. Alti livelli di questo composto sono poco desiderabili nei vini da tavola e conferiscono un sapore pungente, irritante ed erbaceo, mentre concentrazioni minori conferiscono un gradevole aroma fruttato. Il substrato principale per la formazione dell'acetaldeide è lo zucchero, ma anche il metabolismo degli amminoacidi come l'alanina porta alla formazione di questo composto. Dal metabolismo degli zuccheri del lievito, durante la fermentazione alcolica, deriva l'acetaldeide grazie all'azione della piruvato decarbossilasi e dell'alcool deidrogenasi ma il composto può essere formato, dopo la fermentazione alcolica, grazie all'ossidazione dell'etanolo, che può essere chimica o biologica. Questo metabolita è il precursore per la sintesi di acetato, acetoino ed etanolo. I livelli più elevati di acetaldeide si raggiungono quando la velocità di fermentazione massima e decrescono alla fine del processo (*Romano P. et al., 2019*).

-Diacetile

Il diacetile è il responsabile dell'aroma e del sapore del burro. La sua concentrazione nel vino è piuttosto bassa rispetto alla sua soglia aromatica che corrisponde alla quantità di 8 mg/l. Questo composto è prodotto dai batteri dell'acido lattico ma è

prodotto anche dai lieviti durante la fermentazione alcolica. La maggior concentrazione di diacetile che viene prodotta è poi metabolizzata in acetoino e 2,3-butandiolo. Il diacetile conferisce aromi di nocciola, di lievito quando presente in minime concentrazioni mentre se presente in alte concentrazioni, (superiori a 5-7 mg/l) conferisce il tipico aroma di burro e diventa un composto indesiderato (*Romano P. et al., 2019*).

I sottoprodotti del diacetile sono ottenuti dalla condensazione del piruvato con l'acetaldeide. E' una reazione che produce acetolattato che poi viene decarbossilato. Con la decarbossilazione ossidativa viene prodotto il diacetile mentre se la decarbossilazione non è ossidativa viene ottenuto l'acetoino. L'acetoino può essere prodotto riducendo direttamente il diacetile; e l'acetoino può essere ridotto a 2,3-butandiolo, la reazione che produce quest'ultimo è reversibile (*Ribereau Gayon et al. 2000; Zamora F., 2009*).

-Tioli

E' una classe di composti solforati e tra di essi in particolare il 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one, il 3-mercaptoesan-1-olo e il 3-mercaptoesil acetato, sono alcuni dei più potenti composti aromatici presenti nel vino. A concentrazioni ottimali nel vino, questi composti conferiscono aromi di frutto della passione, pompelmo, uva e ribes nero. Essi si sviluppano solo durante la fermentazione perchè sono invece inesistenti nel succo d'uva (*Romano P. et al., 2019*).

-Idrogeno solforato

L'idrogeno solforato, (H_2S) non viene prodotto da tutti i ceppi di lievito, è noto però che questo composto, dall'odore sgradevole sia prodotto da *S. cerevisiae*. La capacità produttiva di un ceppo di lievito dipende dall'attività della solfito reduttasi, che hanno un'attività enzimatica che porta alla produzione di questo composto. La produzione può essere influenzata anche da altri fattori quali elevati livelli di residui di zolfo elementare usato nel vigneto per la protezione delle piante, presenza di anidride solforosa, carenza di vitamine e alta concentrazione di amminoacidi come la metionina. Un fattore che influisce sul contenuto di composti solforati nel vino è il metabolismo del lievito nei confronti dei composti azotati presenti nel mezzo (*Romano P. et al., 2019*).

-Etil Fenoli

Questi prodotti della fermentazione alcolica influenzano molto l'aroma del vino per via della loro soglia di rilevazione che risulta essere molto bassa per questo sono facilmente rilevabili. In questo gruppo le molecole più importanti sono il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, tra gli altri (4-etilcatecolo, 4-vinilguaiacolo, 4-vinilfenolo e 4-vinilcatecolo). I fenoli volatili possono contribuire in modo positivo all'aroma di alcuni vini, di solito però la loro presenza favorisce sapori sgradevoli noti come "carattere Brett", gli aromi che vengono sprigionati sono aromi che ricordano l'odore di plastica, pollame, sudore. Il "carattere Brett" è molto pronunciato quando i valori dei fenoli supera i 620 $\mu g/l$. La soglia sensoriale del 4-etilfenolo è di 230 $\mu g/l$, quindi piccole

quantità di 4-etilfenolo sono facilmente apprezzabili nel vino, il 4-etilguaicoloinfluenza l'aroma del vino minormente ma è anche legato al “carattere Brett” e sprigiona un aroma affumicato (*Romano P. et al., 2019*).

-Acido succinico

Questo composto è il terzo prodotto della fermentazione alcolica, esso è presente nel vino in quantità comprese tra 0,6 e 1,2 g/l e contribuisce all'acidità del vino (*Zamora F., 2009*).

Questo composto è considerato responsabile dell'aumento della maggior parte dell'acidità titolabile. Esso sprigiona un aroma che risulta essere una miscela tra sapore di acido, sale e amaro. L'acido succinico è un acido organico non volatile, prodotto durante la fermentazione dai lieviti con il catabolismo degli zuccheri o degli amminoacidi in base alle condizioni di crescita e delle fonti di azoto disponibili. La formazione diretta dipende dalle reazioni del ciclo di Krebs di cui è un intermedio. Risulta essere resistente all'attacco microbiologico, in particolare dei batteri lattici, a differenza di altri acidi organici non volatili come l'acido tartarico, malico e citrico. L'acido succinico è quindi il principale acido non volatile prodotto durante la fermentazione del vino.

Altri acidi organici non volatili sono l'acido tartarico e malico, che rappresentano il 90% dell'acidità titolabile (TA) del succo d'uva. Gli acidi citrico e lattico contribuiscono all'acidità del succo d'uva (*Romano P. et al., 2019*).

Molti altri acidi vengono rilasciati nel vino da *S. cerevisiae*, come acido lattico, isovalerico e isobutirrico, acidi grassi, ma questi sono presenti in quantità minime (Zamora F., 2009).

CAPITOLO 2: Scopo del lavoro

In enologia l'uso di colture starter di ceppi di *S. cerevisiae* è una pratica ampiamente diffusa in quanto permette un rapido avvio della fermentazione, un efficace controllo della durata del processo di fermentazione al fine di garantire la qualità organolettica del vino. Tale pratica permette di ottenere numerosi vantaggi, con una produzione di vini con caratteristiche riproducibili e costanti, ma con una certa uniformità organolettica e “appiattimento sensoriale”. In conseguenza di quanto detto in precedenza, in questo lavoro di ricerca si è valutata la selezione di 22 ceppi di *Saccharomyces* appartenenti a diverse specie, isolati da ambienti naturali e analizzati dal punto di vista tecnologico. Sono state valutate le attitudini fermentative, l'andamento fermentativo, i principali caratteri enologici, alcuni metaboliti secondari e i composti volatili, in due diverse condizioni fermentative, a 16°C e a 22°C, con l'obiettivo di individuare e selezionare ceppi di lieviti *S. cerevisiae* nativi e legati al territorio, che abbiano ottime attitudini enologiche e proprietà peculiari, così da poterli utilizzare in campo enologico nelle zone di produzione specifiche in modo da ottenere vini con un profilo sensoriale peculiare legato alla tipicità della zona di produzione.

CAPITOLO 3: Materiali e metodi

3.1 Ceppi

Per il seguente lavoro sono stati selezionati ceppi di lievito appartenenti al genere *Saccharomyces*, in particolare le specie *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* e *S. paradoxus*, isolati da matrici differenti (Tabella 1).

I ceppi di lievito impiegati in questo studio provengono dalla collezione presente nel Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA), dalla collezione del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Perugia (DBVPG) e dalla Azienda olivivinicola Giulia Florentini (Cupramontana, Marche).

I ceppi sono stati crioconservati in terreno contenente glicerolo (80%) a -80°C, poi rinfrescati su terreno YPD agar (10 g/L di estratto di lievito, 20 g/L di peptone, 20g/L di glucosio e 18g/L agar) e conservati a 4°C.

Lo studio è basato su uno screening effettuato a due differenti temperature, uno screening a 22°C e uno screening a 16°C e per entrambi si sono utilizzati come ceppi di controllo, *S. cerevisiae* starter commerciali: OKAY, EC1118, VIN13, PLATINUM.

Specie	Codice	Provenienza
<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	OKAY	Starter del commercio
<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	EC1118	Starter del commercio
<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	VIN13	Starter del commercio

<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	PLATINUM	Starter del commercio
<i>S. cerevisiae</i>	151	Disva 705
<i>S. cerevisiae</i>	G ₄	Reincrocio spore del ceppo 151
<i>S. cerevisiae</i>	I ₁	Reincrocio spore del ceppo 152
<i>S. cerevisiae</i>	I ₄	Reincrocio spore del ceppo 153
<i>S. cerevisiae</i>	B ₄	Reincrocio spore del ceppo 154
<i>S. bayanus</i>	7v	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
<i>S. bayanus</i>	8c	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
<i>S. cerevisiae</i>	8	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	2	Cantina Giulia, Mosto Verdicchio
<i>S. cerevisiae</i>	MAF 1.1	Madre acida 1
<i>S. cerevisiae</i>	MAF 1.2	Madre acida 1
<i>S. cerevisiae</i>	MAF 2.2	Madre acida 2
<i>S. cerevisiae</i>	S.c.	Uva convenzionale 11C T16
<i>S. cerevisiae</i>	132 S.c.	Uva biologica 1B T16
<i>S. cerevisiae</i>	129 S.c.	Uva biologica 5B T16

<i>S. cerevisiae</i>	130 S.c.	Uva convenzionale 9C T16
<i>S. cerevisiae/Bayanus</i>	MAF 1.7	Madre acida 1
<i>S. cerevisiae/Bayanus</i>	MAF 1.8	Madre acida 1

Tab. 1- Elenco dei ceppi di lievito utilizzati nelle prove

3.2 Precolture

Per la preparazione delle fermentazioni sono state allestite delle precolture su YPD modificato (5g/L di estratto di lievito, 1g/L di peptone, 20g/L di glucosio), lasciate incubare per 48h a 20°C. Successivamente al periodo di incubazione è stata effettuata una centrifugazione, a 4000 rpm per 5 minuti, per raccogliere le cellule e successivamente risospenderle con acqua sterile procedendo quindi con l'inoculo nel mosto di Verdicchio desolforato. L'inoculo del mosto è stato eseguito calcolando la concentrazione cellulare delle precolture mediante conta microbica totale con camera conta globuli di Thoma, da cui si è potuto stimare il volume dell'inoculo alla concentrazione desiderata (1×10^6 cell/ml), sia per la fermentazione a 22°C sia per la fermentazione a 16°C.

3.3 Preparazione del Biggy Agar

Per osservare la produzione di idrogeno solforato da parte dei diversi ceppi di lieviti viene utilizzato il terreno Biggy Agar (1g/L di estratto di lievito, 10 g/L di destrosio, 10g/L di glicina e 20g/L di agar, 6g/L di solfito di sodio e bismuto ammonio citrato 2g/L). Nel terreno avverrà una reazione tra il solfito di sodio e il bismuto ammonio

citrato producendo solfito bismuto; molti ceppi di lievito poi in fermentazione riescono a ridurre il solfito bismuto e nel processo vengono prodotte quantità apprezzabili di solfuro che si combinano con il bismuto per precipitare o conferire un colore bruno nero alle colonie nel terreno. I lieviti verranno quindi piastrati formando uno spot sul terreno, lasciati incubare ad una temperatura di circa 22°C, per alcuni giorni, così da monitorare la produzione di idrogeno solforato; ma ogni lievito produrrà quantitativi diversi del composto, per questo ogni spot corrispondente ad un diverso lievito, assumerà una colorazione differente che va dal colore bianco/beige al marrone scuro/nero, ciò permetterà di identificare le specie produttrici e non produttrici di idrogeno solforato, rapportando il colore osservato per ogni lievito, con una scala colorimetrica indicativa (Figura 1 e figura 2).

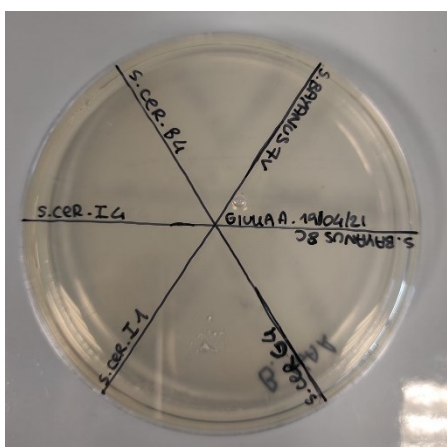


Fig.-1. Lieviti piastrati su terreno Biggy Agar

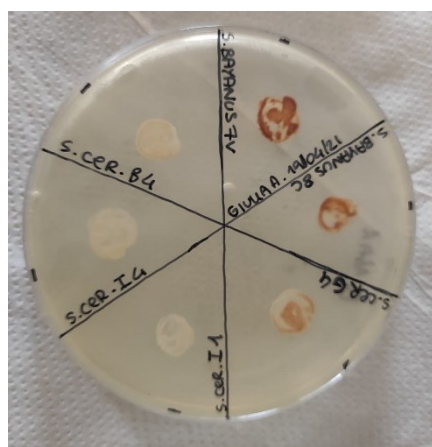


Fig 2- Lieviti piastrati su terreno Biggy Agar e lasciati incubare alla temperatura di circa 22°C per 4 giorni

3.4 Il mosto

Il mosto utilizzato in questa procedura è un mosto Verdicchio desolfurato proveniente dalla vendemmia dell'anno 2020. La composizione iniziale del mosto prevede: tenore iniziale di zucchero 201 g/L, pH 3,25, acidità totale 6,34 g/L e contenuto di azoto assimilabile dal lievito (YAN) 98 mgN/L. Lo YAN è stato regolato a 250 mgN/L mediante l'aggiunta di fosfato diammonio e derivato del lievito (Genesis Lift Oenofrance, Bordeaux, Francia). Il mosto desolfurato è un mosto a cui viene eliminato l'eccesso di anidride solforosa, in precedenza aggiunta in grandi quantità, per ostacolare le fermentazioni, permettendo di conservare meglio il substrato. I 7L di mosto Verdicchio desolfurato posti in un bidone di acciaio, vengono successivamente trattati con dimetildicarbonato, in una quantità di 0,2 ml/L, facendo riposare il tutto per una notte in cella fredda a 4°C. Dopo il tempo di incubazione necessario, per

effettuare le conte vitali sono state eseguite diluizioni seriali del mosto desolfurato trattato con dimetildicarbonato (Figura 3) e del mosto desolfurato non trattato (Figura 4), per poi svolgere una conta culturale microbiologica di tutte le diluizioni ottenute con entrambi i mosti, su di un terreno differenziale WL, per verificare l'efficacia del trattamento con dimetildicarbonato. Per le diluizioni seriali è stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo così una diluizione 1:10 (10^{-1}). Dopo aver miscelato il contenuto della provetta con agitatore magnetico, si è prelevato da questa 1 ml di liquido e posto in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione desiderata di 10^{-5} . Successivamente sono stati trasferiti 100 μ L di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno YPD. Si prende poi una bacchetta di vetro ad "L"; la si immerge in alcool, si passa alla fiamma per asciugarla e la si fa raffreddare sul bordo della piastra e si procede allo spatolamento per diffusione cellulare. Le piastre sono messe poi ad incubare a temperatura ambiente per due o tre giorni. Dopo il periodo di incubazione sono state conteggiate le colonie cresciute.

Il terreno di coltura WL Nutrient Agar è un terreno molto ricco di nutrienti che consente di ottenere un numero maggiore di informazioni rispetto ad altri terreni di coltura utilizzati in microbiologia e permette la crescita delle principali specie di lievito presenti nel mosto. Le colonie di lievito quando crescono su questo terreno assumono colorazione e/o morfologia diverse per cui sono facilmente riconoscibili. Nella maggior parte dei casi, il WL Nutrient Agar permette di definire il genere dei lieviti

caratterizzanti il mosto analizzato, ma non permette una distinzione della specie. Il WL è uno strumento utile per monitorare la diversità nella popolazione dei lieviti durante la fermentazione e per individuare suoi eventuali cambiamenti quando vengono applicate particolari condizioni di processo. Il terreno è disponibile come miscela già pronta in polvere, che può essere facilmente pesata, disciolta in acqua, sterilizzata in autoclave a 121 °C e distribuita nelle capsule Petri. Il WL Nutrient Agar (Oxoid) 75 g/l così composto:(Estratto di lievito 4 g/l; Triptone 5 g/l; Glucosio 50 g/l; KH₂PO₄ 0.55 g/l; KCl 0.425 g/l; CaCl₂ 0.125 g/l; MgSO₄ 0.125 g/l; FeCl₃ 0.0025 g/l; MnSO₄ 0.0025 g/l; Verde di Bromocresolo 0.022 g/l; Agar-agar 15 g/). Dopo il necessario tempo di incubazione delle piastre a temperatura ambiente, si è potuto osservare la microflora presente nel mosto desolfurato non trattato e si è potuto osservare l'efficacia che ha avuto il trattamento sul mosto che sarà poi usato per le fermentazioni.

Fig.3- Mosto desolfurato con trattamento di Dimetildicarbonato

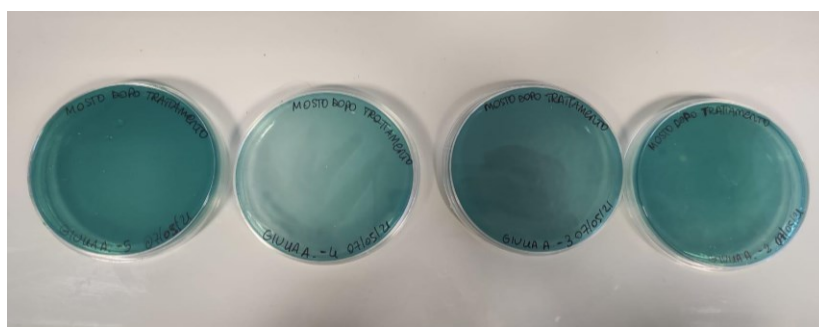
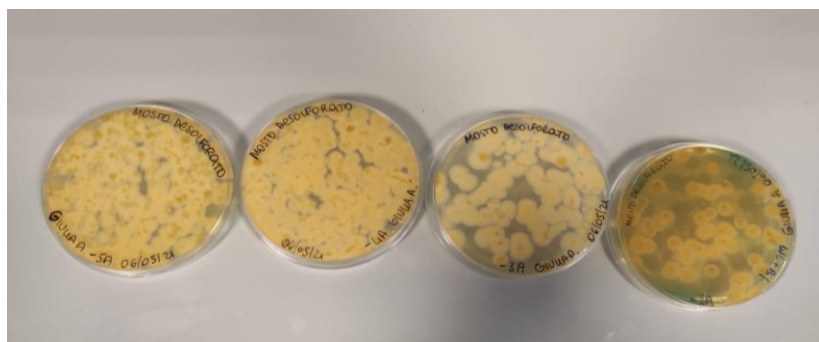


Fig.4- Mosto desolfurato senza trattamento con Dimetildicarbonato



3.5 Condizioni fermentative

3.5.1 Fermentazione a 22°

La fermentazione a 22° è stata allestita in condizione di sterilità, utilizzando i 7L di mosto Verdicchio desolfurato, su cui poi sono state allestite microfermentazioni su un volume di 70 ml (Figura 5), con tappi sterili che evitano la contaminazione del sistema. La fermentazione a 22°C ha avuto una durata di 17 giorni, registrando giornalmente la diminuzione di peso dovuta alla perdita di CO₂, fino ad ottenere un valore costante. Per ogni beuta predisposta viene applicata, una strip di acetato di piombo per il monitoraggio della produzione di idrogeno solforato. Ogni ceppo di lievito infatti durante la fermentazione, produrrà quantità diverse di idrogeno solforato e in base alla quantità prodotta la strip di acetato, assumerà una colorazione diversa. Le specie maggiormente produttrici svilupperanno colorazioni che andranno dal marrone chiaro al marrone scuro, a differenza delle specie non produttrici che non svilupperanno colore. Ogni volta che la cartina sviluppa colore, viene sostituita, e ciò è avvenuto per tutta la durata della fermentazione.



Fig.5- Fermentazione a 22°C

3.5.2 Fermentazione a 16°

La seconda fermentazione è stata allestita allo stesso modo della prima, ma ad una temperatura inferiore, ovvero a 16°C (Figura 6). In questo caso la fermentazione ha avuto una durata di 21 giorni ed è stata monitorata registrando quotidianamente la perdita di peso. Lo stesso procedimento è stato utilizzato anche per l'applicazione delle strip di acetato di piombo (Figura 7).



Fig.6- Fermentazione a 16°C

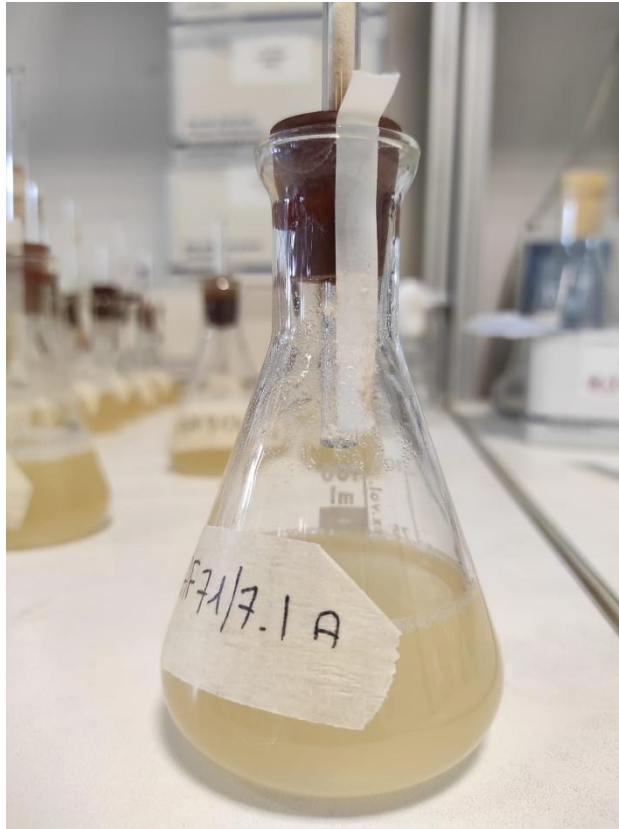


Fig.7- Applicazione delle strip di acetato di piombo per osservare la produzione di idrogeno solforato

3.6 Analisi microbiologiche

L'evoluzione delle fermentazioni viene monitorata per via gravimetrica registrando giornalmente la perdita in peso, espressa come grammi di CO₂ svolta. Il calo in peso è stato monitorato fino al termine della fermentazione (peso costante per tre giorni consecutivi) e la quantità di CO₂ prodotta è stata utilizzata per esprimere l'attività fermentativa. Nelle microfermentazioni gli inoculi sono nell'ordine di grandezza di 10⁶ cell/ml per entrambe le fermentazioni, valori su cui poi sono stati calcolati gli effettivi inoculi partendo dalle conte con la camera di Thoma. Gli inoculi sono stati verificati tramite le diluizioni seriali. È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo così una diluizione 1:10 (10⁻¹). Dopo aver miscelato il contenuto della provetta con agitatore magnetico, si è prelevato da questa 1 ml di liquido e posto in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione desiderata di 10⁻⁴. Successivamente sono stati trasferiti 100 µl di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno YPD. Si prende poi una bacchetta di vetro ad "L"; la si immerge in alcool, si passa alla fiamma per asciugarla e la si fa raffreddare sul bordo della piastra e si procede allo spatolamento per diffusione cellulare (Figura 8). Le piastre sono messe poi ad incubare a temperatura ambiente per due o tre giorni. Dopo il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute.

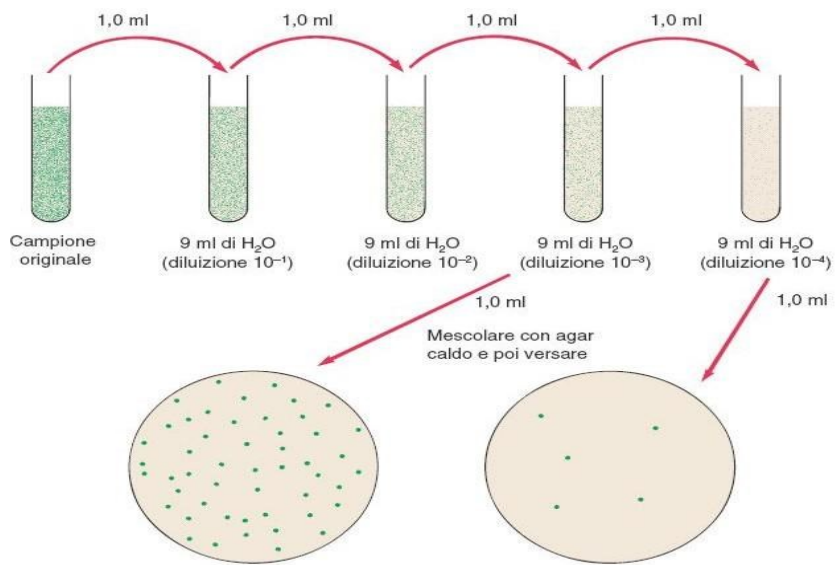


Fig.8- Diluizioni seriali

3.7 Analisi chimiche

3.7.1 Determinazione dell'anidride solforosa

La quantità di SO₂ presente in un campione è stata determinata con la metodica di riferimento:

- si versano in una beuta da 1000 ml, 50 ml di campione, si aggiungono 3 ml di H₂SO₄ al 10 % e 5 ml di Salda d'amido all'1%;
- si titola con iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione azzurra (si indica con a il volume in ml di Iodio aggiunto);
- si retrotitola con Na-tiosolfato N-200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto);
- si aggiungono 8 ml di NaOH 4 N, si attendono 5 minuti a beuta chiusa e si aggiungono 10 ml di H₂SO₄ al 10 %;
- si titola con Iodio N/20(0,05 N) fino a colorazione azzurra (si indica con a' il volume in ml di Iodio aggiunto);
- si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b' il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto);
- si aggiungono 20 ml di NaOH 4 N (si attendono 5 minuti a beuta chiusa), circa 200 ml di acqua fredda e 30 ml di H₂SO₄ al 10 %;
- si titola con Iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione azzurra (si indica con a'' il volume in ml di Iodio aggiunto);

- si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica b'' il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto).

Con le seguenti formule è possibile calcolare la solforosa presente nel campione (in mg/l):

$$\text{SO}_2 \text{ libera} = (a - 0,1 \times b) \times 32$$

$$\text{SO}_2 \text{ combinata} = (a' - 0,1 \times b') \times 32 + (a'' - 0,1 \times b'') \times 32$$

$$\text{SO}_2 \text{ totale} = \text{SO}_2 \text{ libera} + \text{SO}_2 \text{ combinata}$$

3.7.2 Analisi acidità volatile

La determinazione dell'acidità volatile (espressa in g/l di acido acetico) è stata effettuata mediante distillazione in corrente di vapore con l'acidimetro Juffman (figura 9). Tale apparecchio, che funziona elettricamente e che opera su 5 ml di vino, è composto dalle seguenti parti:

- recipiente per la raccolta del vino esausto e delle acque di lavaggio dopo l'analisi;
- beuta contenente acqua distillata per la generazione del vapore acqueo, scaldata da una piastra elettrica, provvista di un tappo a due fori; attraverso un foro passa il tubo di sicurezza, che serve anche per riempire la beuta, nell'altro foro è inserita una valvola;
- valvola per indirizzare il flusso di vapore o all'esterno (prima che inizi l'analisi) o dentro il palloncino di distillazione in corrente di vapore (durante l'analisi);

- palloncino da distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori;
- mantello scaldante o piastra elettrica per scaldare il palloncino di distillazione in corrente di vapore;
- refrigerante;
- beuta di raccolta del distillato.

Si mette l'acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo per metà o poco più del suo volume e si innesta la corrente elettrica della piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Poi si attiva il refrigerante e si mette il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di esce all'esterno del tubo di sicurezza, si mette nel palloncino di distillazione in corrente di vapore 5 ml di vino prelevati in modo esatto con una pipetta precedentemente avvinata. Successivamente si chiude con l'apposito tappo il palloncino e si accende il mantello riscaldante per scaldare il vino. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa il vino in ebollizione. Si distilla 40 ml di distillato, facendo attenzione che il livello del vino all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, si abbassa il mantello scaldante o addirittura si spegne momentaneamente. Terminata la distillazione, si spegne il mantello scaldante il palloncino e si riporta la valvola nella posizione di partenza, in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; poi si aspira il vino esausto e le acque di lavaggio del palloncino nel recipiente di raccolta degli scarti. Alla fine si fa la determinazione dell'acidità volatile attraverso una titolazione

acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0,02N) in una buretta e 3 gocce di fenolftaleina come indicatore aggiunto nel beker del campione in modo tale da effettuare il viraggio del campione in un colore rosso vivo.



Fig.9- Acidimetro di Juffman

3.7.3 Determinazione dell'acetaldeide

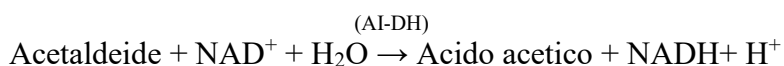
Per la determinazione dell'acetaldeide è stato utilizzato un kit enzimatico della ditta Roche.

Il kit con cui si effettua l'analisi è composto da:

1. Bottiglia 1 con 100 ml di soluzione formata dal tampone di potassio difosfato con PH 9
2. Bottiglia 2 con 30 compresse e ogni compressa contiene NAD 0,8 mg
3. Bottiglia 3 (presente in quantità di 3 bottiglie) con liofilizzato di aldeide deidrogenasi, 4U ciascuna

Principio

L'acetaldeide viene ossidata quantitativamente ad acido acetico in presenza di aldeide deidrogenasi (AI-DH) e nicotinammide adenina dinucleotide (NAD).



La quantità di NADH formata è stechiometrica alla quantità di acetaldeide. NADH è determinata con assorbanza a 334, 340 o 365 nm.

Modalità di esecuzione

Sono state preparate una serie di cuvette, utilizzate per la successiva lettura allo spettrofotometro, con bianco e campioni, dove sono state aggiunte le seguenti quantità:

	Bianco	Campione
Acqua distillata (a circa 25°)	0,2 ml	–
Campione	--	0,2 ml
Soluzione 2	3 ml	3 ml

La cuvetta è stata agitata manualmente, con l'aiuto di un parafilm, e fatta riposare per 3 minuti. Trascorso questo tempo si è passati alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro, a 340 nm, ottenendo il valore della prima assorbanza (A1). In seguito, sono stati aggiunti, a ciascuna cuvetta, 0,050 ml della *soluzione 3*; ogni cuvetta è stata nuovamente agitata, capovolgendola delicatamente, e dopo un'attesa di 5 minuti si è passati alla lettura della seconda assorbanza (A2), sempre a 340 nm.

Calcoli:

Determinare le differenze di assorbanza A2-A1 per il bianco e per il campione. Sottrarre la differenza di assorbanza del bianco dalla differenza di assorbanza del campione.

$$\Delta A = (A2-A1)_{\text{campione}} - (A2-A1)_{\text{bianco}}$$

Una volta ottenute le diverse assorbanze, per determinare in g/l la concentrazione dell'acetaldeide è stata applicata la formula sotto riportata:

$$c = 3,250 \times 44,05 / \epsilon \times 1,00 \times 2,00 \times 1000 \times \Delta A = 0,7158 / \epsilon \times \Delta A \text{ (g di acetaldeide/l di soluzione campione)}$$

Se il campione è stato diluito durante la preparazione il risultato deve essere moltiplicato per il fattore di diluizione F.

3.7.4 Determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili

Per la determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili (azoto α -aminico) sono stati prelevati da ogni campione 50 μ l di mosto e posti in una cuvetta di metil acrilato (1 cm di lunghezza e 4,5 ml di capacità), a cui successivamente sono stati aggiunti 3 ml di soluzione **NOPA**. Le cuvette sono state ricoperte con parafilm e agitate. Il bianco è stato preparato aggiungendo 50 μ l di acqua deionizzata con l'aggiunta di 3 ml di soluzione **NOPAW**. Dopo 10 minuti, si è effettuata la lettura nell'UV-Vis a 335 nm a temperatura ambiente (22-25 °C). L'assorbanza netta è stata calcolata sottraendo il bianco al campione.

La concentrazione degli aminoacidi è stata calcolata sulla base di una retta di taratura secondo la metodica descritta da Dukes & Butzke (1998).

Soluzione NOPA

0,336 g di OPA (orto-ftaldialdeide), sono stati sciolti in etanolo e portati a volume a 50 ml.

A questa soluzione alcolica, è stata addizionata una soluzione acquosa contenente:

- 1,919 g di NaOH al 98 %
- 4,234 g di Acido Borico al 99 %
- 0,408 g di Nac (N-acetil-L-cisteina)

e portata a volume in pallone tarato da 500 ml con acqua deionizzata la soluzione aveva un pH approssimativo di 9.5.

La soluzione NOPA è stabile a 4 °C per almeno tre settimane.

Soluzione NOPAW

Stessa soluzione senza OPA.

3.7.5 Determinazione dell'ammonio

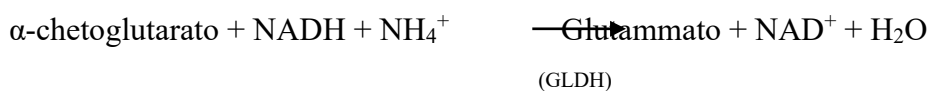
Per la determinazione dello ione ammonio ho utilizzato un kit enzimatico della ditta Roche.

La confezione del kit conteneva:

- un flacone con all'interno 50 tavolette di NADH (circa 0,4 mg di NADH per ogni tavoletta);
- un flacone con 60 ml di buffer e α -chetogluatarato (pH 8.0);

- un flacone contenente una soluzione di glutammato deidrogenasi (1,2 ml);
- un flacone con una soluzione di controllo.

La determinazione della concentrazione dello ione ammonio si basa sull'amminazione riduttiva dell' α -chetoglutarato, ad opera della glutammato deidrogenasi (GLDH) e della forma ridotta della nicotinamide adenin dinucleotide (NADH) secondo l'equazione:



Modalità di esecuzione:

Per ogni campione da analizzare abbiamo sciolto una tavoletta di NADPH in 1 ml di buffer (miscela di reazione). Nel frattempo, sono state preparate una serie di cuvette: bianco, campione 1, campione 2, ecc... nelle quali sono state aggiunte le seguenti quantità:

	BIANCO	CAMPIONE	CONTROLLO
Miscela di reazione	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Campione	-	100 μ l	-
Acqua	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml
Soluzione di controllo	-	-	100 μ l

Le cuvette sono state poi ricoperte con parafilm ed agitate, dopodiché sono state fatte riposare per 5 minuti ad una temperatura di circa 20-25 °C ed è stata letta l'assorbanza a 340 nm. Successivamente ad ogni cuvetta sono stati aggiunti 20 μ l di soluzione contenente la

glutammato deidrogenasi; dopo averle agitate, capovolgendole dolcemente, si è atteso un tempo di circa 20 minuti affinché la reazione fosse completata ed è stata letta ed annotata l'assorbanza finale a 340 nm.

Calcoli

$$\Delta A = A_{\text{iniziale}} - A_{\text{finale}}$$

$$\text{Concentrazione ammonio (g/l)} = (\Delta A_{\text{campione}} - \Delta A_{\text{bianco}}) \times 0,0816$$

$$\text{Controllo (g/l)} = (\Delta A_{\text{controllo}} - \Delta A_{\text{bianco}}) \times 0,0816$$

3.7.6 Determinazione dell'etanolo

La preparazione del campione prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 μm , a cui si aggiunge uno standard interno l'1-pentanololo alla concentrazione di 100 μl . A questo punto 1 μl di campione viene iniettato direttamente nel gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma, utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150 °C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 μm);
- iniettore: split 10:2; iniettato 1 μl di campione;

- temperatura: 40°C per 5 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma di 200°C per 1 minuto;
- gas vettore: Elio

3.7.7 Determinazione dei volatili

La valutazione della componente volatile è stata determinata mediante la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). La SPME è una tecnica che può essere eseguita secondo due tipologie: ad immersione diretta SPME (DI-SPME) o in spazio di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita secondo la tipologia della tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME) utilizzando la fibra a tripla fase (Figura 10) *divinilbenzene (DVB)/ carboxen (CAR)/ polidimetilsilossano (PDMS)*.



Fig. 10- fibra a tripla fase divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano

Una piccola aliquota di campione (5 ml) viene posta in una vial con tappo di teflon, dove viene aggiunto 1 g di NaCl e il tutto viene posto in agitazione su di un agitatore meccanico, per 10 minuti. Dopo questa sosta si aggiunge lo standard interno, che per la rilevazione della componente volatile è il 3-ottanolo, viene poi inserita la siringa attraverso il tappo e spinta la fibra. L'intero sistema viene posto in termostato a 50°C per 40 minuti. Con la fibra pronta si è passati all'analisi mediante gas-cromatografia (GC). L'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo sempre con la fibra retratta; è stato premuto lo stantuffo, esponendo la fibra nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna; il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è stato di circa 5 minuti, per far in modo che tutti gli analiti avessero il tempo di essere desorbiti. Infine, la fibra è stata retratta in ago e l'ago rimosso.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

-temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;

-colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);

-iniettore: splitless 60 sec.;

-temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;

-gas vettore: Elio.

3.7.8 Determinazione del D-glucosio e del D-fruttosio

La determinazione degli zuccheri residui, fruttosio e glucosio espressi in g/l, è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico della ditta Megazyme.

Il kit contiene:

- Bottiglia 1: Buffer (100 ml, pH 10,0) + sodio azide (0,02% w/v), come conservante.
- Bottiglia 2: Compresse di prova (60) contenenti NADP⁺, ATP, INT e FAD.
- Bottiglia 3: Esochinasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, fosfoglucoisomerasi e sospensione diaforasi 1,3 ml.
- Bottiglia 4: Soluzione standard D-fruttosio (5 ml, 0,50 mg / ml) in 0.02% w / v di sodio azide.
- Bottiglia 5: Compresse (65) contenenti PVPP.

Principio

Il D-glucosio e D-fruttosio sono fosforilati dall'enzima esochinasi (HK) e adenosina-5'-trifosfato (ATP) a glucosio 6-fosfato (G-6-P) e fruttosio-6-fosfato (F-6-P) con la contemporanea formazione di adenosina-5'-difosfato (ADP) (1),(2).

(HK)

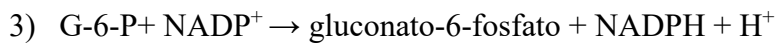


(HK)

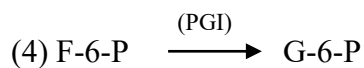


In presenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH), il G-6-P viene ossidato dal nicotinamide-adenina dinucleotide fosfato (NADP⁺) a gluconato-6-fosfato con formazione di nicotinamide-adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH). (3)

(G6P-DH)



La quantità di NADPH formata in questa reazione è stechiometrica con la quantità di D-glucosio. È il NADPH che viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm. Al completamento della reazione (3), F-6-P viene convertito in G-6-P dalla fosfoglucoisomerasi (PGI) (4).



Il G-6-P formato reagisce a sua volta con NADP⁺ formando gluconato-6 fosfato e NADPH, portando ad un ulteriore aumento dell'assorbanza stechiometrico con la quantità di D-fruttosio.

Modalità di esecuzione

Nel primo passaggio i campioni sono stati diluiti 1:5 con acqua deionizzata all'interno di matracci. Sono state poi preparate una serie di cuvette, utilizzate per la successiva lettura allo spettrofotometro, con bianco e campioni, dove sono state aggiunte le seguenti quantità:

	Bianco	Campione
Acqua distillata (a circa 25°)	1 ml	1 ml
Campione	--	50 µl
Soluzione 1	50 µl	50 µl
Soluzione 2	50 µl	50 µl

La cuvetta è stata agitata manualmente, con l'aiuto di un parafilm, e fatta riposare per 3 minuti. Trascorso questo tempo si è passati alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro, a 340 nm, ottenendo il valore della prima assorbanza (A1). In seguito, sono stati aggiunti, a ciascuna cuvetta, 10 µl della *soluzione 3*; ogni cuvetta è stata nuovamente agitata, capovolgendola delicatamente, e dopo un'attesa di 5 minuti si è passati alla lettura della seconda assorbanza (A2), sempre a 340 nm. Infine, sono stati aggiunti 10 µl della *soluzione 4*, dopo aver agitato la cuvetta e trascorsi 8-10 minuti si è arrivati alla lettura della terza ed ultima assorbanza a 340 nm (A3).

Calcoli:

Una volta ottenute le 3 diverse assorbanze, per determinare in g/l la concentrazione di glucosio e fruttosio, sono state applicate rispettivamente le due formule sotto riportate:

- $\Delta A_1 = A_2 - A_1$

- Concentrazione del glucosio in g/l =**

$$[\Delta A_1 - 0,001(\text{bianco})] \times 0,6634 \times 5 \text{ (fattore di diluizione)}$$

3. $\Delta A_2 = A_3 - A_2$

4. **Concentrazione del fruttosio in g/l =**

$[\Delta A_2 - 0,03(\text{bianco})] \times 0,6692 \times 5$ (fattore di diluizione)

CAPITOLO 4: Risultati

La valutazione delle attitudini fermentative dei diversi ceppi del genere *Saccharomyces* sul prodotto finale è stata valutata analizzando i seguenti parametri: produzione di idrogeno solforato, cinetica fermentativa, anidride solforosa, acidità volatile, acetaldeide, azoto prontamente assimilabile (APA), etanolo e zuccheri residui.

4.1. Produzione di idrogeno solforato

L'impiego dei lieviti *S. cerevisiae* durante la fermentazione non determina solo la produzione di etanolo e anidride carbonica, dal catabolismo degli zuccheri, ma anche la produzione di altri composti, alcuni dei quali ritenuti responsabili di odori sgradevoli, tra cui l'idrogeno solforato (H_2S). La produzione di questo composto da parte dei lieviti oltre ad essere una caratteristica ceppo specifica, viene influenzata dalla composizione nutrizionale del mezzo. Vengono evidenziati dei legami con la carenza di nutrienti come l'azoto assimilabile e le vitamine o con qualsiasi cambiamento rapido delle condizioni di crescita o delle cinetiche (*Jiranek V.,2002*).

I risultati relativi alla produzione di idrogeno solforato sono mostrati in figura 1 e riportati in scala numerica nella tabella 1. Ad ogni lievito viene assegnato un numero, indicato sulla piastra, corrispondente al valore della scala colorimetrica.

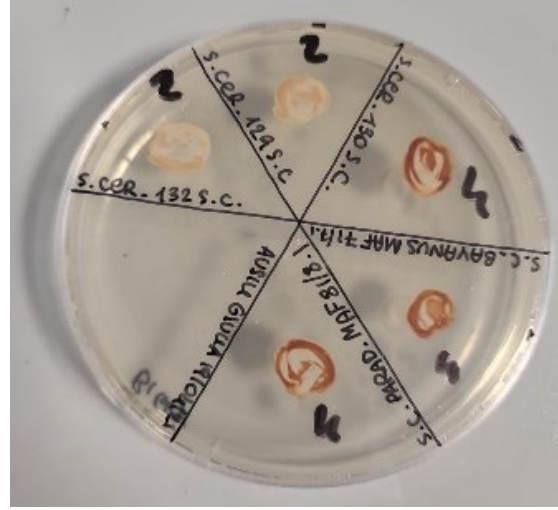
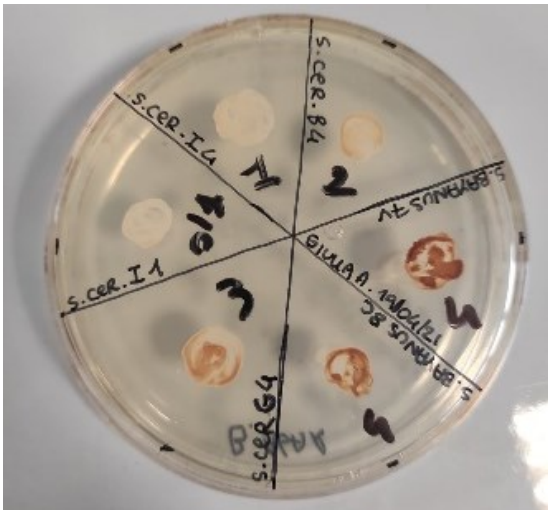
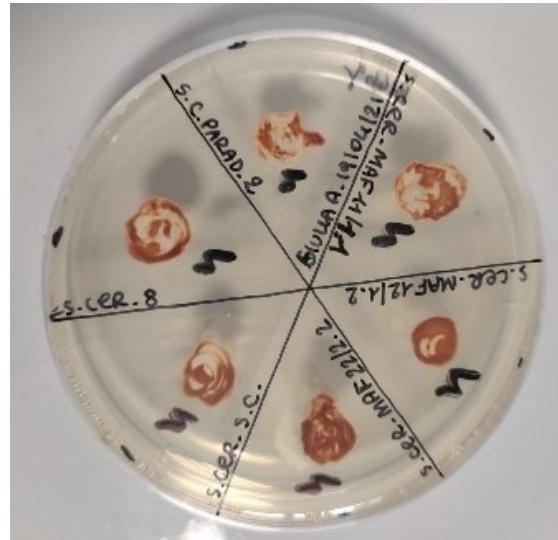
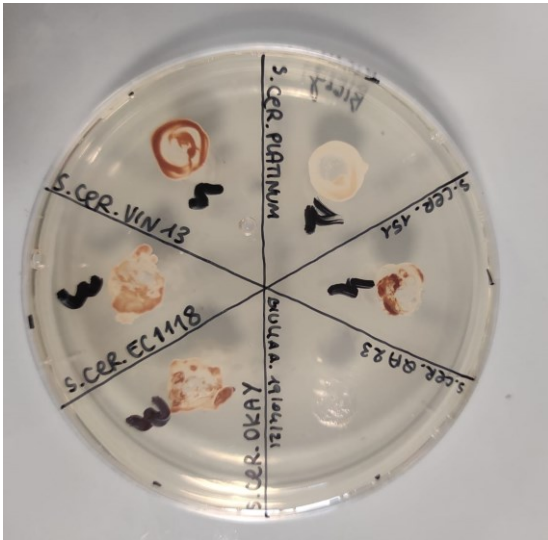


Fig.1- lieviti piastrati su Biggy agar e lasciati incubare alla temperatura di circa 22°C per 4 giorni

Dai risultati ottenuti si può dedurre che *S. cerevisiae* VIN13, 151, 8, 2, MAF 1.2, MAF 2.2, S.c., 130 S.c., MAF 1.7, MAF 1.8 e *S. bayanus* 7v e 8c sono risultati essere produttori di H₂S, considerando la colorazione marrone scura assunta dagli spot corrispondenti ad ognuno di questi lieviti, a cui per tale motivo, viene assegnato il valore numerico 4, che nella scala colorimetrica corrisponde a lieviti che producono elevate quantità del composto. Mentre i ceppi di *S. cerevisiae* PLATINUM, I₁, I₄, B₄, 132 S.c., 129 S.c., possono essere classificati come assenti o basso produttori di idrogeno solforato; infatti, essi presentano una colorazione degli spot bianco/beige e di conseguenza presentano un valore numerico pari a 0 e/o 1 nella scala colorimetrica. Questi ultimi ceppi bassi produttori di H₂S sono più apprezzabili, a livello enologico in condizioni di vinificazione particolarmente ridotte. *S. cerevisiae* OKAY, EC1118 e G₄, risultano essere produttori intermedi di H₂S, assumono una colorazione intermedia degli spot corrispondente a marrone e una valutazione numerica pari a 3.

CODICE CEPPI	SCALA NUMERICA BASATA SUL BIGGY AGAR
<i>S. cerevisiae</i> OKAY	3
<i>S. cerevisiae</i> EC1118	3
<i>S. cerevisiae</i> VIN13	4
<i>S. cerevisiae</i> PLATINUM	0-1
<i>S. cerevisiae</i> 151	4
<i>S. cerevisiae</i> G ₄	3
<i>S. cerevisiae</i> I ₁	0-1
<i>S. cerevisiae</i> I ₄	0-1
<i>S. cerevisiae</i> B ₄	2
<i>S. bayanus</i> 7v	4
<i>S. bayanus</i> 8c	4
<i>S. cerevisiae</i> 8	4
<i>S. bayanus</i> 2	4
<i>S. cerevisiae</i> MAF 1.1	4
<i>S. cerevisiae</i> MAF 1.2	4
<i>S. cerevisiae</i> MAF 2.2	3
<i>S. cerevisiae</i> S.c.	4
<i>S. cerevisiae</i> 132 S.c.	2
<i>S. cerevisiae</i> 129 S.c.	2
<i>S. cerevisiae</i> 130 S.c.	4
<i>S. cerevisiae</i> MAF 1.7	4
<i>S. cerevisiae</i> MAF 1.8	3

Tab. 1- valori numerici assegnati ai vari lieviti in base alla scala colorimetrica indicativa

4.2. Valutazione della produzione di idrogeno solforato durante la fermentazione

Durante la valutazione dei singoli ceppi *S. cerevisiae*, necessaria per analizzare le loro caratteristiche, un'ulteriore modalità utilizzata per determinare la produzione di idrogeno solforato da parte dei vari ceppi, è stata quella di utilizzare delle strip di acetato di piombo durante la fermentazione. Le strip vengono applicate nelle beute fin dal primo giorno di fermentazione, questo perché durante il processo fermentativo ogni lievito può produrre quantità diverse di idrogeno solforato e in base alla quantità prodotta la cartina si colorerà in modo diverso. Le specie che producono quantità elevate del composto, tenderanno a produrre una colorazione che va dal marrone chiaro al marrone scuro/nero, mentre le specie non produttrici, non svilupperanno nessun tipo di colorazione. Ogni volta che le strip di acetato, sviluppano colore, vengono cambiate e monitorate di nuovo, e questo avviene per tutta la durata della fermentazione (figura 2, 3, 4). L'applicazione delle strip di acetato di piombo, nelle varie beute è avvenuta sia durante la fermentazione svolta a 16°C sia durante quella svolta a 22°C, questo permette di identificare le specie maggiormente produttrici del composto ad entrambi le temperature di fermentazioni.

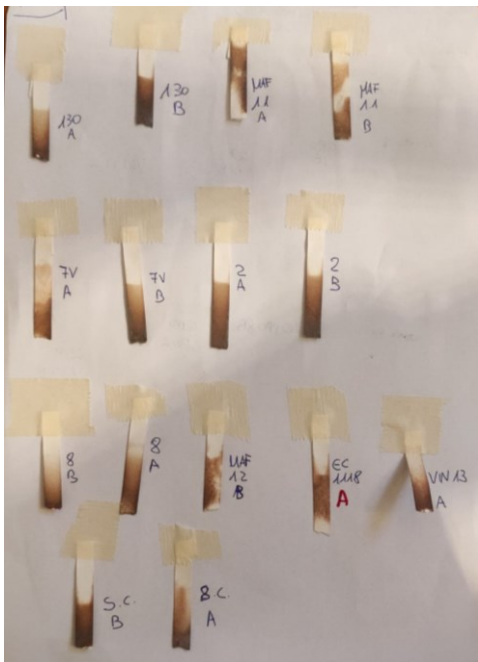


Fig. 2- esempio di strip di acetato di piombo cambiate, ognuna corrispondente a diversi ceppi di lievito, dopo 4 giorni di fermentazione, alla temperatura di 22°C.

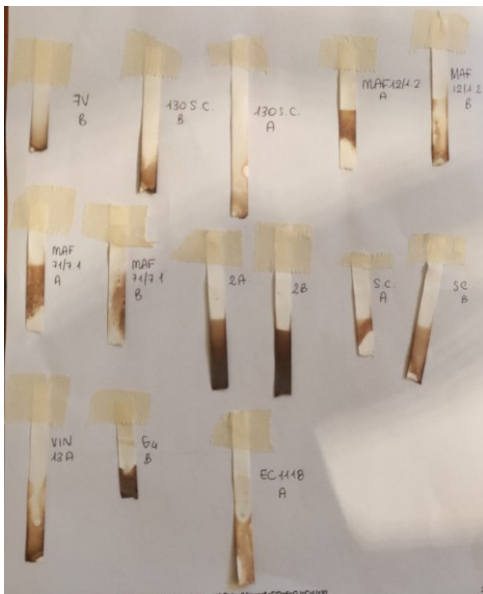


Fig. 3- esempio di strip di acetato di piombo cambiate, ognuna corrispondente a diversi ceppi di lievito, dopo 6 giorni di fermentazione, alla temperatura di 22°C.

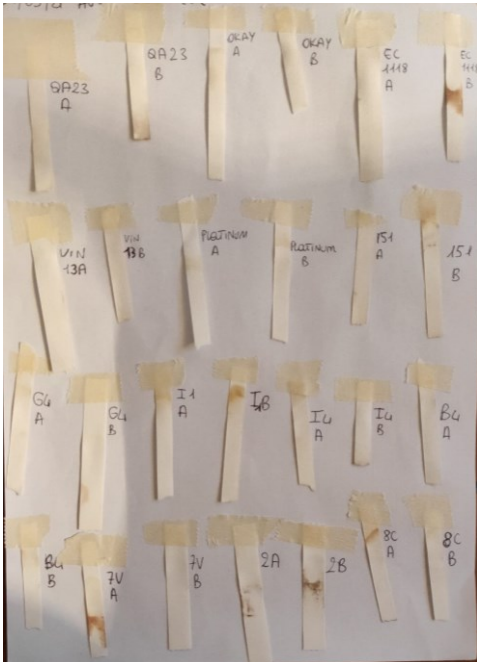


Fig.4- esempio di strip di acetato di piombo, ognuna corrispondente a diversi ceppi di lievito, alla fine della fermentazione, alla temperatura di 22°C

I ceppi di lievito che hanno prodotto una colorazione marrone scura, sulle strip di acetato, dopo tre giorni di fermentazione alla temperatura di 22°C, sono corrispondenti a quei ceppi di lieviti, grandi produttori di H₂S, e risultano essere: *S. cerevisiae*, 2, VIN13, 8, 130 S.c. e *S. bayanus* 7V. A questi lieviti sono state poi cambiate le strip, applicandone di nuove. Dopo quattro giorni di fermentazione, le strip di acetato, cambiate corrispondono a: *S. cerevisiae* EC1118, VIN13, 2, MAF 1.1, MAF 1.2, S.c., 130 S.c. e *S. bayanus* 7V. Dopo otto giorni di fermentazione, le strip cambiate corrispondono a: *S. cerevisiae* EC1118, VIN13, G₄, 8, 2, MAF 1.2, S.c., 130 S.c., MAF 1.7 e *S. bayanus* 7V e 8C. Le valutazioni della produzione di idrogeno solforato in prove di fermentazione, hanno confermato che i ceppi maggiormente produttori di idrogeno solforato sono i ceppi VIN13, 8, 2, MAF 1.2, S.c., 130 S.c., MAF 1.7 e *S. bayanus* 7v e 8C. Anche altri ceppi, se pur in misura minore, hanno prodotto H₂S e sono *S. cerevisiae* EC1118, MAF 1.1, G₄. Mentre per la fermentazione a 16°C, dopo cinque giorni di fermentazione, i ceppi di lievito che hanno prodotto una colorazione marrone scura sulle strip di acetato, quindi corrispondenti a quei ceppi di lieviti, grandi produttori di H₂S, sono: *S. cerevisiae*, 2, S.c., 130 S.c. e *S. bayanus* 7V e 8C. A questi lieviti sono state poi cambiate le strip e applicate strip di acetato nuove. Dopo sei giorni di fermentazione, le strip cambiate corrispondono a: *S. cerevisiae* 2, S.c., 130 S.c. Dopo sette giorni di fermentazione, le strip cambiate corrispondono a: *S. cerevisiae* 2, S.c. Il giorno prima, della fine della fermentazione, le strip cambiate sono corrispondenti a: *S. cerevisiae* 2, S.c. e 130 S.c.. Da questa osservazione si può dedurre che i ceppi maggiormente produttori di idrogeno solforato, alla temperatura di fermentazione di 16°C, sono stati *S. cerevisiae* 2, S.c., 130 S.c.

e *S. bayanus* 7V e 8C e anche in questo caso i ceppi qui indicati corrispondono ad alcuni ceppi determinati con il metodo del Biggy agar.

4.3. Cinetica fermentativa

La cinetica fermentativa dei lieviti analizzati è stata valutata monitorando quotidianamente la perdita di peso, dovuta alla CO₂ svolta. In relazione alla differente temperatura di fermentazione, la cinetica e la durata della fermentazione risultano differenti. La fermentazione a 22° C è durata 17 giorni (Figura 5), mentre la fermentazione a 16° C è durata 21 giorni (Figura 6).

Analizzando la cinetica fermentativa a 22°C di tutti i ceppi di lievito presi in esame per questo lavoro e confrontandola con quella osservata per i quattro ceppi starter commerciali utilizzati, quali *S. cerevisiae* OKAY, EC1118, VIN13 e PLATINUM si nota che la cinetica fermentativa dei ceppi MAF 1.7 e 1.8 (*S. cerevisiae* isolati da madre acida), quindi provenienti dalla stessa matrice, il primo giorno di fermentazione, risulta essere più elevata rispetto agli altri ceppi per poi dal secondo giorno di fermentazione, adattarsi alla cinetica fermentativa degli altri ceppi e uniformandosi ad essi. Una differenza non troppo accentuata viene notata anche nella cinetica fermentativa del ceppo *S. cerevisiae* I₄ (reincrocio spore del lievito 153), dal terzo giorno di fermentazione si nota infatti un più basso andamento fermentativo rispetto all'andamento degli altri ceppi osservati, una cinetica, questa, che rimane differenziata fino al dodicesimo giorno di fermentazione per poi conformarsi fino alla fine della fermentazione alla cinetica fermentativa degli altri ceppi. Mentre per i restanti

ceppi osservati possiamo notare che la cinetica di fermentazione non ha mostrato differenze significative tra i ceppi *S. cerevisiae* e gli starter commerciali.

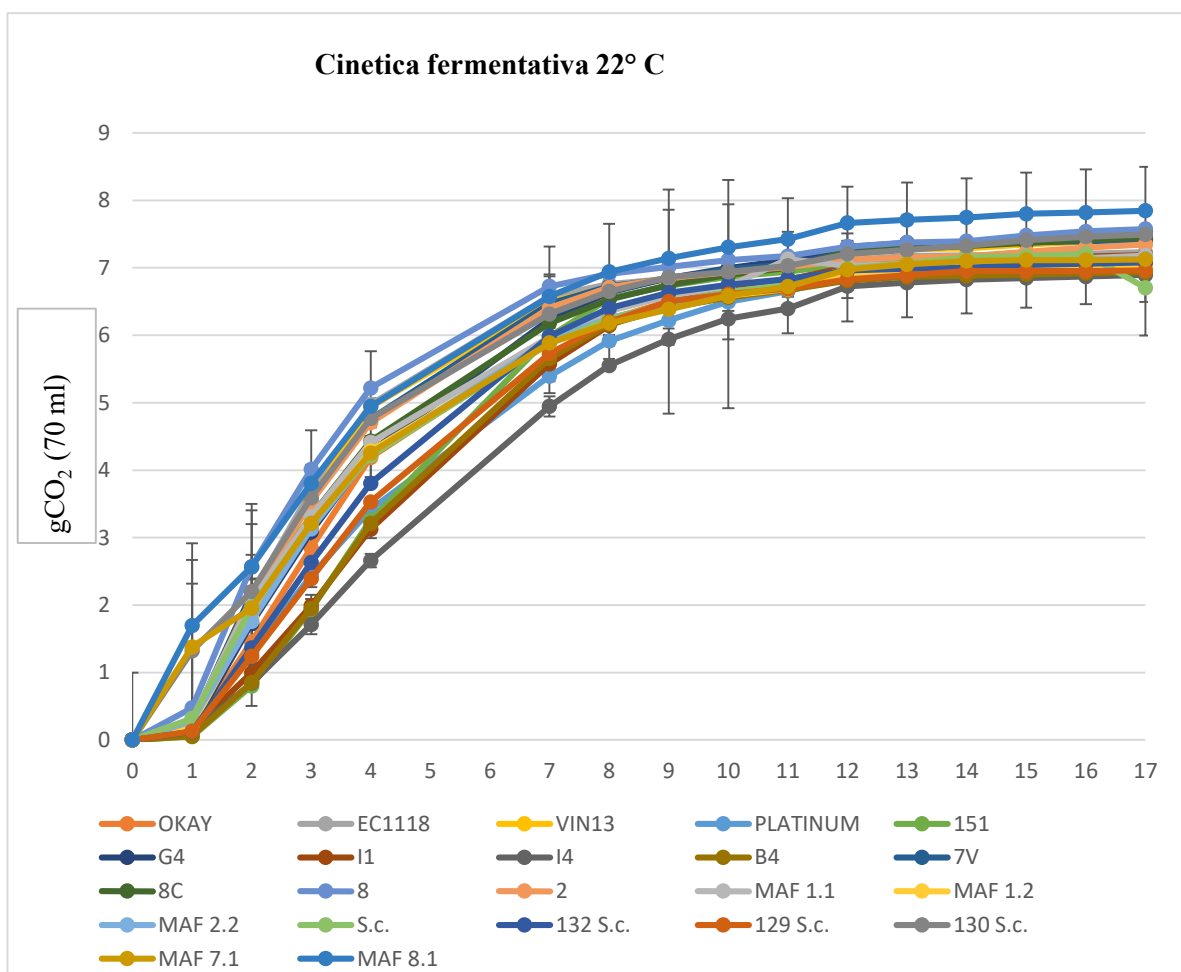


Fig. 5- cinetica fermentativa a 22°; ceppi di controllo OKAY, EC1118, VIN13, PLATINUMA (*S. cerevisiae*)

Anche per la fermentazione a 16°C (figura 6), viene analizzata la cinetica fermentativa di tutti i ceppi di lievito presi in esame per questo lavoro e viene confrontata, con quella osservata per i quattro ceppi starter commerciali utilizzati, quali *S. cerevisiae* OKAY, EC1118, VIN13 e PLATINUM. La cinetica fermentativa del ceppo commerciale starter *S. cerevisiae* VIN13, è risultata essere dal secondo giorno di fermentazione più elevata rispetto agli altri ceppi osservati, per poi assumere lo stesso andamento degli altri ceppi dal settimo giorno di fermentazione. Il ceppo MAF 1.1 (*S. cerevisiae*, isolato da madre acida) presenta una cinetica fermentativa più elevata nel primo giorno di fermentazione, per assumere poi dal secondo giorno di fermentazione, la stessa cinetica presentata dal resto dei ceppi, ma dal settimo giorno di fermentazione fino alla fine del processo la cinetica fermentativa di questo ceppo torna ad essere più bassa rispetto agli altri ceppi. Anche il ceppo *S. cerevisiae* MAF 2.2 (isolato anch'esso da madre acida) nel primo giorno di fermentazione ha mostrato una cinetica fermentativa più elevata rispetto agli altri ceppi, per poi conformarsi già dal secondo giorno di fermentazione con la cinetica fermentativa degli altri ceppi. Il ceppo I4 (*S. cerevisiae*, reincrocio spore del ceppo 153), dal settimo al nono giorno di fermentazione assume una cinetica fermentativa più lenta che si sovrappone a quella del ceppo MAF 1.1, una cinetica fermentativa che poi si conforma a quella degli altri ceppi dal nono giorno di fermentazione fino alla fine del processo. Per i restanti ceppi valutati possiamo notare che, la cinetica di fermentazione del ceppo *S. cerevisiae* 130 S.c. (uva convenzionale 9C T16) risulta essere una cinetica intermedia che sembra dividere i restanti ceppi in due gruppi. Nel primo gruppo, troviamo ceppi di lieviti con una cinetica fermentativa più elevata rispetto

all'altro gruppo, e tra questi ceppi troviamo: i quattro ceppi starter commerciali utilizzati, quali *S. cerevisiae* OKAY, EC1118, VIN13 e PLATINUM, *S. cerevisiae* 151 (Disva 705), G₄ (reincrocio spore del ceppo 151), I₁(reincrocio spore del ceppo 152), 8 (Cantina Giulia, mosto Verdicchio), MAF 1.2 (madre acida), S.c. (uva convenzionale 11C T16) e *S. bayanus* 7V, 8 (Cantina Giulia, mosto Verdicchio). Nel secondo gruppo troviamo invece ceppi di lieviti, con una cinetica fermentativa più lenta rispetto ai ceppi di lievito del gruppo precedente e qui troviamo: *S. cerevisiae* I₄ (reincrocio spore del ceppo 153), B₄ (reincrocio spore del ceppo 154), 2 (cantina Giulia, mosto Verdicchio), 132 S.c. (uva biologica 1B T16), 129 S.c. (uva biologica 5B T16), MAF 1.1, MAF 2.2, MAF 1.7 e MAF 1.8 (isolati da madre acida).

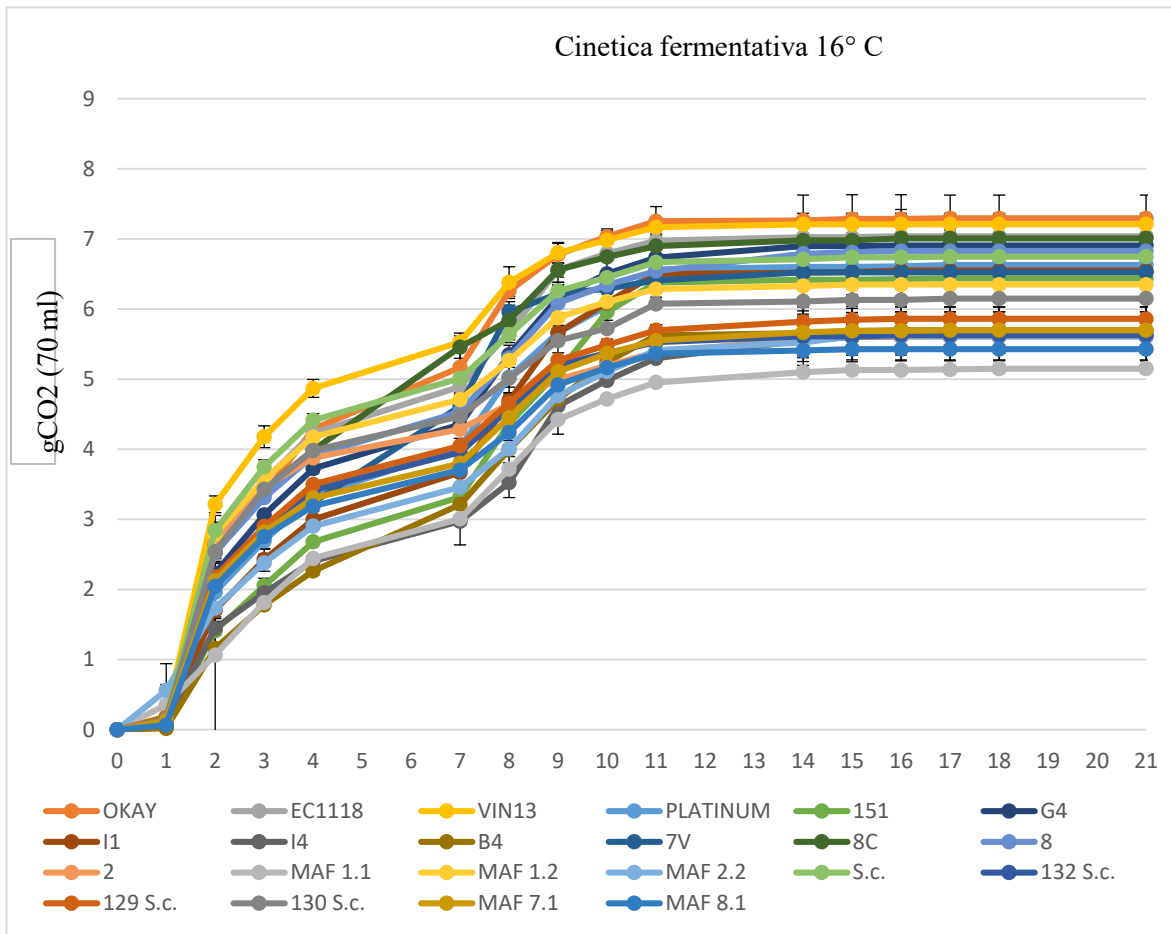


Fig. 6- cinetica fermentativa a 16°, ceppi di controllo OKAY, EC1118, VIN13, PLATINUM (S. cerevisiae)

4.4. Acidità volatile

Si definisce acidità volatile di un vino la quantità di acidi volatili presenti nel vino, espressa in g/l di acido acetico, ed è stata valutata per tutti i ceppi in studio sia alla temperatura di 22° che alla temperatura di 16°.

Dalla tabella 2 si può osservare che il ceppo *S. cerevisiae* 132 S.c. (uva biologica 1B T16), ad entrambi le condizioni fermentative, si distingue significativamente dagli altri ceppi per

la maggiore produzione di acidità volatile. Inoltre, nella fermentazione a 16°C, i ceppi *S. cerevisiae* MAF 1.7 (isolato da madre acida) e *S. bayanus* 7V (mosto Verdicchio, cantina Giulia) si distinguono significativamente per produrre maggiori quantità di acido acetico. Mentre nella fermentazione a 22°C altri due ceppi si distinguono significativamente come grandi produttori di acido acetico e sono *S. cerevisiae* 130 S.c. (uva convenzionale 9C T16) e *S. cerevisiae* I₁ (reincrocio spore del ceppo 152). Mentre il ceppo *S. cerevisiae* starter commerciale VIN13 nella fermentazione a 16°C si distingue significativamente dagli altri ceppi per la minore produzione di acidità volatile. Nella fermentazione a 22°C, invece, è il ceppo *S. cerevisiae* B₄ (reincrocio spore del ceppo 154) a distinguersi significativamente per la minore produzione di acido acetico.

CODICI CEPPI	ACIDITA' VOLATILE 16° (g/l di acido acetico)	ACIDITA' VOLATILE 22° (g/l di acido acetico)
OKAY	0,3±0,0 ^{hi}	0,4±0,1 ^{bcdefg}
EC1118	0,4±0,01 ^{efg}	0,3±0,0 ^{fghij}
VIN13	0,2±0,0 ^j	0,5±0,1 ^{abcd}
PLATINUM	0,4±0,0 ^{ghi}	0,4±0,0 ^{bcdef}
151	0,3±0,0 ^{fghi}	0,5±0,0 ^{abc}
G ₄	0,2±0,0 ^{ij}	0,5±0,1 ^{abcde}
I ₁	0,4±0,1 ^{ef}	0,5±0,0 ^{ab}
I ₄	0,6±0,1 ^{bc}	0,4±0,0 ^{efgh}
B ₄	0,6±0,1 ^{bcd}	0,2±0,1 ^k

7V	0,7±0,1 ^b	0,3±0,1 ^{ghij}
8C	0,3±0,0 ^{ghi}	0,2±0,0 ^{ij}
8	0,3±0,1 ^{fghi}	0,3±0,1 ^{fghi}
2	0,4±0,0 ^{fgh}	0,4±0,1 ^{bcdefgh}
MAF 1.1	0,5±0,1 ^{de}	0,4±0,1 ^{defgh}
MAF 1.2	0,4±0,0 ^{fghi}	0,4±0,1 ^{cdefgh}
MAF 2.2	0,5±0,0 ^{cde}	0,3±0,1 ^{ghij}
S.c.	0,3±0,0 ^{hi}	0,5±0,1 ^{abcde}
132 S.c.	0,8±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a
129 S.c.	0,3±0,1 ^{hij}	0,3±0,1 ^{fghij}
130 S.c.	0,3±0,0 ^{fghi}	0,6±0,1 ^a
MAF 1.7	0,7±0,1 ^b	0,3±0,0 ^{fghij}
MAF 1.8	0,4±0,1 ^{fgh}	0,3±0,0 ^{hij}

Tab. 2- acidità volatile nelle fermentazioni a 16°C e 22°C per i ceppi di lievito analizzati. I dati riportati nella tabella sono i valori medi ± la deviazione standard, con lettere all'apice (a-k) significative per ogni colonna (Duncan test; $p < 0.05$).

4.5. Anidride solforosa

L'analisi per la determinazione dell'anidride solforosa totale (quantità di SO₂ totale espressa in mg/l) viene eseguita per i ceppi *S. cerevisiae*, sia alla temperatura di 22° che alla temperatura di 16°.

Nella tabella riportata (tabella 3), è possibile osservare che ad entrambi le temperature di fermentazione, tutti i ceppi *S. cerevisiae* analizzati, mostrano una differenza significativa in relazione alla produzione di anidride solforosa. In particolare, però alla temperatura di 22°, i ceppi *S. cerevisiae* MAF 1.2 (madre acida) e G₄ (reincrocio spore del ceppo 151) si distinguono significativamente per la maggior produzione di SO₂ totale mentre alla temperatura di 16° i ceppi *S. cerevisiae* S.c. (uva convenzionale 11C T16) e *S. bayanus* 7V (mosto Verdicchio, cantina Giulia) e si distinguono significativamente per la più elevata produzione di SO₂ totale. Mentre il ceppo *S. cerevisiae* MAF 1.7 (isolato da madre acida) nella fermentazione a 16°C si distingue significativamente dagli altri ceppi, per la minor produzione di SO₂ totale. Nella fermentazione a 22°C, invece, è il ceppo *S. cerevisiae* starter commerciale OKAY a distinguersi significativamente per la minore produzione di acido acetico.

CODICI CEPPI	SO ₂ 16° (mg/l)	SO ₂ 22° (mg/l)
OKAY	90,8±0,3 ⁱ	49,7±0,7 ^t
EC1118	85,2±0,1 ^k	53,1±0,9 ^q
VIN13	86,4±0,2 ^j	76,0±0,2 ^m
PLATINUM	112,4±0,3 ^c	94,2±0,2 ⁱ
151	77,8±0,1 ^m	118,7±1,0 ^e
G ₄	92,8±0,1 ^g	145,6±0,5 ^b
I ₁	76,4±0,1 ^o	130,9±0,1 ^c
I ₄	109,6±0,1 ^e	109,0±0,4 ^g
B ₄	91,3±0,2 ^h	117,2±0,2 ^f
7V	126,3±0,1 ^b	86,7±0,4 ^j
8C	79,5±0,2 ^l	96,9±0,0 ^h

8	58,9±0,1 ^r	50,9±0,3 ^s
2	77,1±0,0 ⁿ	77,3±0,3 ^l
MAF 1.1	54,7±0,0 ^s	87,2±0,2 ^j
MAF 1.2	107,3±0,1 ^f	157,5±0,1 ^a
MAF 2.2	72,7±0,0 ^p	72,3±0,4 ⁿ
S.c.	131,7±0,2 ^a	84,0±0,2 ^k
132 S.c.	65,4±0,1 ^q	77,8±0,1 ^l
129 S.c.	111,1±0,0 ^d	129,5±0,0 ^d
130 S.c.	79,8±0,0 ^l	51,5±0,4 ^r
MAF 7.1	39,3±0,0 ^u	59,9±0,2 ^p
MAF 8.1	51,5±0,0 ^t	69,5±0,5 ^o

Tab. 3- SO₂ totale nelle fermentazioni a 16°C e 22°C per i ceppi di lievito analizzati. I dati riportati nella tabella sono i valori medi ± la deviazione standard, con lettere all'apice (a-u) significative per ogni colonna (Duncan test; $p < 0.05$).

4.6. Acetaldeide

Tra i principali composti secondari della fermentazione viene analizzato l'acetaldeide sia nelle condizioni di fermentazione a 22°C che a 16°C.

Nella fermentazione a 16° (tabella 4), i lieviti I₁ e I₄ (*S. cerevisiae*, reincrocio spore del ceppo 152 e 153 rispettivamente) si distinguono in modo significativo per la maggiore produzione di acetaldeide (aroma di mela verde), mentre MAF 2.2 (*S. cerevisiae*, madre acida) è il ceppo che ha mostrato una produzione di questo composto significativamente più bassa. Nella fermentazione a 22°C, (tabella 4), invece, al contrario della condizione a 16°C, MAF 2.2 (*S. cerevisiae*, Madre Acida) risulta distinguersi significativamente per la più elevata produzione di acetaldeide come anche *S. cerevisiae* I₄ mentre 8C (*S. bayanus*, cantina Giulia, mosto Verdicchio) mostra un contenuto significativamente più basso.

CODICI CEPPI	ACETALDEIDE 16° (mg/l)	ACETALDEIDE 22° (mg/l)
OKAY	40,1±0,3 ⁱ	25,3±0,5 ^{mn}
EC1118	48,4±0,9 ^{fg}	21,3±0,9 ^{no}
VIN13	47,3±0,5 ^{fg}	74,6±0,6 ^f
PLATINUM	57,8±0,0 ^c	83,4±0,0 ^c
151	48,9±0,0 ^{fg}	49,1±0,0 ⁱ
G ₄	45,2±0,0 ^h	20,7±0,0 ^{op}
I ₁	85,1±0,0 ^a	76,4±0,0 ^f
I ₄	78,9±0,0 ^b	88,7±0,0 ^b
B ₄	39,8±0,0 ⁱ	79,8±0,0 ^{de}
7V	9,4±2,8 ^m	45,7±0,6 ^j
8C	62,4±2,4 ^d	19,2±0,9 ^p
8	30,3±4,8 ^k	43,9±0,5 ^{jk}
2	36,0±2,7 ^j	43,4±3,7 ^{jk}
MAF 1.1	32,9±0,0 ^{jk}	77,7±0,0 ^{ef}
MAF 1.2	24,8±0,0 ^l	31,7±0,0 ^l
MAF 2.2	11,5±0,0 ^m	92,7±0,0 ^a
S.c.	24,8±0,0 ^l	42,6±0,0 ^k
132 S.c.	51,7±0,0 ^f	80,4±0,0 ^d
129 S.c.	66,6±0,0 ^c	65,4±0,0 ^g
130 S.c.	22,8±0,0 ^l	48,5±0,0 ⁱ
MAF 7.1	24,2±0,0 ^l	53,7±0,0 ^h
MAF 8.1	33,1±0,0 ^k	25,7±0,0 ^m

Tab. 4- acetaldeide prodotto nelle fermentazioni a 16°C e 22°C per i ceppi di lievito analizzati. I dati riportati nella tabella sono i valori medi ± la deviazione standard con lettere all'apice (a-p) significative per ogni colonna (Duncan test; p < 0.05).

4.7. Ammonio e azoto prontamente assimilabile (APA)

Nella fermentazione a 16° (tabella 5), i lieviti I₁ (*S. cerevisiae*, reincrocio spore del ceppo 152) e *S. cerevisiae* 129 S.c. (uva biologica 5B T16) si distinguono in modo significativo per il minor consumo di azoto assimilabile, mentre *S. cerevisiae* 130 S.c. e *S. bayanus* 7V e 8C si distinguono significativamente per il maggior consumo di azoto assimilabile. Nella fermentazione a 22°C, i lieviti I₁e I₄ (*S. cerevisiae*, rispettivamente, reincrocio spore del ceppo 152 e 153) e *S. cerevisiae* 129 S.c. (uva biologica 5B T16) consumano il minor quantitativo di azoto assimilabile, distinguendosi significativamente, al contrario *S. cerevisiae* MAF 2.2 (madre acida) si distingue significativamente per il maggiore consumo di azoto assimilabile.

CODICI CEPPI	AZOTO 16°(mg/l)	AZOTO 22°(mg/l)
OKAY	43,6±0,9 ^{fg}	45,9±0,3 ^{cdef}
EC1118	38,8±0,6 ^{ghi}	39,6±0,9 ^{ef}
VIN13	46,0±0,7 ^{def}	45,8±0,9 ^{def}
PLATINUM	48,4±2,5 ^{def}	45,7±1,1 ^{cdef}
151	51,5±1,2 ^{def}	42,9±0,7 ^{def}
G ₄	43,5±1,1 ^{fgh}	49,8±15,9 ^{abcd}
I ₁	63,8±2,4 ^a	58,1±1,3 ^a
I ₄	52,7±0,5 ^{bcd}	57,2±1,9 ^{ab}
B ₄	56,8±0,3 ^{bc}	48,5±0,7 ^{bcde}
7V	35,3±4,3 ⁱ	42,8±5,5 ^{ef}
8C	32,9±6,7 ⁱ	45,5±2,6 ^{cdef}
8	53,1±8,4 ^{bcd}	36,9±1,9 ^{fg}
2	38,8±0,2 ^{ghi}	43,8±2,8 ^{def}
MAF 1.1	49,8±0,9 ^{cdef}	43,7±0,9 ^{def}
MAF 1.2	34,5±2,4 ⁱ	50,4±0,99 ^{abcd}
MAF 2.2	44,9±1,2 ^{efg}	27,6±1,3 ^h
S.c.	44,9±0,2 ^{efg}	30,9±0,3 ^{gh}
132 S.c.	52,8±0,6 ^{bcd}	54,4±0,5 ^{abc}
129 S.c.	57,8 ±0,4 ^{ab}	55±0,8 ^{ab}
130 S.c.	35,6±0,81 ⁱ	41,9±0,5 ^{def}
MAF 1.7	36,9±0,7 ^{hi}	44,9±2,7 ^{def}
MAF 1.8	52,3±0,8 ^{bcd}	39,6±1,8 ^{ef}

Tab. 5- azoto prontamente assimilabile presente nelle fermentazioni a 16°C e 22°C per i ceppi di lievito analizzati. I dati riportati nella tabella sono i valori medi ± la deviazione standard, con lettere all'apice (a-i) significative per ogni colonna (Duncan test; p < 0.05).

Successivamente in questo lavoro, si è posta l'attenzione solo su alcuni dei ceppi, tra i 22 selezionati per questo progetto, quelli appartenenti all'Azienda olivivinicola Giulia Florentini situata nel comune di Cupramontana, Ancona, Marche. I ceppi presi in considerazione sono, *S. bayanus* 7V e 8C e *S. cerevisiae* 8 e 2, i quali sono stati analizzati dal punto di vista tecnologico, analizzando inoltre i caratteri enologici e le attitudini fermentative, sempre nelle due condizioni fermentative a 16°C e 22°C, e confrontandoli con i ceppi *S. cerevisiae* starter commerciali OKAY, EC1118, PLATINUM. I ceppi appartenenti all'Azienda olivivinicola Giulia Florentini, sono stati poi inseriti nel lavoro "*Ecological Distribution and Oenological Characterization of Native Saccharomyces cerevisiae in an Organic Winery*" (Agarbaty et al., 2022), al fine di valutare la presenza e la persistenza del nativo *S. cerevisiae* nel vigneto, nella cantina e nel vino non inoculato. L'azienda biologica in esame, ha iniziato la sua attività nel 2013 e non avendo mai utilizzato starter commerciali, ha rappresentato un ambiente enologico ideale per indagare le dinamiche delle popolazioni di lieviti autoctoni legati all'uva e/o alla cantina. All'interno della popolazione di ceppi di *Saccharomyces*, i biotipi dominanti, *S. bayanus* 8C e 7V, sono stati valutati e caratterizzati per attitudine enologica e profilo aromatico con l'obiettivo di utilizzare questi ceppi autoctoni come colture starter.

I risultati dei principali composti volatili dei vini fermentati a 16 °C sono riportati in Tabella 7. I dati mostrano che ceppi appartenenti a differenti biotipi sono caratterizzati dalla produzione di composti esteri. *S. bayanus* 7V ha mostrato un aumento significativo dell'isoamile acetato (aroma di banana) e ottanoato di etile (aroma di mela, pera e pesca), mentre *S. bayanus* 8C ha mostrato una quantità significativamente maggiore di esanoato di etile (aroma di mela). I ceppi starter di *S. cerevisiae* hanno mostrato differenti profili aromatici: OKAY era caratterizzato da un aumento significativo del contenuto di butirrato di etile; EC1118 era caratterizzato da quantità rilevanti di β -fenil etanolo e VIN13 mostrava una produzione significativamente elevata di acetato di feniletile. Per quanto riguarda esanolo, linalolo e geraniolo, i risultati non hanno mostrato differenze significative tra i ceppi. I composti volatili prodotti a 22 °C sono riportati in Tabella 8. I dati mostrano un diverso comportamento dei ceppi starter rispetto alle prove fermentative a 16 °C. A 22 °C, *S. bayanus* 7V ha mostrato un aumento significativo dell'acetato di isoamile, mentre *S. bayanus* 8C era caratterizzato da una produzione significativamente elevata di nerolo e β -damascenone. Tra i ceppi starter testati, OKAY ha confermato a 22 °C l'elevata produzione di butirrato di etile insieme a una rilevante produzione di terpeni, β -fenil etanolo e dietil succinato. EC1118 si è distinto dagli altri ceppi per la produzione di feniletile acetato ed etil esanoato, mentre VIN13 in questa condizione di fermentazione non ha mostrato alcuna produzione rilevante di un particolare composto. Per valutare gli effetti complessivi dei ceppi di lievito a diverse temperature di fermentazione, le principali caratteristiche analitiche e i composti volatili sono stati analizzati mediante analisi dei componenti principali (PCA) riportati in Figura 8. L'analisi PCA relativa alla fermentazione effettuata a 16 °C (Figura 8a)

ha mostrato che tutti i ceppi starter di *S. cerevisiae* erano raggruppati nel quadrante inferiore sinistro, mentre i due ceppi dominanti, *S. bayanus* 7V e 8C erano posti separati con i ceppi starter tra di loro. *S. bayanus* 7V era in basso a destra nel quadrante, mentre *S. bayanus* 8C era nel quadrante in alto a destra. Al di sotto dei 16°C di temperatura di fermentazione è stata riscontrata una maggiore differenziazione dei composti analitici e volatili. Diversamente, i dati ottenuti dopo la fermentazione svolta a 22 °C riportati in Figura 8b hanno mostrato una diversa distribuzione dei ceppi rispetto alla fermentazione svolta a 16 °C. *S. bayanus* 7V si trovava nel quadrante in basso a sinistra con *S. cerevisiae* VIN13. Gli altri tre ceppi erano ciascuno in un quadrante diverso.

Composti volatili (mg/L)	<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	OKAY	EC1118	VIN13
	7V Biotipo I	8C Biotipo II			
Alcoli					
Esanolo	0.01±0.00 ^b	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^{ab}
β-fenil etanolo	29.07±0.42 ^b	24.82±0.37 ^d	20.21±0.86 ^c	50.49±0.08 ^a	27.15±1.13 ^c
Esteri					
Acetato di isoamile	2.46±0.06 ^a	2.17±0.02 ^b	1.15±0.08 ^c	1.56±0.06 ^c	1.34±0.09 ^d
Acetato di feniletile	0.30±0.03 ^c	0.31±0.01 ^c	0.21±0.03 ^d	0.62±0.03 ^b	0.73±0.04 ^a
Etil esanoato	0.17±0.01 ^d	0.42±0.02 ^a	0.32±0.03 ^b	0.18±0.01 ^{cd}	0.20±0.00 ^c
Etil butirato	0.17±0.01 ^d	0.26±0.01 ^c	1.43±0.01 ^a	0.68±0.01 ^b	0.69±0.02 ^b
Etil ottanoato	0.05±0.01 ^a	0.03±0.01 ^b	0.01±0.00 ^b	0.02±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
Dietil succinato	0.01±0.01 ^a	0.02±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
Terpeni					
Linalolo	0.04±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.01±0.00 ^b
Nerolo	0.03±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	0.02±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a
Geraniolo	0.03±0.00 ^a	0.04±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
Enoni					
β-Damascenone	0.01±0.00 ^{ab}	0.03±0.01 ^a	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b	0.01±0.01 ^b

Tab. 7- Principali composti volatili dei vini ottenuti dai due ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* confrontati con starter commerciali, fermentati a 16 °C. I dati sono medie ± deviazioni standard e quelli con lettere in apice diverse (a–d) all'interno di ciascuna riga sono significativamente diversi, secondo i test di Duncan. ($p < 0,05$)

Composti volatili (mg/L)	<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	OKAY	EC1118	VIN13
	7V Biotipo I	8C Biotipo II			
Alcoli					
Esanolo	0.02±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a
β-fenil etanolo	30.67±3.10 ^c	12.88±2.97 ^c	35.23±0.70 ^a	32.70±2.96 ^b	16.29±2.13 ^d
Esteri					
Acetato di isoamile	3.83±0.32 ^a	1.77±0.08 ^b	1.25±0.03 ^c	1.10±0.07 ^c	1.48±0.02 ^{bc}
Acetato di feniletile	0.19±0.03 ^b	0.08±0.01 ^c	0.13±0.01 ^{bc}	0.39±0.05 ^a	0.11±0.03 ^c
Etil esanoato	0.19±0.05 ^c	0.35±0.17 ^b	0.36±0.04 ^b	0.43±0.04 ^a	0.21±0.03 ^c
Etil butirato	0.34±0.04 ^c	0.37±0.04 ^c	1.33±0.19 ^a	0.45±0.07 ^{bc}	0.54±0.03 ^b
Etil ottanoato	0.04±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.04±0.02 ^a	0.01±0.00 ^b	0.03±0.01 ^a
Dietil succinato	0.02±0.00 ^b	0.01±0.00 ^c	0.06±0.01 ^a	0.01±0.00 ^c	0.01±0.00 ^c
Terpeni					
Linalolo	0.04±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	0.06±0.02 ^a	0.04±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b
Nerolo	0.01±0.01 ^b	0.03±0.00 ^a	0.03±0.01 ^a	0.02±0.01 ^b	0.01±0.00 ^b
Geraniolo	0.01±0.00 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.03±0.01 ^a	0.02±0.01 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}
Enoni					
β-Damascenone	0.01±0.00 ^b	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b

Tab. 8. Principali composti volatili dei vini effettuati a 22 °C. I dati sono medie ± deviazioni standard e quelli con lettere in apice diverse (a–d) all'interno di ciascuna colonna sono significativamente diverso, secondo i test di Duncan ($p < 0,05$)

Figura 8a

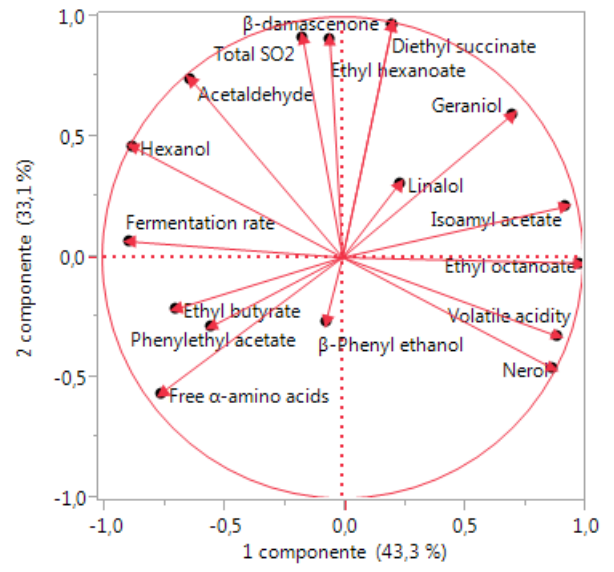
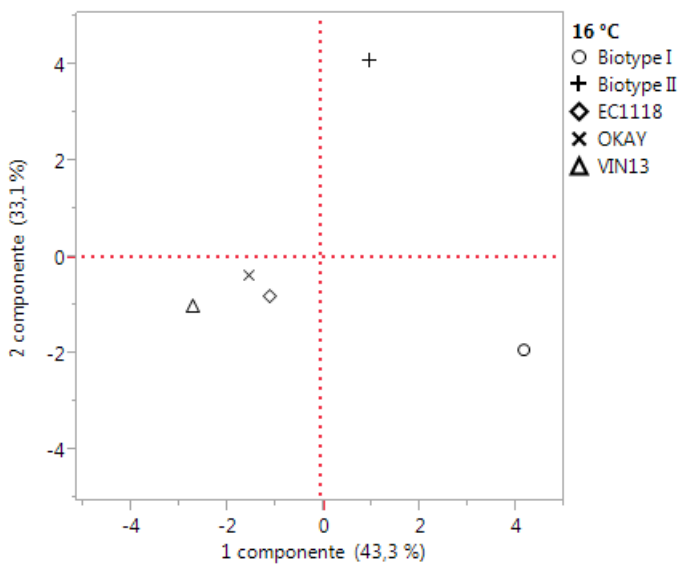


Figura 8b

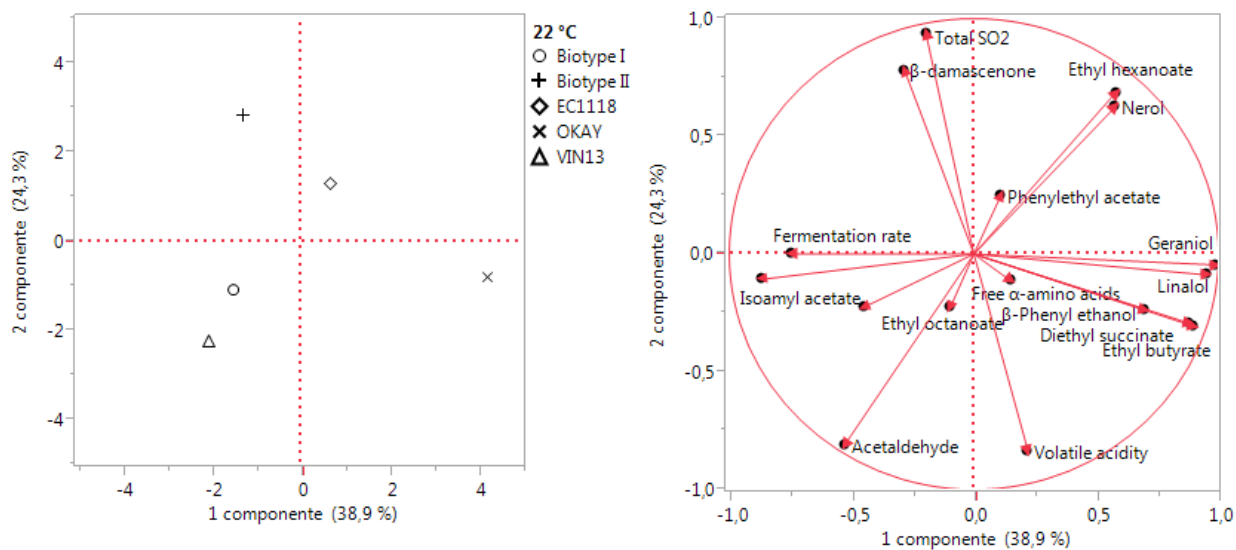


Fig. 8. Analisi dei componenti principali (PCA) per le principali caratteristiche analitiche e composti volatili dei vini ottenuti da *S. bayanus* 7V e 8C a temperature di fermentazione di 16 °C (A) e 22 °C (B).

CAPITOLO 5: Discussione e conclusione

In una prima fase dell'indagine sono stati valutati 18 ceppi di lievito appartenenti al genere *Saccharomyces*, in particolare alle specie *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* e *S. paradoxus*, isolati da diverse matrici e confrontati con 4 colture starter commerciali. Questi ceppi di lievito sono stati analizzati dal punto di vista tecnologico, osservando i caratteri enologici e le attitudini fermentative, a due diverse temperature di fermentazione, quali 16°C e 22°C. Analizzando la cinetica fermentativa di tali ceppi, possiamo notare come, ad entrambi le temperature di fermentazione, la loro attività fermentativa assume un andamento non significativamente diverso dall'andamento degli starter commerciali utilizzati in questo lavoro, quali *S. cerevisiae* OKAY, EC1118, VIN13 e PLATINUM. Per quanto riguarda invece la produzione di idrogeno solforato esaminata tramite l'utilizzo del terreno Biggy agar, è stato possibile notare come i ceppi, *S. cerevisiae* I₁, I₄, B₄ e G₄ provenienti dal reincrocio delle spore dei ceppi 152, 153, 154 e 151, rispettivamente, quindi aventi la stessa origine di isolamento, risultano essere bassi produttori di idrogeno solforato. Tale risultato è osservabile anche per i ceppi *S. cerevisiae* 132 S.c. e 129 S.c., sempre aventi la stessa origine di isolamento, cioè provenienti da uva biologica 1B T16 e 5B T16. Ciò che emerge da questa analisi, viene anche confermato durante le fermentazioni, tramite la valutazione della produzione di idrogeno solforato attraverso delle strip di acetato di piombo. Le strip di acetato riguardanti questi ceppi, in entrambi le condizioni fermentative, rimangono tali, non assumono nessuna colorazione e di conseguenza non vengono sostituite per tutta la durata della fermentazione, confermando la capacità di tali ceppi di lievito di essere bassi produttori di H₂S. Contrariamente a questa condizione, alcuni ceppi hanno dato un risultato negativo,

e sono i ceppi del gruppo MAF isolati da madre acida, MAF 1.1, 1.2, 2.2, 1.7 e 1.8, infatti essi con entrambi le metodologie risultano essere grandi produttori di idrogeno solforato. Nel caso dell'anidride solforosa, alla temperatura di 22°C, il ceppo starter commerciale OKAY si distingue in modo significativo per la minor produzione di anidride solforosa ed in questo caso il ceppo MAF 1.2, isolato da madre acida, ha un comportamento opposto rispetto allo starter, producendo elevate quantità di SO₂, al contrario, il ceppo MAF 1.7, isolato sempre da madre acida, alla temperatura di 16°C, ha una minore produzione di SO₂. I ceppi, *S. cerevisiae* I₁, I₄, B₄ e G₄ provenienti dal reincrocio delle spore dei ceppi 152, 153, 154 e 151, rispettivamente, quindi aventi la stessa origine di isolamento risultano essere anche bassi produttori di SO₂ sia a 16°C che a 22°C. Esaminando la produzione di acidità volatile, alla temperatura di fermentazione di 22°C, si deduce che, il ceppo *S. cerevisiae* B₄ si distingue in modo significativo per la bassa produzione di acidi volatili, assumendo un comportamento diverso rispetto a quello assunto dai ceppi starter commerciali utilizzati, infatti essi risultano essere produttori intermedi di questi composti; mentre *S. cerevisiae* I₁ proveniente dallo stesso gruppo di origine del ceppo B₄, si distingue per la maggiore produzione di acidità volatile non discostandosi molto dal comportamento degli starter utilizzati. Lo stesso comportamento rispetto ai ceppi starter, da grandi produttori di acidi volatili, viene assunto dai ceppi *S. cerevisiae* 130 S.c. e 132 S.c.. Alla temperatura di 16°C, il ceppo 132 S.c. produce sempre grandi quantità di acidi volatili ma in questo caso si discosta dal comportamento assunto del ceppo starter commerciale VIN13 che si distingue in modo significativo per la minore produzione di acidi volatili. Analizzando la produzione di acetaldeide, si deduce che il ceppo I₄ a 16°C e a 22°C, quindi a due diverse condizioni

fermentative, si comporta allo stesso modo producendo grandi quantità del composto mentre il ceppo MAF 2.2 ha un comportamento opposto in due diverse condizioni fermentative, a 22°C emerge una elevata produzione del composto a 16°C invece una minore produzione di esso. Può essere valutata quindi una possibile correlazione tra il comportamento fermentativo esibito dai ceppi e la loro diversa origine di isolamento, per cui sul risultato finale influisce non solo la specie ed il genere ma anche la matrice da cui sono stati isolati i ceppi. Nel settore enologico, il rapporto tra microbiota del vino e aree regionali ha acquisito molta importanza nel corso degli anni (*Vaudano E. et al., 2019*). Il vino assume caratteristiche distintive grazie al microbiota di una determinata regione (*Bokulich N.A. et al., 2016, Van Leeuwen C. et al., 2020*). Anche la temperatura di fermentazione è uno dei fattori di vinificazione che influenzano il tasso di crescita e la fermentazione alcolica (*Fleet et al., 1993*). La produzione di acidità volatile sotto forma di acido acetico aumenta con l'aumentare della temperatura da 15 a 25°C (*Henschke et al., 1993*). L'acetaldeide è il principale composto carbonilico nel vino derivato dal piruvato durante la fermentazione alcolica (Berry, 1995). Maggiori quantità di acetaldeide sono misurate tra i 10°C e i 15°C rispetto alla quantità misurata a temperature superiori a 20°C (*Etievant, 1991*). Sono riportati risultati controversi dovuti al diverso effetto della temperatura, sulla produzione di acetaldeide (*Cottrell et al., 1986; Romano et al., 1994*).

La concentrazione di SO₂ di un vino è spesso usata come indicatore per capire lo sviluppo del vino, perché la SO₂ reagisce con i componenti formati quando il vino viene ossidato, essendo consumato nel processo, e quindi la sua perdita può riflettere il grado di ossidazione

che il vino ha subito (Wilkes E. et al., 2019). La temperatura influenza l'equilibrio di SO₂ nel vino, la concentrazione di SO₂ diminuisce alle temperature elevate (Scrimgeour N., 2016).

In questo studio, un ulteriore obiettivo, è stato quello di individuare e selezionare ceppi di lieviti *S. cerevisiae* legati al territorio, per valutare le eventuali proprietà di tipicità e unicità dovute all'ambiente di provenienza dei ceppi abbinate a valide caratteristiche enologiche, così da poterli impiegare nella produzione di vini, ottenendo in questo modo prodotti finali con qualità sensoriali peculiari, legate al territorio di provenienza. A tale proposito è stato analizzato dal punto di vista tecnologico ed enologico, i ceppi *S. bayanus* 7V e 8C e *S. cerevisiae* 8 e 2, provenienti dall'Azienda olivivinicola Giulia Florentini che erano stati inseriti nello screening dei 22 ceppi di lievito selezionati per questo progetto, a due diverse temperature di fermentazione, quali 16°C e 22°C, ponendoli a confronto con i ceppi *S. cerevisiae* starter commerciali OKAY, EC1118, PLATINUM. Alla temperatura di fermentazione di 16°C i ceppi appartenenti a differenti biotipi, sono caratterizzati dalla produzione di composti esteri. *S. bayanus* 7V ha mostrato un aumento significativo dell'isoamile acetato (aroma di banana) e ottanoato di etile (aroma di mela, pera e pesca), mentre *S. bayanus* 8C ha mostrato una quantità significativamente maggiore di esanoato di etile (aroma di mela). I ceppi starter di *S. cerevisiae* hanno mostrato differenti profili aromatici: OKAY è caratterizzato da un aumento significativo del contenuto di butirrato di etile; EC1118 è caratterizzato da quantità rilevanti di β-fenil etanolo e VIN13 mostra una produzione significativamente elevata di acetato di feniletile. Per quanto riguarda esanolo, linalolo e geraniolo, i risultati non hanno mostrato differenze significative tra i ceppi. I composti volatili prodotti a 22 °C mostrano un diverso comportamento dei ceppi starter

rispetto alle prove fermentative a 16 °C. A 22 °C, *S. bayanus* 7V ha mostrato un aumento significativo dell'acetato di isoamile, mentre *S. bayanus* 8C era caratterizzato da una produzione significativamente elevata di nerolo e β -damascenone. Tra i ceppi starter testati, OKAY ha confermato a 22 °C l'elevata produzione di butirrato di etile insieme a una rilevante produzione di terpeni, β -fenil etanolo e dietil succinato. EC1118 si è distinto dagli altri ceppi per la produzione di feniletile acetato ed etil esanoato, mentre VIN13 in questa condizione di fermentazione non ha mostrato alcuna produzione rilevante di un particolare composto. Per valutare gli effetti complessivi dei ceppi di lievito a diverse temperature di fermentazione, le principali caratteristiche analitiche e i composti volatili sono stati analizzati mediante analisi dei componenti principali (PCA) riportati in Figura 8. L'analisi PCA relativa alla fermentazione effettuata a 16 °C (Figura 8a) ha mostrato che tutti i ceppi starter di *S. cerevisiae* sono raggruppati nel quadrante inferiore sinistro, mentre i due ceppi dominanti, *S. bayanus* 7V e 8C sono posti separati con i ceppi starter tra di loro. *S. bayanus* 7V si trova in basso a destra nel quadrante, mentre *S. bayanus* 8C si trova nel quadrante in alto a destra. Al di sotto dei 16°C di temperatura di fermentazione è stata riscontrata una maggiore differenziazione dei composti analitici e volatili. Diversamente, i dati ottenuti dopo la fermentazione svolta a 22 °C riportati in Figura 8b hanno mostrato una diversa distribuzione dei ceppi rispetto alla fermentazione svolta a 16 °C. *S. bayanus* 7V si trova nel quadrante in basso a sinistra con *S. cerevisiae* VIN13. Gli altri tre ceppi sono ciascuno in un quadrante diverso.

La presenza di lieviti autoctoni è dovuta alla conservazione naturale dei microrganismi presenti in una determinata area viticola. In diversi habitat ecologici nell'ambito della

vinificazione, come la superficie dell’uva, l’ambiente di cantina, le attrezzature di cantina e le varie fermentazioni del mosto troviamo *S. cerevisiae*. Nella cantina biologica presa in esame da questo lavoro, non sono mai stati utilizzati ceppi starter, ed è stata rilevata negli anni, un’elevata persistenza di *S. cerevisiae* autoctoni. Ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* risultano essere rappresentativi in specifici ecosistemi enologici e alcuni di essi definiti “dominanti” persistono durante le fermentazioni nella stessa cantina, da un anno all’altro, per cui risultano rappresentativi di un’azienda vinicola piuttosto che di un’area enologica (Granchi L. et al., 2019). Tra i nove diversi ceppi di lievito trovati durante i due anni di campionamento delle uve nell’azienda presa in esame, soltanto i ceppi *S. bayanus* 7V e 8C, sono risultati i ceppi dominanti e persistenti nell’uva, nell’ambiente di cantina e nella fermentazione non inoculata. Nelle uve provenienti dai vigneti Montepulciano e Verdicchio, viene trovato il ceppo dominante *S. bayanus* 7V, indicando un legame non specifico tra lieviti e vitigni (Ganucci D. et al., 2018), ma altre indagini indicano invece la presenza di ceppi di lievito specifici in varietà di uve specifiche (Blanco P. et al., 2006; Schuller D. et al., 2012). L’ambiente preso in considerazione in questo studio, l’Azienda olivivinicola Giulia Florentini situata nel comune di Cupramontana, Ancona, presenta una popolazione di *S. cerevisiae* stabile e ricorrente, infatti quasi tutti i ceppi di lievito che sono stati riscontrati in questo lavoro sono presenti lungo tutta la filiera, dal vigneto, alla cantina, al prodotto finito (Ganucci D. et al., 2018; Pérez-Torrado R. et al., 2017), e ciò va a sostenere che la gestione del “sistema” vigneto-cantina influenzi in maniera molto forte, la colonizzazione di questi ambienti. Il microbiota risulta essere stabile nei vari ambienti, come la superficie dell’uva, la cantina, l’attrezzatura presente in cantina e il mosto in fermentazione a causa

delle pratiche agronomiche ed enologiche utilizzate che lo influenzano. *S. bayanus* 7V e 8C, ceppi di lievito autoctoni dominanti, sono stati confrontati con i principali ceppi *S. cerevisiae* starter commerciali, ed è stato dimostrato che i ceppi di lieviti dominanti, conferiscono al prodotto finito un profilo sensoriale peculiare. Anche sulla base della temperatura di fermentazione, *S. bayanus* 7V e 8C, determinano la formazione di una nota aromatica, basata sulla produzione di esteri; questi composti sono responsabili del carattere fruttato dei vini e la loro produzione da parte dei lieviti risulta una caratteristica fondamentale nel metabolismo dei lieviti (Ugliano M. et al., 2009; Nikolaou E. et al., 2006). Per fornire caratteristiche peculiari ai vini, garantendo una significativa diversificazione dei profili analitici e aromatici, i ceppi di lievito *S. cerevisiae* autoctoni, potrebbero essere utilizzati come ceppi starter (Knight S. et al., 2015; Nisiotou A. et al., 2018; Banilas G. et al, 2016); inoltre i lieviti autoctoni risultano avere un comportamento fermentativo paragonabile a quello mostrato dai ceppi starter commerciali, utilizzati come controllo. L'utilizzo di lieviti autoctoni in vinificazione, è considerato idoneo, e questo è dovuto alla loro presenza in diversi habitat durante il processo della vinificazione, alla loro persistenza durante le diverse annate e alla loro attitudine fermentative a diverse temperature.

CAPITOLO 6: Bibliografia

- **Agarbati A., Canonico L., Comitini F., Ciani M.,** (2022) Ecological Distribution and Oenological Characterization of Native *Saccharomyces cerevisiae* in an Organic Winery. *Fermentation* 2022, 8, 224.
- **Baiano A., Scrocco C., Sepielli G., Del Nobile M. & A.,** (2015) Wine Processing: A Critical Review on Physical, Chemical, and Sensory Implications of Innovative Vinification Procedures. *Food Science and Nutrition*, Volume 56, 14, pp 42-43.
- **Boulton R.B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R.E.,** (1996) Preparation of must and juice. In: *Principles and practices of winemaking*. Casa editrice Springer US, pp 65-67.
- **Comitini F., D'Ignazi G., Mazzoni G., Ciani M.,** (2007) Monitoraggio della microflora indigena lieviti-forme durante le fasi prefermentative. *L'Enologo*, Vol. 43, 12, pp. 97-103.
- **Dequin S.,** (2014) Winemaking e dintorni. In: *The wine expert*. Lallemand inc. Succ. Italiana.
- **Domizio P., Lencioni L., Romani C., Ciani M., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I.,** (2012) Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego di inoculi misti. In: *Blasi S., La ricerca applicata ai vini di qualità*, Casa editrice Firenze University Press, pp 129-132, 135.
- **Eric Wilkes E., Newell B., Johnson D.,** (2019) Wine storage temperature – investigating the impact of small differences. *Wine & viticulture journal*, Vol. 34, pp 27-29.

- **Erten H.**, (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, vol. 38, pp 377–382.
- **Evangelia A., Nisiotou Z. e A.**, (2021) Review-Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms* 2021, Vol. 9.
- **Grisafi G.**, (2011) Pratiche di cantina per una vinificazione di qualità. Agenzia Regionale per lo Sviluppo e per i Servizi in Agricoltura, Collana informativa 2011, pp 13.
- **Jiranek V.**, (2002) Come si forma l'idrogeno solforato in vinificazione?. *Vinidea.net*, 3, pp 1-2.
- **Lambrechts M.G. & Pretorius I.S.** (2000) Yeast and its importance to wine aroma—a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21.
- **Mas A., Portillo M.C.**,(2022) Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial terroir complexity: A mini-review. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 367.
- **Moschetti G., Nicola F., Settanni L.**, (2013) Lievito autoctono o lievito commerciale?. In: Moschetti G., Nicola F., *I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.: la tipicità attraverso le biotecnologie*. Assessorato Agricoltura della Regione Campania, pp 49-55.

- **Pietrafesa A.**, (2020) Fermentazioni miste controllate per migliorare il profilo analitico e sensoriale dei vini. Agrifoglio, 99.
- **Rainieri S., Pretorius I.S.**, (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50, pp 15-31.
- **Romano P., Capece A.**, (2019) Yeasts and Their Metabolic Impact on Wine Flavour. In: Romano P., Ciani M., Fleet G. H., *Yeasts in the Production of Wine*, Casa Editrice Springer Science+Business Media, pp 44-62.
- **Sablayrolles J.M.**, (2008) Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect, *Food Research International*, Vol. 42, 4, pp 418-424.
- **Scotti B.**, (2004) Come utilizzare l'anidride solforosa nella fase d'affinamento del vino e nuove forme d'impiego. In: *Uso della solforosa in affinamento e nuove forme d'impiego*, Vinidea.net,1/2, pp 1-2.
- **Scrimgeour N.**, (2016) The effects of elevated storage temperature on wine composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 21, pp 713-722.
- **Suzzi G., Tofalo R.**, (2018) La fermentazione spontanea. In: *Microbiologia enologica*, Casa Editrice Edagricole, pp 23-25.
- **Vaudano E., Bertolone E., Petrozziello M., Moruno E.G.**, (2014) Una nuova frontiera per l'enologia: l'utilizzo dei lieviti non-saccharomyces in fermentazione. *L'Enologo*,1/2.
- **Zamora F.**, (2009) Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: Moreno-Arribas M. V., Polo M. C., *Wine Chemistry and Biochemistry*, pp 3-9, 20-22.