



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

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

SELEZIONE E IMPIEGO DI LIEVITI NON-*SACCHAROMYCES* PER LA
PRODUZIONE DI VINI SPUMANTI
SELECTION AND USE OF NON-*SACCHAROMYCES* YEASTS TO SPARKLING
WINE PRODUCTION

Tesi di Laurea Magistrale
di: **Laura Panichelli**

Relatore Chiar.mo

Prof. Maurizio Ciani

Correlatore:

Prof.ssa Laura Canonico

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2021/2022

INDICE

Capitoli primo - INTRODUZIONE	1
1.1 Metodi di spumantizzazione.....	2
1.1.1 Metodo Classico o Champenoise.....	2
1.1.2 Metodo Charmat o Martinotti.....	4
1.1.3 Metodo dell’Asti spumante.....	5
1.2 Caratteristiche del vino base.....	6
1.3 Lieviti.....	9
1.3.1 Lieviti immobilizzati.....	11
1.3.2 Autolisi.....	12
1.3.3 La schiuma.....	15
1.4 Lieviti non- <i>Saccharomyces</i> in vinificazione.....	17
1.5 Prodotti secondari di fermentazione.....	18
1.5.1 Terpeni.....	20
1.5.2 Esteri.....	21
1.5.3 Aldeidi.....	22
1.5.4 Acidi.....	23
1.5.5 Alcoli superiori.....	24
1.5.6 C-13 Norisoprenoidi.....	25
Capitolo secondo – SCOPO DEL LAVORO	26
Capitolo terzo – MATERIALI E METODI	28
3.1 Allestimento delle prove sperimentali.....	28
3.2 Monitoraggio della fermentazione.....	30
3.3. Monitoraggio della biomassa.....	30

3.4	Analisi chimiche.....	31
3.4.1	Estrazione ed analisi della componente volatile.....	31
3.4.1.2	Estrazione con tecnica SPME.....	33
3.4.2	Analisi degli alcoli superiori.....	34
3.4.3	Determinazione dell'etanolo.....	36
3.4.4	Determinazione dell'anidride solforosa.....	36
3.4.5	Analisi dell'acidità totale.....	38
3.4.6	Analisi acidità volatile	38
3.4.7	Determinazione del pH.....	40
3.4.8	Determinazione degli zuccheri residui.....	40
3.4.9	Determinazione dell'acido lattico.....	44
3.4.10	Determinazione dell'acido malico.....	47
3.5	Analisi sensoriale.....	49
 Capitolo quarto – RISULTATI.....		51
4.1	Valutazione sui campioni di spumante prodotti con metodo classico in laboratorio....	51
4.1.1	Cinetica di fermentazione.....	51
4.1.2	Evoluzione della popolazione microbica.....	53
4.1.3	Analisi chimiche.....	54
4.1.3.1	Determinazione del pH.....	54
4.1.3.2	Determinazione degli zuccheri residui.....	55
4.1.3.3	Determinazione dell'acido lattico.....	57
4.1.3.4	Principali prodotti secondari di fermentazione.....	58
4.1.3.5	Valutazione della produzione dei composti volatili.....	60
4.1.4	Analisi sensoriale.....	63
4.2	Valutazioni sui campioni di spumante prodotti con metodo industriale in azienda....	65
4.2.1	Cinetica di fermentazione.....	66
4.2.2	Alcool.....	67

4.2.3 Acidità.....	68
4.2.4 pH.....	69
4.2.5 Zuccheri residui.....	70
4.2.6 Anidride solforosa.....	71
4.2.7 Acido malico.....	73
4.2.8 Acido lattico.....	74
4.2.9 Principali prodotti secondari di fermentazione.....	75
4.2.10 Valutazione della produzione dei composti volatili.....	77
Capitolo quinto – DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	79
Capitolo sesto – BIBLIOGRAFIA.....	84

Capitolo primo

INTRODUZIONE

La caratteristica principale dei vini spumanti è la presenza di anidride carbonica (CO₂), che viene prodotta esclusivamente durante una seconda fermentazione alcolica effettuata in contenitori sigillati (bottiglie o serbatoi di acciaio inox) per l'incorporazione del gas (Bordiga et al., 2013; Pueyo & Martínez-Rodríguez, 2009). A causa del particolare processo, i vini spumanti appartengono alla categoria dei «vini speciali», come i vini liquorosi e i vini aromatizzati (Torresi et al., 2011). Questi vini sono considerati la bevanda per "occasioni speciali" e, a causa del loro valore aggiunto, i ricercatori sono costantemente impegnati per miglioramenti del prodotto: riduzione dei tempi e dei costi del processo, nuovi vitigni e selezione di lieviti starter (Caliari, et al. 2014; Caliari et al., 2015; Charters et al., 2011; Lombardi et al., 2015; Perpetuini et al., 2016). Sebbene la produzione di vini spumanti sia inferiore rispetto a quella dei vini fermi, l'impatto economico di questo prodotto è molto importante a causa del suo alto valore aggiunto. Per questo motivo, l'attenzione dei clienti verso la qualità delle bevande fermentate sta diventando sempre più grande oggi e i viticoltori sono sempre alla ricerca di miglioramenti del prodotto (Torresi et al., 2011). Per questi motivi, nel corso degli anni sono stati fatti molti tentativi di semplificare il processo di produzione e, allo stesso tempo, sono stati fatti tentativi per preservare le caratteristiche tipiche e uniche del prodotto. Alcuni nuovi approcci in questo settore includono la progettazione di procedure per accelerare il processo naturale di autolisi durante la produzione di spumante e il miglioramento dei lieviti utilizzati per la fermentazione secondaria (Pozo-Bayon et al., 2009). La produzione di vini spumanti di alta

qualità dipende dalla composizione di base del vino (cioè sapore, aroma, acidità) (Kemp et al., 2015), dalla fase di invecchiamento (cioè aroma post-fermentazione) e dal lievito starter utilizzato per il processo di fermentazione secondaria ("prise de mousse") (Vannier et al., 1999; Pozo-Bayón et al., 2003, 2010). La quantità di zucchero (g/l) differenzia i vini spumanti per dolcezza, pertanto essi sono classificati come segue: brut, 0–15 g/l di zucchero; extra-secco, 12–20 g/l; sec, 17–35 g/l; demi-sec, 33–50; doux, >50 g/l (Zoecklein, 2002).

1.1 Metodi di spumantizzazione

Lo spumante è il risultato della fermentazione secondaria del vino base con il metodo classico (tradizionale) o con il metodo Charmat (serbatoio) (Jackson, 2008; Stefenon et al., 2010; Torresi et al., 2011; Pueyo e Martínez-Rodríguez, 2009).

1.1.1 Metodo Classico o Champenoise

Il metodo classico o tradizionale è indicato come "méthode champenoise", ma questa espressione può essere ufficialmente utilizzata solo per i vini spumanti prodotti nella regione champagne (regolamento UE 3309/85) (Garofalo et al., 2016). L'elaborazione di un vino spumante prodotto con metodo tradizionale comporta il riempimento della bottiglia con il vino base, derivato dalla fermentazione di mosti di uve prodotti con la tecnologia tradizionale del vino bianco (Torresi et al., 2011). Dopo aver introdotto il vino base in bottiglia, viene aggiunta una soluzione, composta da saccarosio, lieviti selezionati, mosto d'uva o vino, nella proporzione corretta per produrre la pressione di CO₂ desiderata.

Si stima che siano necessari 4,00-4,30 g di zucchero per litro per produrre un'atmosfera di anidride carbonica, il contenuto finale di CO₂ desiderato in uno spumante è di circa 6 atm (Zoecklein, 2002). Dopo l'imbottigliamento del vino base (cuvée), viene inserita la bidule. Questa è una coppetta di polietilene vuota di solito di 17 mm Ø e di 14 mm di altezza. La bidule aiuta a prevenire perdite e il contatto metallico con la corona; inoltre, danno una migliore tenuta e aiutano il processo di sboccatura perché le fecce vengono convogliate nel suo spazio vuoto (Zoecklein, 2002). Le bottiglie vengono poi conservate in appositi luoghi predisposti per la costituzione dell'effervescenza. L'area di stoccaggio delle bottiglie dovrebbe essere fresca e dovrebbe avere fluttuazioni di temperatura minime e illuminazione minima (Zoecklein, 2002). Durante questo periodo avviene la fermentazione secondaria, si forma e si stabilizza la CO₂ e si verifica l'invecchiamento con i lieviti (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Il tasso di fermentazione secondaria dipende dai lieviti, dalla temperatura e dalla chimica del vino base, tuttavia, una fermentazione secondaria a 12-15 °C avviene in non meno di 0,5-1,5 mesi. L'evoluzione della fermentazione è costantemente monitorata mediante il controllo della pressione interna della bottiglia e, a campione, degli zuccheri riducenti. Dopo la rifermentazione inizia l'invecchiamento prolungato a contatto con le fecce (Torresi et al., 2011). L'autolisi dei lieviti avviene durante questo periodo (Torresi et al., 2011). Dopo il periodo di invecchiamento, che può durare da pochi mesi ad alcuni anni, viene eseguita la procedura di rotazione delle bottiglie e progressiva messa in punta, detta anche remuage. Durante questa fase, la gravità trasporta il sedimento al collo della bottiglia. Questo processo è stato originariamente eseguito con le bottiglie su appositi sostegni di legno ("pupitre"), girandole manualmente 1/8 di giro per 15 giorni e aumentando gradualmente l'inclinazione fino a quando non sono state finalmente posizionate perpendicolari al pavimento. Ora

questo metodo è stato sostituito da sistemi automatizzati in grado di spostare tutte le bottiglie contemporaneamente (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Quando le fecce sono completamente convogliate nel collo della bottiglia e lo spumante è completamente limpido, le bottiglie sono pronte per la rimozione dei sedimenti. La fase finale consiste nell'eliminazione delle fecce dalla bottiglia (dégorgement). Lo spumante viene refrigerato fino a 4-10 °C per evitare perdite di anidride carbonica. La sboccatura viene oggi eseguita inserendo il collo della bottiglia in una soluzione satura di cloruro di calcio o in una soluzione di glicole che congela il collo della bottiglia ed il sedimento presente nella bidule. Le bottiglie vengono quindi posizionate con il collo verso l'alto, stappate e la pressione all'interno della bottiglia espelle automaticamente la bidule e il tappo del ghiaccio. Dopo di che la bottiglia viene riempita con il liqueur d'expédition, o soluzione di dosaggio, una miscela composta da vino, zucchero, brandy, SO₂, acido citrico, solfato di rame, con una formula diversa per ogni azienda. (Torresi et al., 2011).

1.1.2 Metodo Charmat o Martinotti

Il metodo Charmat o Martinotti è caratterizzato da serbatoi sigillati dotati di meccanismi di agitazione, con l'obiettivo di miscelare uniformemente il lievito nel vino base durante la fermentazione secondaria (Cebollero, E.; Gonzalez, R., 2006). I vini base vengono solitamente corretti con 20-24 g/L di zucchero e poi pastorizzati con l'obiettivo di accelerare l'idrolisi del saccarosio. In breve, il vino base integrato con lo zucchero viene aggiunto con lievito in un serbatoio a pressione in acciaio inossidabile, costruito per resistere alla pressione. Quando tutto lo zucchero viene trasformato in alcol e anidride

carbonica, i lieviti vengono rimossi e il vino viene imbottigliato in un ambiente isobarico e refrigerato. La durata della fermentazione di solito influenza la qualità del prodotto finale e una fermentazione prolungata protegge l'aroma del vino e consente di mantenere le bollicine più durevoli. Al termine della rifermentazione e dopo la chiarificazione, lo spumante viene imbottigliato. Successivamente, dovrebbe essere invecchiato almeno 20 giorni prima della vendita, durante i quali il vino da invecchiamento rimane a contatto con le fecce di lievito (Pozo-Bayón et al., 2003). Il metodo Charmat è più semplice ed economico di quello tradizionale (Garofalo et al., 2016).

1.1.3 Metodo dell'Asti spumante

L'Asti è una versione modificata del processo Charmat in cui le uve vengono raccolte, pigiate e pressate. Il mosto ottenuto è quindi filtrato e fermentato. La fermentazione avviene in serbatoi pressurizzati in acciaio inox, dove è incorporato il gas, fino al raggiungimento della gradazione alcolica desiderata (Bordiga et al., 2013).

Sebbene differenti fattori possano influenzare la composizione volatile dei vini spumanti, il metodo di produzione può essere considerato uno dei più importanti step in termini di qualità sensoriale. Vini spumanti prodotti con il metodo tradizionale o con il metodo Charmat hanno una componente volatile caratteristica (aroma post-fermentativo) risultante dalla fase di invecchiamento in cui c'è il contatto con le fecce (Pozo-Bayon et al., 2009), mentre la componente volatile dei vini spumanti prodotti con il metodo Asti è caratterizzata dalla cultivar di uve (aroma varietale) (Bordiga et al., 2013).

1.2 Caratteristiche del vino base

Si parte quindi da un vino base precedentemente ottenuto con tecniche tradizionali (Vincenzini et al., 2005; Suzzi & Tofalo, 2014). La qualità generale del vino, la sua stabilità e i parametri organolettici dipendono dalla composizione fisico-chimica delle materie prime, dalle condizioni ambientali e dalla gestione della viticoltura (Torresi et al., 2011). Le uve sono raccolte poco mature e sane, vengono poi pressate delicatamente. Il mosto così ottenuto è chiarificato e solfitato. La prima fermentazione viene condotta a temperature tra i 15-20 °C, con un contenuto di alcol compreso tra 10-11% (Vincenzini et al., 2005; Suzzi & Tofalo, 2014). La presenza di costituenti aromatici nei vini spumanti, con un impatto diretto sulle loro caratteristiche organolettiche, è influenzata da diversi fattori, ad esempio le particolarità del vino base, le condizioni delle cultivar delle uve, i lieviti inoculati, la fase di invecchiamento e le pratiche enologiche (Cotea et al., 2021). Il vino base deve presentare caratteristiche tipiche come colore giallo paglierino, aroma fruttato, basso contenuto zuccherino residuo, gradazione alcolica moderata, bassa acidità volatile e deve essere stato sottoposto a stabilizzazione tartarica (Torresi et al., 2011). Diverse tecniche possono essere applicate per produrre vini a bassa gradazione alcolica, principalmente utilizzando mosti con basse concentrazioni di zucchero, lieviti selezionati o una precoce interruzione della fermentazione alcolica (Cotea et al., 2021). Più recentemente, fermentazioni sequenziali con *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomyces cerevisiae* sono state segnalate come produttrici di vini con una concentrazione di etanolo significativamente più bassa (Gonzaléz – Royo et al., 2014). Già da qualche tempo, l'uso di *Torulaspota delbrueckii* è stato proposto come starter di vino per ridurre l'acido volatile nei vini. Più recentemente, sono stati evidenziati altri caratteri enologici positivi in termini

di produzione di composti che influenzano positivamente i composti volatili (ad esempio, esteri, acetali, tioli volatili), o il corpo del vino, come il glicerolo, i polisaccaridi o la produzione di schiuma nello spumante (Comitini et al., 2011). L'uso di *T. delbrueckii* nella produzione di spumante è stato recentemente proposto in colture miste per la produzione di vino base (Gonzalèz – Royo et al., 2015). I vini destinati a produrre spumanti di altissima qualità vanno scelti non solo per il loro sapore ma anche per la loro capacità di produrre schiuma (Andre's-Lacueva et al, 1996). I mosti utilizzati nella preparazione di vino base sono ricchi in sostanze azotate, in particolare di proteine, che contribuiscono alla dimensione delle bollicine (*perlage*) ed alla stabilità della schiuma (Vincenzini et al., 2005; Suzzi & Tofalo, 2014). È importante determinare in che modo le variazioni nella composizione chimica dei vini prodotti dalla varietà, dalla vendemmia o dal processo tecnologico influenzano le proprietà schiumogene (Andre's-Lacueva et al, 1996). In questo senso, è stata descritto che la stabilità della schiuma è favorita dalla presenza di agenti tensioattivi tali come proteine, mannoproteine e polisaccaridi che stabilizzano l'interfaccia della bolla a causa delle loro proprietà superficiali (Brissonnet et al.,1993; Vanrell et al., 2005). L' inoculo sequenziale di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* durante la prima fermentazione ha aumentato la concentrazione proteica e migliorato la proprietà schiumogene di un vino base. L' inoculo sequenziale nella produzione del vino base originato vini spumanti con altezze massime di schiuma significativamente più elevate rispetto alle tradizionali inoculazioni, probabilmente perché l'autolisi delle cellule di *T. delbrueckii* nel vino base rilascia quantità maggiori di proteine, in particolare della frazione proteica a basso peso molecolare (Medina-Trujillo et al., 2016). La composizione del substrato di fermentazione esercita una certa influenza sul rilascio di polisaccaridi e oligosaccaridi da parte di questi lieviti non-*Saccharomyces* (Gonzàlez-Royo et al., 2015).

In effetti, alcuni autori hanno suggerito che minore è il contenuto di colloidi nel mezzo, maggiore è il rilascio di colloidi da lieviti (Guilloux-Benatier et al., 1995). Alcuni studi riportano l'influenza del sistema di estrazione (Hardy, 1990), dell'agente di chiarificazione (Maujean et al., 1990; Brissonnet & Maujean, 1991), o filtrazione (Robillard et al., 1993; Viaux et al., 1994). Diversi aspetti dei vini spumanti sono influenzati dal succo e dalla composizione dell'azoto del vino di base, tra cui la qualità della schiuma, il profilo aromatico e le caratteristiche organolettiche (Martinez et al., 2003; Pozo-Bayon et al., 2009). Basse concentrazioni di azoto nell'uva influiscono direttamente sulla maggiore produzione di alcol, con un effetto inverso osservato in presenza di livelli di azoto da moderati a elevati. (Gobert et al., 2017). La prima fermentazione alcolica per produrre vino di base inizia tipicamente dall'inoculo del lievito. Si verifica a temperature controllate di solito inferiori a 20 °C (Jackson, 2014; Buxaderas & López-Tamames, 2012). La fermentazione malolattica (MLF) del vino base è facoltativa, dipende dalla decisione del produttore, dal livello di acido malico, dallo stile di vino previsto e dal profilo aromatico desiderato (Jackson, 2014; Kemp et al., 2015). Ogni produttore mira a riunire le caratteristiche di diversi vitigni, diversi vini di base e diverse annate miscelando vini base (Duteurtre, 2016). In questa fase, il vino diventa una "cuvée", che si riferisce ai vini base miscelati, che continuano ad essere fermentati in bottiglia (Jackson, 2014). I vini subiscono anche la stabilizzazione tartarica e la filtrazione prima dell'imbottigliamento (Riu-Aumatell et al., 2013; Buxaderas & López-Tamames, 2012).

1.3 Lieviti

L'attività dei lieviti durante la fermentazione alcolica è considerata un aspetto significativo che contribuisce alla frazione volatile e alla caratteristica organolettica dei vini spumanti (Escudero et al., 2000). I lieviti presentano un ruolo importante nel definire le caratteristiche dello spumante, tra cui il contenuto di etanolo, la sovrappressione di anidride carbonica, le mannoproteine e il livello dei composti aromatici (Martinez-Rodriguez et al., 2001). Considerando le caratteristiche fisico-chimiche, il tipo di lieviti inoculati ha mostrato un impatto minore ma importante sui parametri fisico-chimici. Parametri come densità, acidità totale, zucchero residuo ed estratto non riducente hanno valori dipendenti, con importanti differenze tra i campioni (Cotea et al., 2021). Per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali, si possono osservare differenze chiave dovute al tipo di lievito inoculato (Cotea et al., 2021). La selezione del ceppo di lievito è uno dei fattori più importanti che dovrebbero essere considerati nei processi di fermentazione secondaria per la produzione di vino spumante. Infatti, è stato affermato che il ceppo di lievito utilizzato per la rifermentazione svolge un ruolo importante sia nella fase di presa di spuma che nel processo di invecchiamento e può influenzare la composizione finale dei vini spumanti. I lieviti che effettuano la fermentazione secondaria devono presentare una serie di caratteristiche supplementari rispetto a quelle utilizzate nella prima fermentazione della produzione di vino di base. I lieviti commerciali che effettuano la prima e la seconda fermentazione alcolica sono diversi. I lieviti per la prima fermentazione sono selezionati per la loro alta velocità di fermentazione e bassa produzione di acido acetico, così come altre proprietà desiderabili, mentre i lieviti per la seconda fermentazione sono selezionati per altre proprietà qualitative e tecnologiche (Martinez-Rodriguez et al. 2001b). La

composizione chimica del vino base e il processo di produzione dello spumante rappresentano un ambiente ostile per la crescita dei lieviti e l'efficienza di fermentazione (Bidan et al., 1986). Il vino base di solito è caratterizzato da una concentrazione costante di etanolo (circa il 10%-12% v / v), un basso pH (2,8-3,5), un'elevata acidità totale (5-7 g/ L) e un contenuto totale di SO₂ generalmente tenuto basso (max 50-80 mg / L). Oltre a questi fattori critici, dobbiamo considerare le basse temperature che si utilizzano durante la fermentazione secondaria (10-15 °C) e l'elevata quantità di CO₂ / alta pressione (sino a 6 atm) associata a questo processo (Borrull et al., 2015). Pertanto, le colture starter di lievito per la fermentazione secondaria devono essere selezionate al fine di sopravvivere alle sollecitazioni sopra descritte e, in particolare, all'alta concentrazione di etanolo e al basso valore di pH (Kemp et al., 2015). Le basse temperature di fermentazione (12-18 °C), tipiche della spumantizzazione, rallentano l'attività di fermentazione ma questo è utile per il miglioramento della qualità degli spumanti. Un lento tasso di fermentazione permette di ottenere una migliore presa di spuma e un buon bouquet. La quantità di SO₂ è generalmente piuttosto bassa, inoltre, la maggior parte di essa è nella forma combinata e non può esibire un effetto inibitorio. Il basso valore di pH è uno dei principali fattori negativi che possono influire sulla fermentazione secondaria di un vino base tipico. Infatti, i vini base contengono generalmente elevate quantità di acidi organici (come gli acidi tartarico, malico, succinico e acetico) nella forma non dissociata (al pH comune), che sono suscettibili di acidificare il citosol del lievito, portando così a un rallentamento della fermentazione o ad un suo arresto (Borrull et al., 2015). Un altro parametro biologico che dovrebbe essere considerato durante la selezione delle colture starter per la fermentazione secondaria è la loro capacità di subire l'autolisi. Si intende, quindi, l'uso di lieviti con fenotipo autolitico ceppo-dipendente che, come conseguenza dell'autolisi, attua il rilascio

nel vino di diversi composti associati al lievito in grado di influenzare le proprietà organolettiche e schiumogene dello spumante (Martínez-Rodríguez et al., 2000; Charpentier et al., 1993). Un'altra caratteristica tecnologica interessante per la produzione di vino spumante è la capacità di flocculazione del ceppo candidato. L'elevata capacità di flocculazione è un criterio importante nella selezione della coltura per il metodo classico rifermentato in bottiglia, perché l'attitudine al lievito ad alta flocculazione facilita la rimozione dei sedimenti alla sboccatura (Bidan et al., 1986). Allo stesso tempo, la flocculazione impedisce ai sedimenti di lievito di rimanere attaccati alla bottiglia, evitando così la torbidità del prodotto finale (Carrascosa et al., 2011) Collegata a questo fenotipo litico, un'altra proprietà del lievito da valutare durante la selezione iniziale è la presenza del fenotipo killer. Un lievito killer è un ceppo di lievito che è in grado di secernere una o più proteine tossiche, che sono letali per i ceppi di lievito sensibili. Questo fenomeno biologico dovrebbe essere analizzato, controllando sia i fenotipi killer che quelli sensibili, perché l'autolisi del lievito può essere migliorata con un inoculo misto di ceppi di lievito "killer" e sensibili per la fermentazione secondaria (Todd et al., 2000).

1.3.1 Lieviti immobilizzati

Nella produzione tradizionale di spumanti, la rimozione delle fecce è un processo molto laborioso e dispendioso in termini di tempo ed è stato studiato l'uso di lieviti immobilizzati al fine di ridurre e semplificare le procedure di remuage sboccatura. (Torresi et al., 2011). L'immobilizzazione dei lieviti consiste nell'introduzione nella bottiglia di una certa quantità di sferule contenenti cellule di lievito. Mentre le cellule crescono, rimangono intrappolate nelle sferule e la limpidezza del vino viene preservata (Zambonelli, 2006).

Quando una bottiglia contenente lieviti immobilizzati viene invertita, le sferule si depositano rapidamente nel collo e possono essere facilmente rimosse (Torresi et al., 2011). Tra le tecniche di immobilizzazione disponibili, l'occlusione in gel polisaccaridici come agar, alginato e carragenina è la più importante e ampiamente utilizzata (Torresi et al., 2011). Il metabolismo confrontato delle cellule intrappolate e libere durante la fermentazione in bottiglia mostra alcune differenze, ma i prodotti finali non rivelano una significativa disparità sensoriale. Ovviamente, l'efficienza di un biocatalizzatore come il lievito immobilizzato dipende spesso dallo stato fisiologico delle cellule, poiché tutte le manipolazioni durante la procedura di immobilizzazione sono stressanti per loro (Scheper et al., 2000).

1.3.2 Autolisi

Lo spumante prodotto dal metodo tradizionale o champenoise richiede due fermentazioni successive (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). L'essenza del metodo champenoise è la seconda fermentazione, che avviene in bottiglia e aumenta il contenuto alcolico e la pressione interna della bottiglia (fino a 5-7 atmosfere). Dopo questa seconda fermentazione alcolica, il vino viene invecchiato nelle fecce (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). L'autolisi del lievito avviene durante questo contatto prolungato (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Tuttavia, l'autolisi è un processo lento che richiede da pochi mesi ad anni, a seconda di vari fattori quali la temperatura, la disponibilità di nutrienti, il vitigno o il ceppo di lievito utilizzato (Nunez et al., 2005). Il termine autolisi è stato introdotto da Salkowsky nel 1875 (Farrer, 1956) e può essere definito come l'idrolisi di biopolimeri sotto l'azione di enzimi idrolitici che rilasciano composti citoplasmatici (peptidi, amminoacidi,

acidi grassi e nucleotidi) e della parete cellulare (glucani, mannoproteine) nel vino (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Tuttavia, ha un decorso molto lento e inizia quando vengono consumati zuccheri e altri nutrienti. Per questo motivo, le cellule di lievito si rivolgono alle proprie riserve energetiche interne, ma una volta esaurite, inizia la degenerazione cellulare e inizia il processo di autolisi (Torresi et al., 2011). La bassa temperatura di invecchiamento provoca un basso tasso di mortalità e bassi tassi di reazione enzimatica, spiegando la lentezza del processo (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Il periodo di invecchiamento è necessario per conferire a questi vini la loro rotondità e il loro aroma e sapore caratteristici (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Durante il processo di autolisi, le proteasi idrolizzano le proteine del lievito in composti a basso peso molecolare. (Torresi et al., 2011). Molti eventi diversi si verificano durante l'autolisi del lievito (Figura 1), sebbene il processo che porta all'autolisi non sia completamente compreso. Subito dopo la seconda fermentazione alcolica le cellule di lievito sono allungate e ovoidali. La parete cellulare è spessa e liscia. All'interno della cellula un grande vacuolo è circondato da corpi sferici (Figura 1a). Tra tre e sei mesi (Figura 1b), la cellula e il vacuolo sono più piccoli. I corpi sferici sono distribuiti in tutto il vacuolo. La parete cellulare è ruvida, si possono vedere piccole rughe o pieghe. Tra nove e 12 mesi (Figura 1c), la cellula sembra essere collassata, spiegando le sue piccole dimensioni. La parete cellulare rimane ininterrotta, con molte creste e pieghe; tuttavia, le cellule di lievito hanno perso la maggior parte del loro contenuto citoplasmatico. Il destino della membrana plasmatica durante questo processo non è chiaro.

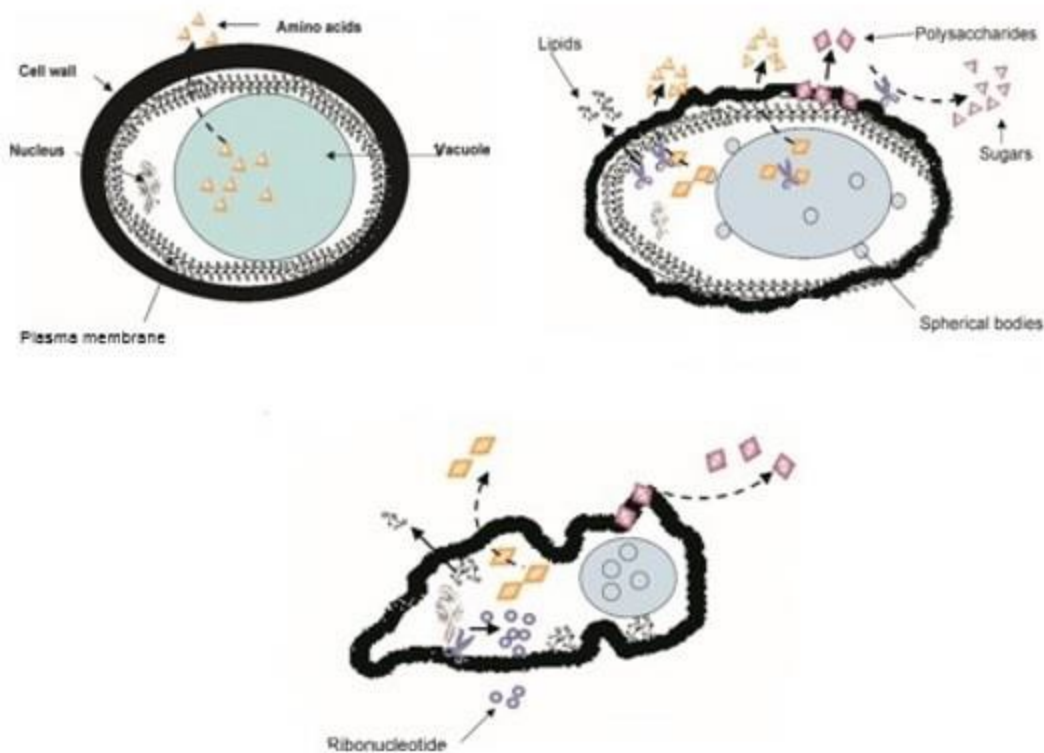


Figura 1 - Cambiamenti morfologici e biochimici nel lievito durante l'autolisi in vino spumante – Alexandre H. & Guilloux-Benatier M., 2006

Durante l'invecchiamento del lievito, i cambiamenti biochimici sono i seguenti: all'inizio c'è un'escrezione o assorbimento passivo (Morfaux & Dupuy, 1966) di aminoacidi. Dopo tre-sei mesi, il mezzo continua ad essere arricchito in aminoacidi a causa dell'idrolisi peptidica e proteica e vi è un aumento significativo dei polisaccaridi dalla parete cellulare. Inizia la degradazione della membrana plasmatica, con il rilascio di lipidi nel mezzo. Da nove a 12 mesi, la concentrazione di aminoacidi diminuisce e domina il rilascio di peptidi e proteine. I polisaccaridi della parete cellulare, i lipidi e i ribonucleotidi aumentano leggermente. (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006) L'autolisi dei lieviti durante l'invecchiamento nel vino spumante rilascia nel mezzo diversi composti, che modificano le

proprietà fisiche e organolettiche dello spumante. La tabella 1 riassume questi cambiamenti (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006).

Origin	Compound type	Proven or potential impact on sparkling wine	References
Cell content	Nucleoside	Flavouring agent	Leroy et al. (1990) Charpentier et al. (2005) Courtis et al. (1998)
	Nucleotide		
	Amino acid	Aroma precursors	Feuillat and Charpentier (1982) Moreno-Arribas et al. (2000)
	Peptide		
	Protein	Sweet and bitter taste	Malvy et al. (1994)
Protein	Sweet and bitter taste		
Lipids	Foam quality	Polo et al. (1992) Gallart et al. (2002)	
Cell wall	Glucan	Foam quality	Andres-Lacueva et al. (1997) Moreno-Arribas et al. (2000)
	Mannoprotein	Increase in mouthfeel	Bertuccioli and Ferrari (1999)

Tabella 1. *L'origine dei diversi composti rilasciati durante l'autolisi dei lieviti e il loro impatto dimostrato o potenziale sullo spumante. - Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006.*

1.3.3 La schiuma

Il fattore principale che distingue gli spumanti dai vini fermi è l'effervescenza, questo è dovuto alle bollicine di anidride carbonica che salgono continuamente attraverso il liquido. L'effervescenza rappresenta un criterio di qualità fondamentale, si comporta anche come vettore di aromi perché le bolle contengono CO₂ e alcuni composti odorosi. Quando la bottiglia viene stappata, la CO₂ viene rapidamente rilasciata come conseguenza della differenza tra la pressione della bottiglia e quella della stanza. Quando lo spumante viene versato nel bicchiere, l'anidride carbonica dà origine al perlage (catene di gas che salgono attraverso lo spumante) e all'aspetto della schiuma. Le bollicine provengono da siti di nucleazione formati da minuscole particelle solide localizzate nel vino o sulle pareti di

vetro. Le bollicine di CO₂ continuano ad allargarsi perché la loro pressione interna è inferiore rispetto al vino. Quando il diametro delle bollicine raggiunge un valore critico, arrivano fino alla superficie libera dal vino (Torresi et al., 2011). Le proteine sono note per influenzare positivamente le proprietà e le caratteristiche della schiuma come il volume della schiuma, la schiumosità e la stabilità della schiuma nelle bevande gassate. Le proteine presenti nel vino sono sia derivate dall'uva che dal lievito, con la concentrazione proteica che dipende dalle pratiche enologiche e viticole (Condè et al., 2017). Le proteine sembrano essere sostanze attive della schiuma a causa delle loro proprietà superficiali. Agiscono come composti tensioattivi e migliorano la stabilità della schiuma (García et al., 2009). La dinamica dell'assorbimento delle proteine nella matrice della schiuma e la sua influenza sulla formazione di schiuma e sulla stabilità della schiuma nei vini spumanti non sono ancora chiare. La formazione di schiuma dipende dalle proteine che mostrano un rapido adsorbimento e capacità di dispiegamento all'interfaccia gas-liquido, mentre la stabilità della schiuma richiede che le proteine formino forti legami per prevenire la coalescenza della schiuma (Condè et al., 2017). Le proteine che promuovono la formazione di schiuma non necessariamente potrebbero migliorare la stabilità della schiuma; tendono ad essere flessibili e di peso molecolare inferiore, con conseguente esposizione di residui idrofobici. In contrasto, anche la composizione aminoacidica delle proteine e le interazioni che si verificano tra i legami disolfuro sono di fondamentale importanza per la stabilità della schiuma. In effetti, le caratteristiche essenziali degli stabilizzatori della schiuma includono la presenza di gruppi solfidrilici liberi (-SH). Diversi tipi di proteine potrebbero interagire tra loro, con conseguente maggiore viscosità, prevenendo così la coalescenza della schiuma (Condè et al., 2017).

1.4 Lieviti non-Saccharomyces in vinificazione

La fermentazione alcolica per la vinificazione viene solitamente effettuata inoculando il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, il lievito più utilizzato, spesso indicato come lievito da vino "convenzionale". Nel corso dell'ultimo decennio, i lieviti "non convenzionali" sono diventati popolari (Masneuf-Pomarede et al., 2016) e gli effetti dei lieviti non-*Saccharomyces* sulla qualità del vino sono stati ampiamente studiati (Romani et al., 2018). Tradizionalmente, sono stati studiati solo gli impatti negativi dei lieviti non-*Saccharomyces*, poiché si credeva che fossero la ragione dei problemi correlati ai microorganismi durante la vinificazione. Questi includevano un'alta produzione di composti indesiderati, cioè acido acetico, acetato di etile e acetaldeide (Domizio et al., 2011; Comitini et al., 2011). È stato suggerito che l'uso diffuso di ceppi di *S. cerevisiae* commercializzati nella vinificazione crea uniformità nei vini (Vigentini et al., 2017). Tuttavia, l'esclusione dei lieviti non-*Saccharomyces* dal processo di fermentazione può comportare una perdita di complessità e la mancanza di carattere distintivo per i vini (Varela et al., 2009; García et al., 2016). I lieviti non-*Saccharomyces*, che si trovano naturalmente sull'uva, possono influire positivamente sulla qualità del vino (Chasseriaud et al., 2018). La maggiore conoscenza della biochimica e della fisiologia del lievito ha reso possibile la selezione di ceppi di lievito con tratti specifici (García et al., 2016). I potenziali benefici dell'utilizzo del lievito non-*Saccharomyces* nella vinificazione sono stati ben documentati per i vini fermi, ma molto meno per i vini spumanti (Jolly et al., 2014). L'attuale domanda di vini innovativi nel competitivo mercato internazionale crea nuove opportunità per produrre vini con caratteristiche uniche (Comitini et al., 2017). L'interesse per il lievito non-

Saccharomyces destinato alla produzione di spumanti è aumentato negli ultimi anni e ha quindi generato una nuova area di ricerca per i viticoltori (Ivit & Kemp, 2018). L'influenza dei lieviti non-*Saccharomyces* sul profilo sensoriale dei vini è di grande interesse nella ricerca attuale (Varela, 2016). I lieviti non-*Saccharomyces* possiedono particolari caratteristiche metaboliche che influenzano il profilo organolettico dei vini (Padilla et al., 2016). Sono stati segnalati anche i generi *Hanseniaspora* e *Torulasporea* per il miglioramento della presenza di alcuni aromi interessanti (Maturano et al., 2012; Bely., 2008) e la riduzione dell'acidità volatile (Contreras et al., 2014; Sadoudi et al., 2012). Inoltre, alcuni ceppi di *T. delbrueckii* sembravano anche avere una maggiore capacità produttiva di polisaccaridi rispetto a *S. cerevisiae* (Giovani et al., 2012; Domizio et al., 2014). Un altro aspetto interessante recentemente descritto è l'attività antimicrobica di *M. pulcherrima*. La presenza di *M. pulcherrima* non influenza la crescita di *S. cerevisiae* ma possiede un'azione antimicrobica ampia ed efficace sui lieviti selvaggi spoilage indesiderati, come *Brettanomyces/Dekkera* (Oro et al., 2014). Sono stati studiati gli effetti sensoriali dei lieviti non-*Saccharomyces* sui vini base, sulla rifermentazione e sull'invecchiamento sui lieviti (Medina et al., 2017; Canonico et al., 2018).

1.5 Prodotti secondari di fermentazione

Durante la fermentazione alcolica primaria dello zucchero, il lievito di vino, *S. cerevisiae*, insieme ad altre specie indigene non-*Saccharomyces*, produce etanolo, anidride carbonica e una serie di prodotti secondari. Di questi metaboliti derivati dal lievito, gli alcoli, gli acetati e gli esteri etilici degli acidi grassi C4-C8 si trovano nella più alta concentrazione nel vino.

Mentre i metaboliti volatili contribuiscono al bouquet di fermentazione onnipresente per tutti i vini giovani, i livelli di produzione di questi sottoprodotti sono variabili e specifici del ceppo di lievito (Lambrechts et al., 2000). Nel suo senso più ampio, il sapore del vino si riferisce all'impressione generale sia delle componenti aromatiche che di quelle gustative. L'aroma è solitamente associato a composti odorosi e volatili (Lambrechts et al., 2000). L'aroma del vino è classificato in base alle fonti dei diversi composti che vi contribuiscono. Ciò include l'aroma varietale (composti aromatici originati dall'uva), l'aroma prefermentativo (composti formati durante le operazioni di estrazione e condizionamento del mosto), l'aroma fermentativo (prodotto da lieviti e batteri durante la fermentazione alcolica e malolattica) e l'aroma post-fermentativo (composti che compaiono durante il processo di invecchiamento attraverso enzimatico o fisico-chimico attuato in legno o in bottiglia) (Rapp, 1998). Varie vie biosintetiche sono interattive durante la formazione dell'aroma delle bevande alcoliche. La fermentazione aumenta la complessità chimica e aromatica del vino aiutando nell'estrazione di composti dai solidi presenti nell'uva, modificando alcuni composti derivati dall'uva e producendo una notevole quantità di metaboliti del lievito (Lambrechts et al., 2000). I principali gruppi di composti che formano il "bouquet di fermentazione" sono gli acidi organici, gli alcoli superiori e gli esteri e, in misura minore, le aldeidi (Rapp & Versini, 1991). Se presenti in concentrazioni eccessive, alcuni composti del bouquet di fermentazione possono anche essere considerati indesiderabili, come l'acetaldeide, l'acido acetico, l'acetato di etile, gli alcoli superiori e il diacetile (Lambrechts et al., 2000). Diversi ricercatori hanno dimostrato che, a differenza delle specie *Saccharomyces*, i lieviti *non-Saccharomyces* producono e secernono diversi enzimi (esterasi, glicosidasi, lipasi, beta-glucosidasi, proteasi, cellulasi ecc.) nello spazio periplasmatico e nel mezzo, dove possono interagire con i composti precursori dell'uva per

produrre composti attivi aromatici, e quindi svolgere un ruolo importante nell'aroma varietale (Charoenchai *et al.*, 1997). I principali prodotti volatili del metabolismo del lievito, etanolo, glicerolo e anidride carbonica, rendono un piccolo, ma, comunque, fondamentale contributo all'aroma del vino (Lambrechts *et al.*, 2000). I composti aromatici più "negativi" sono i composti ridotti di zolfo, idrogeno solforato, solfuri organici e tioli. Il sapore fermentativo non è determinato solo dalla conversione di sostanze direttamente fermentabili, ma anche dagli acidi grassi a catena lunga, composti organici contenenti azoto, contenenti zolfo composti e molti altri. Questi composti sono in grado penetrare dal mezzo del succo d'uva attraverso la membrana della cellula di lievito, dove partecipano a reazioni biochimiche per la produzione di numerose sostanze volatili come sottoprodotti (Boulton *et al.*, 1995).

1.5.1 Terpeni

I terpeni rappresentano metaboliti secondari che hanno origine dalle uve (Cotea *et al.*, 2021). L-linalolo conferisce un fresco aroma floreale ai vini, che ricorda le spezie e le note di limone (Cotea *et al.*, 2021). Questo composto viene convertito dall'azione degli acidi in geraniolo, nerolo e alfa-terpineolo, rispettivamente (Lengyel *et al.*, 2012). L'alfa-terpineolo di solito conferisce al vino un odore fruttato (melone) e un profumo floreale (lilla). È formato da monoterpeni-glicosidi in un mezzo acido (Strauss *et al.*, 1986). Questo composto può provenire dall'uva (in basse concentrazioni) e avere un alto valore di percezione olfattiva (Lengyel *et al.*, 2012).

1.5.2 Esteri

Gli esteri sono prodotti dai lieviti durante la fermentazione e contribuiscono positivamente all'aroma del vino conferendo caratteristiche di frutta al vino. L'estere principale nel vino, l'acetato di etile, provoca il deterioramento a livelli di 150-200 mg / L. Ci sono esteri che producono aromi piacevoli, tra cui acetato di etile con odori di banana e pera, acetato di 2-fenetile con rosa, miele, odori fruttati e fioriti, etanoato di etile con mela e viola e ottanoato di etile con ananas e pera (Lambrechts et al., 2000). La maggior parte degli esteri rappresenta sottoprodotti dell'azione metabolica del lievito, con un contenuto più elevato nel vino dopo che la divisione cellulare è rallentata o sostanzialmente cessata. Le forme a catena lineare sono sintetizzate dall'esterificazione degli acidi corrispondenti, che sono stati attivati dall' acil-coenzima A sintetasi (Jackson et al., 2014). Sebbene durante la fermentazione si formi un gran numero di alcoli e acidi, alcuni sono presenti nella materia prima, ad esempio l'uva. Tutti gli alcoli e gli acidi possono reagire per formare esteri e quindi il numero teorico di esteri nel vino è molto grande (Lambrechts et al., 2000). Secondo Nordstrom (1964), la formazione di acetato di etile durante la fermentazione procede secondo la seguente reazione: $CH_3CO-SCoA + C_2H_5OH \rightarrow CH_3COOC_2H_5 + CoASH$. Gli alcoli si esterificano reagendo con gli acidi grassi che hanno subito una precedente attivazione combinandosi con il coenzima A (CoASH). Baumes et al. (1986) ha diviso gli esteri in due gruppi, sulla base della valutazione degli odori. Il primo gruppo lo ha definito apolare. Gli esteri apolari hanno soglie di odore di rilevamento piuttosto basse e, ad eccezione dell'acetato di etile, contribuiscono con note di frutta e fiori all'aroma del vino. Gli esteri apolari sono presenti nel vino in quantità inferiori rispetto agli esteri polari e comprendono acetato di etile, acetato di isoamile, ottanoato di etile, esanoato di

etile, propanoato di etile, butanoato di etile e acetato di 2-fenetile. Gli esteri polari hanno dimostrato di contribuire in modo relativamente insignificante all'aroma del vino, contribuendo maggiormente al corpo di un vino. Includono 2-etil-idrossipropionato, dietil succinato, etil-4-idrossibutanoato, dietil malato, isopentil-2-idrossipropionato ed etile-3-idrossi butanoato. L'esanoato di etile ha un odore che ricorda la mela e la violetta, l'ottanoato di etile un odore che ricorda l'ananas e la pera e il decanoato di etile ha un odore floreale (Boulton et al., 1995). Molti esteri possono essere formati, ma i più significativi sono esteri di acetato di alcoli superiori: acetato di etile, acetato di isoamile, acetato di isobutile, esanoato di etile e acetato di 2-feniletile; ed esteri etilici degli acidi grassi saturi a catena diritta: butanoato di etile, esanoato di etile, ottanoato di etile, decanoato di etile e dodecanoato di etile (Fujii et al., 1994). L'acetato di etile è l'estere principale presente nel vino (Lambrechts et al., 2000). Poiché l'acetil-CoA/acido acetico e l'etanolo sono gli acidi e gli alcoli più abbondanti presenti nella fermentazione, l'acetato di etile è normalmente l'estere più abbondante (Lambrechts et al., 2000).

1.5.3 Aldeidi

Le aldeidi, principalmente l'acetaldeide, contribuiscono agli odori simili alle mele al vino e ad alti livelli possono anche causare deterioramento. Per quanto riguarda i composti carbonilici, il diacetile è prodotto dal metabolismo del lievito e gli aromi burrosi risultanti sono percepibili a concentrazioni comprese tra 1-4 mg / L (Lambrechts et al., 2000). Le aldeidi volatili a catena corta sono importanti per il sapore di una serie di alimenti e bevande, tra cui il vino, contribuendo a caratteristiche aromatiche che vanno da "simili a mele" a "agrumi" a "nocciole" a seconda della struttura chimica. Insieme ai chetoacidi, le

aldeidi alifatiche a catena corta sono i composti chiave nella reazione biochimica che coinvolge la produzione di alcoli superiori da amminoacidi e zuccheri da parte del lievito (Lambrechts et al., 2000). I precursori delle aldeidi, i 2-chetoacidi, si formano come intermedi sia nella formazione anabolica che catabolica di amminoacidi o in piccole quantità superiori di aldeidi (Berry, 1995). L'acetaldeide è un prodotto intermedio formato da piruvato ed è un precursore dell'acetato, dell'acetoino e dell'etanolo. L'ossidazione degli alcoli, la degradazione strecker degli amminoacidi e l'autossidazione degli acidi grassi possono anche produrre aldeidi nelle bevande alcoliche (Lambrechts et al., 2000). Secondo Torrens et al. (2008) e Riu-Aumatell et al. (2006), il dietil succinato rappresenta uno degli "esteri di invecchiamento" i cui livelli possono mostrare aumenti significativi nel contatto con le cellule di lievito attraverso la seconda fermentazione.

1.5.4 Acidi

Gli acidi possono originarsi dalla pianta dell'uva ma anche dalla fermentazione alcolica, risultando in alcuni acidi grassi che hanno proprietà sensoriali ma possono anche integrare altri ruoli (Cotea et al., 2021). Gli acidi grassi a catena corta, gli acidi acetico, propionico e butanoico, sono sottoprodotti della fermentazione, sebbene la presenza di acido propionico e butanoico sia associata all'intervento di batteri (Ribereau-Gayon et al., 1998). I batteri acetici e dell'acido lattico possono anche essere associati ad alti livelli di acido acetico. (Lambrechts et al., 2000). Gli acidi grassi volatili a catena media (C8, C10 e C12), sono prodotti dai lieviti come intermedi nella biosintesi degli acidi grassi a catena lunga, piuttosto che come risultato del catabolismo acido. Gli acidi grassi a catena media e i loro esteri etilici sono componenti naturali delle bevande alcoliche (Lambrechts et al., 2000).

1.5.5 Alcoli superiori

Il termine alcoli superiori si riferisce a coloro che possiedono più di due atomi di carbonio con un peso molecolare e un punto di ebollizione più elevati rispetto all'etanolo. Gli alcoli superiori sono quantitativamente il più grande gruppo di composti aromatici nelle bevande alcoliche, e sono prodotti secondari della fermentazione alcolica (Amerine et al., 1980). Gli alcoli superiori, noti anche come alcoli di fusello, possono essere riconosciuti dal loro odore e sapore forti e pungenti e possono avere un'influenza significativa sul gusto e sul carattere del vino e del brandy. Sebbene presentino un aroma aspro e sgradevole alle concentrazioni generalmente presenti nel vino (a meno che il mosto non contenga un alto livello di solidi sospesi), al di sotto di 300 mg/L di solito contribuiscono alla complessità desiderabile del vino. Quando le loro concentrazioni superano i 400 mg/L, gli alcoli superiori sono considerati un'influenza negativa sulla qualità del vino (Rapp & Mandery, 1986). Gli alcoli superiori sono composti da alcoli alifatici e aromatici (Nykanen et al., 1977). Gli alcoli alifatici comprendono il propanolo, l'alcole isobutilico, l'alcole amilico attivo e l'alcole isoamilico; gli alcoli aromatici di cui l'alcol fenilico è il più importante. Oltre all'alcol fenilico, l'altro importante alcol fenolico nel vino è il tirosolo. Questo fenolo sintetizzato dal lievito ha un odore delicato, di cera d'api, simile al miele (Lambrechts et al., 2000). L'alcol Isoamilico è il principale alcol di fusello alifatico sintetizzato dal lievito durante la fermentazione (Lambrechts et al., 2000). Altri importanti alcoli superiori sono il propanolo, l'alcol isobutilico e l'alcol amilico otticamente attivo (Lambrechts et al., 2000). Gli alcoli superiori sono anche importanti precursori per la formazione di esteri (Soles et al., 1982) e gli esteri degli alcoli superiori sono associati ad aromi piacevoli (Lambrechts et al., 2000). Gli alcoli superiori sono prodotti dai lieviti

durante la fermentazione alcolica attraverso la conversione degli amminoacidi a catena ramificata presenti nel mezzo: valina, leucina, isoleucina, treonina e fenilalanina. Sono anche prodotti *de novo* da un substrato di zucchero (Lambrechts et al., 2000).

1.5.6 C-13 Norisoprenoidi

Il β -damascenone è l'unico C13-norisoprenoide in grado di contribuire positivamente all'aroma del vino. Allo stesso tempo, questo composto può sinergicamente modificare l'aroma di altri composti (Pineau et al., 2007). Questo composto può contribuire a dare un odore dolce, di miele (Gurbuz et al., 2006).

Capitolo secondo

SCOPO DEL LAVORO

Il profilo analitico-sensoriale dei vini spumanti è determinato dal contenuto dei diversi composti secondari di fermentazione che possono esercitare un'azione positiva o negativa sulla composizione finale del prodotto (Vincenzini et al., 2005). Durante la seconda fermentazione e successivo affinamento a contatto con le fecce, alcuni composti come acetali ed esteri etilici diminuiscono in quantità, mentre altri, come i norisprenoidi, sembrano aumentare nel corso del tempo. Questi composti volatili sono responsabili del profilo sensoriale di un vino spumante.

Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'influenza dei lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* in prove di spumantizzazione. In primo luogo, è stato valutato il comportamento fermentativo di ciascun ceppo durante il processo di rifermentazione, monitorando l'evoluzione della biomassa. Allo stesso tempo sono stati valutati i parametri chimici, la produzione di composti volatili e metaboliti secondari ed infine il profilo sensoriale, sviluppato durante la fermentazione secondaria dello spumante, prodotto con metodo classico in bottiglia.

Dopo un primo screening effettuato in laboratorio, i due ceppi che hanno mostrato le migliori performance di rifermentazione, sono stati testati per la rifermentazione in autoclave e valutando i prodotti finali in termini di caratteri analitici, volatili e sensoriali.

A tale proposito, l'importanza di una produzione industriale parallela alle prove in laboratorio è non solo quella di effettuare un confronto riguardante la quantità e la qualità dei prodotti di fermentazione sviluppati nel corso della rifermentazione con ciascun

metodo, ma anche quella di poter valutare la possibilità di produzione di spumante da lieviti non convenzionali anche con il metodo Charmat.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento delle prove sperimentali

In questo elaborato di tesi sono stati utilizzati due ceppi di *Lachancea thermotolerans* 101 e DiSVA 1066, un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* L951, un ceppo di *Tourolaspora delbrueckii* J401 e un ceppo di *Brettanomyces bruxellensis* 6706. Questi ceppi sono conservati nella collezione di lieviti del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DISVA) dell'Università Politecnica delle Marche. I lieviti, originariamente isolati da matrici naturali e conservati alla temperatura di 4 gradi, sono stati rinfrescati su terreno YPD agar (2% glucosio, 2% peptone, 1% estratto di lievito e 1,8% agar) e le piastre sono state fatte sviluppare in termostato a 25 gradi, mantenendole in una busta di plastica aperta per evitarne il disseccamento.

La produzione del vino spumante è stata effettuata utilizzando un vino base Verdicchio fornito dall'azienda vinicola Terre Cortesi Moncaro s.r.c.l, Montecarotto (AN).

Il vino base per la produzione di spumante con metodo tradizionale è stato sterilizzato attraverso la filtrazione con un sistema filtrante, utilizzando membrane da 0.45 micrometri.

Il vino base è stato inoltre supplementato con 24 g/L di saccarosio, al fine di ottenere una pressione finale di 6 atm, e 10 g/L di diammonio fosfato come fonte di azoto.

I lieviti starter sono stati pre-coltivati allestendo le precolture in due fasi. La prima pre-coltura è stata allestita inoculando ogni ceppo in falcon contenenti 40 ml di mosto

(concentrazione di saccarosio 282 g/L) per 5 giorni a 19 gradi. Successivamente, le pre-colture sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti, ripetendo l'operazione per 2 volte. Il centrifugato di lieviti è stato risospeso in mosto di nuovo. La seconda pre-coltura è stata allestita in beute con valvola di Muller, contenenti la risospensione di lieviti e 50 ml dello stesso vino base utilizzato per la rifermentazione, facendo continuare la fermentazione a 19 gradi. Dopo 7 giorni, sono stati aggiunti altri 100 ml di vino. La pre-fermentazione è stata monitorata per 15 giorni attraverso la pesata quotidiana delle beute, valutando perdita di peso dovuta alla fuoriuscita di CO₂ dalla beuta, per effetto della fermentazione degli zuccheri.

L'inoculo dei ceppi nelle bottiglie per la produzione dello spumante era stato progettato per una iniziale concentrazione di lieviti di approssimativamente 1×10^6 (6) cell/mL. Il numero di cellule di lievito presenti nelle precolture è stato stimato usando una camera contaglobuli di Thoma Zeiss.

Sono state preparate quattro bottiglie da 750 ml per ogni prova, di cui 1 bottiglia per prova è stata chiusa con un afometro al fine di seguirne l'evoluzione di pressione durante la rifermentazione in bottiglia, mentre le altre sono state tappate con bidule e tappo a corona. La stessa quantità di bottiglie da 375 ml è stata preparata per eseguire il monitoraggio della biomassa. Per la seconda fermentazione, le bottiglie sono state mantenute a una temperatura di 18 ° C in termostato.

A questo periodo è seguita la fase di *remuage*, dove la gravità ha trasmesso il sedimento al collo della bottiglia delle fecce; quando quest'ultime sono poi completamente convogliate nel collo della bottiglia e lo spumante è risultato completamente chiaro, le bottiglie sono state considerate pronte per la rimozione dei sedimenti.

Il vino base la produzione di spumante con metodo Charmat è stato filtrato utilizzando membrane da 0,45 micrometri e, successivamente, supplementato con 33 g/l di saccarosio, 5 g di alimento per lievito “Nutriferm Tirage”, 0,9 g di tannino “Tan Style Perlage”, 3 g di fosfato biammonico, 0,25 g di tannino “Rh Enò”.

Circa 40 litri di vino base sono stati riscaldati a 20 °C prima di essere immessi in autoclave da 50 litri. L'autoclave è stata mantenuta a 20 °C per tutto il tempo della rifermentazione. Successivamente, la temperatura è stata abbassata per immersione in acqua glicolata a 0 °C per 12 ore, al fine di arrestare la fermentazione. Il raffreddamento dell'autoclave è stato continuato in congelatore per 20 ore.

3.2 Monitoraggio della fermentazione

I valori di pressione dagli afrometri sono stati presi per 120 giorni. Con questi dati è stata costruito un grafico rappresentante la cinetica di fermentazione di ogni ceppo. Le pressioni dei campioni industriali sono state prese durante i primi undici giorni di rifermentazione.

3.3. Monitoraggio della biomassa

La quantità cellule vitali è stata determinata utilizzando il metodo della conta su piastra. Dalle bottiglie da 375 ml è stato preso 1 ml di campione e sottoposto alle diluizioni seriali nelle provette. Dalle provette vengono prelevati 100 µl di soluzione e piastrati in piastre di YPD. Dopo opportuna incubazione si procede alla conta delle UFC. I campioni sono stati

prelevati dalle bottiglie da 375 ml al tempo 0 e intorno ai 17, 24, e 120 giorni. Con i dati relativi alle conte è stato costruito un grafico rappresentante cinetica di popolazione.

3.4 Analisi chimiche

3.4.1 Estrazione ed analisi della componente volatile

I composti volatili sono stati estratti utilizzando il metodo di microestrazione in fase solida (SPME) e valutati mediante gascromatografia liquida capillare.

Nella gas-cromatografia la fase fissa è una colonna contenente il materiale attivo e la fase mobile è un gas, la separazione avviene sulla base delle diverse caratteristiche di volatilità dei composti; ogni composto, infatti, fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rivelatore. La gascromatografia è utilizzata per la separazione di sostanze volatili o volatilizzabili come idrocarburi a basso peso molecolare, aromi, acidi organici. L'estrazione è avvenuta tramite l'utilizzo di solventi, precedentemente descritti, mentre per calibrare il sistema analitico è stata utilizzata una curva di taratura ottenuta mediante l'iniezione di soluzioni standard a differente concentrazione per ogni composto volatile da analizzare.

I 14 composti volatili valutati nei vini spumanti sono i seguenti:

- etilbutirrato

- acetato di isoamile

- etilesanoato

- esanolo
- etilottanoato
- acido butirrico
- dietilsuccinato
- feniletilacetato
- 2-feniletanolo
- acido ottanoico
- acido decanoico
- linalolo
- etildodecanoato
- geraniolo

Per la rilevazione è stato utilizzato un gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma. Relativamente alla determinazione gascromatografica degli esteri e acidi volatili, 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.;

- volume campione iniettato: 1µl;
- 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: azoto.

3.4.1.2 Estrazione con tecnica SPME

Il metodo di microestrazione in fase solida (SPME) risulta maggiormente sensibile alla rilevazione di composti volatili. 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 *divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)*.

Nello specifico l'estrazione della componente volatile del vino spumante è stata eseguita seguendo varie fasi operative: 5 ml di vino spumante sono stati inseriti in un'apposita vials di vetro, successivamente, nella stessa fiala, sono stati aggiunti 25 µl di standard di estrazione, 3-ottanolo. L'ago è stato fatto passare attraverso il setto della fiala, con la fibra retratta per evitare la rottura della fibra stessa. Premendo lo stantuffo, la fibra è stata poi esposta sopra il campione liquido, in spazio di testa. In seguito, si è passati alla fase più importante del processo di estrazione in SPME, che prevede il condizionamento della fibra, per l'adsorbimento degli analiti, prima dell'analisi mediante gas-cromatografia (GC). Il

condizionamento è stato eseguito, per ogni campione, ad una temperatura di 50°C per 45 minuti. Passato questo tempo la fibra è stata retratta in ago e poi quest'ultimo rimosso dalla fiala che conteneva il campione. Con la fibra pronta e 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.

3.4.2 Analisi degli alcoli superiori

Gli alcoli superiori vengono determinati mediante iniezione al gas-cromatografo. La preparazione del campione da iniettare prevede la filtrazione di vino spumante (10-12 ml) con filtro da 0.2 µm. Una piccola aliquota di filtrato viene versata in un matraccio da 10 ml e si aggiungono 2 µl di standard interno, l'*1-pentanol*o. Si porta poi a volume il matraccio con il campione precedentemente filtrato, con l'utilizzo di una pipetta Pasteur. Il tutto viene agitato manualmente. A questo punto si procede all'analisi mediante gas-cromatografia (GC) impiegando lo stesso apparecchio utilizzato per l'analisi dei composti volatili. In questo sistema analitico, come in quello utilizzato per l'analisi dei composti volatili, la calibrazione è stata effettuata mediante una curva di taratura ottenuta dall'iniezione di soluzioni standard contenenti i composti volatili da analizzare a differente concentrazione.

Gli alcoli superiori determinati nei campioni di vino spumante sono:

- acetaldeide
- etilacetato
- propanolo
- isobutanolo
- amilicoattivo
- isoamilico

La determinazione gascromatografica degli alcoli superiori è stata eseguita iniettando 1 μ l di campione in una colonna 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 μ m);
- iniettore: split 10:2;
- volume campione iniettato: 1 μ l;
- temperatura: 40 °C per 5 minuti fino a 150 °C, poi 5 °C per 5 minuti fino a 220 °C, infine 20 °C per due minuti;
- gas vettore: azoto.

3.4.3 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

3.4.4 Determinazione dell'anidride solforosa

La quantità di SO_2 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 H_2SO_4 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):

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

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

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

3.4.5 Analisi acidità totale

L'acidità totale è espressa come g/l di acido tartarico. Viene misurata mediante titolazione con soluzione standard di una base e rilevazione del punto finale mediante pHmetro. Si preleva 25 ml da ogni campione, si mette in un beker e si immerge l'elettrodo nel vino, la cui temperatura deve essere il più possibile vicino a 20 °C e si titola con NaOH. Si fa cadere l'idrossido di sodio goccia a goccia da una buretta, facendo ben attenzione che le gocce non si fermino nelle pareti del beker, fino a raggiungere un pH stabile intorno a 7. A questo punto si osserva la buretta, controllando la quantità di NaOH messa, facendo attenzione al menisco. Poi, applicando la formula seguente, si calcola il valore dell'acidità totale di ogni campione analizzato:

Ac.totale = ml NaOH x 0,75, dove:

ml NaOH = ml di titolante

0,75 = fattore di correzione

3.4.6 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. 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.

3.4.7 Determinazione del pH

Il valore del pH in un vino spumante è legato alla natura e al grado di dissociazione degli acidi presenti e alle loro combinazioni con le basi. Costituisce un indice di acidità reale, a differenza dell'acidità totale. È un parametro che può subire variazioni durante le fasi di conservazione ed invecchiamento. La determinazione del pH è stata effettuata mediante un pH-metro con elettrodo a vetro, secondo il metodo potenziometrico. Lo strumento è stato prima calibrato con soluzioni tampone a pH 7, 4 e 9, avendo cura di sciacquare l'elettrodo con acqua distillata tra una soluzione e l'altra. Una volta calibrato lo strumento si passa alla misura del pH immergendo l'elettrodo nel vino spumante. Si legge direttamente il valore del pH sul display dello strumento.

3.4.8 Determinazione degli zuccheri residui finali

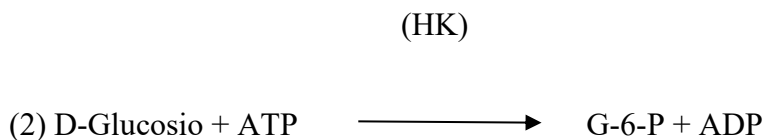
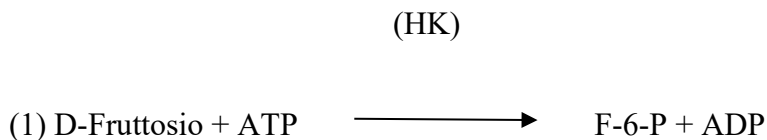
La determinazione degli zuccheri residui, fruttosio e glucosio espressi in g/l, nel vino spumante, è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico della ditta Megazyme.

Il kit contiene:

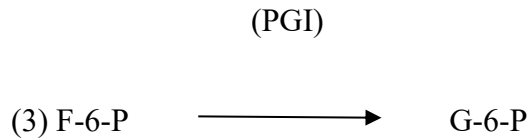
- Bottiglia 1: Buffer (100 ml, pH 10,0) + sodio azide (0,02% w/v), come conservante.
- Bottiglia 2: Compresse di prova (60) contenenti NADP⁺, ATP, INT e FAD.
- Bottiglia 3: Esochinasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, fosfoglucoisomerasi e sospensione diaforasi 1,3 ml.
- Bottiglia 4: Soluzione standard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

Principio

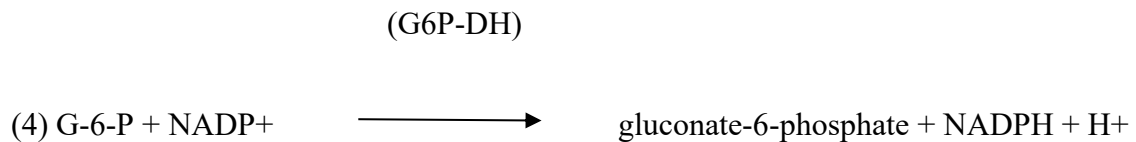
Il D-fruttosio e il D-glucosio sono fosforilati a Fruttosio 6-fosfato (F-6-P) e glucosio-6-fosfato (G-6-P) dall'enzima esochinasi (HK) e adenosina-5'-trifosfato (ATP), con la contemporanea formazione di adenosina-5'-difosfato (ADP) (1), (2).



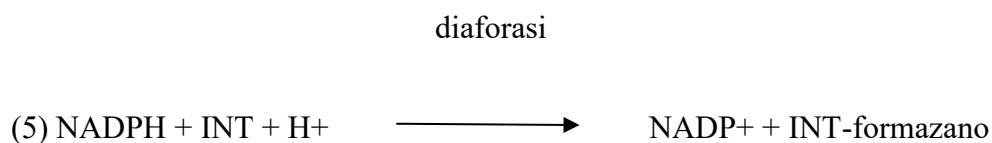
F-6-P è convertito a G-6-P dalla fosfoglucoisomerasi (PGI) (3).



In presenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH), G-6-P viene ossidato da Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP+) a gluconato-6-fosfato con formazione di nicotinammide-adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) (4).



La quantità di NADPH formata in questa reazione è stechiometrica con la quantità di D-fruttosio + D-glucosio. Nella quinta reazione, in presenza di diaforasi, NADPH riduce l'iodonitrotetrazolio cloruro (INT) a INT-formazano, che assorbe nell'intervallo 480-520 nm (5).



Modalità di esecuzione

Nel primo passaggio i campioni sono stati diluiti 1:50 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	1,05 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:

1. $\Delta A1 = A2 - A1$

2. Concentrazione del glucosio in g/l =

$$[\Delta A1 - 0,001(\text{bianco})] \times 0,6634 \times 50 \text{ (fattore di diluizione)}$$

$$3. \Delta A2 = A3 - A2$$

4. Concentrazione del fruttosio in g/l =

$$[\Delta A2 - 0,03(\text{bianco})] \times 0,6692 \times 50 \text{ (fattore di diluizione)}$$

3.4.9 Determinazione dell'acido lattico

La determinazione dell'acido lattico in g/l, nel vino spumante, è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico della ditta Megazyme.

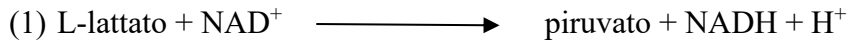
Il kit contiene:

- Bottiglia 1: Buffer (25 ml, pH 10,0) + D-glutammato e sodio azide (0,02% w/v), come conservante.
- Bottiglia 2: NAD^+ /PVP.
- Bottiglia 3: Sospensione di D-glutammato-piruvato transaminasi (1,1 mL).
- Bottiglia 4: Sospensione di L-lattato deidrogenasi (1,1 mL).
- Bottiglia 5: Soluzione standard di acido L-lattico.

Principio

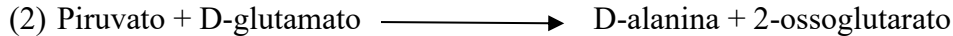
La quantificazione dell'acido L-lattico richiede due reazioni enzimatiche. Nella prima reazione, catalizzata dall' L-lattato deidrogenasi (L-LDH), l'acido L-lattico (L-lattato) è ossidato a piruvato dalla nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD⁺) (1)

(L-LDH)



Tuttavia, poiché l'equilibrio della reazione (1) è fermamente a favore dell'acido L-lattico e NAD⁺, è necessaria un'ulteriore reazione per "intrappolare" il piruvato prodotto. Ciò si ottiene mediante la conversione del piruvato in D-alanina e 2-ossoglutarato, con l'enzima D-glutammato-piruvato transaminasi (D-GPT) in presenza di grande eccesso di D-glutammato. (2)

(D-GPT)



La quantità di NADH formata nella reazione accoppiata sopra è stechiometrica con la quantità di acido L-lattico. È il NADH che è misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm.

Modalità di esecuzione

Nel primo passaggio i campioni sono stati diluiti 1:50 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	0,8 ml	0,75 ml
Campione	-	50 µl
Soluzione 1	0,25 ml	0,25 ml
Soluzione 2	50 µl	50 µl
Soluzione 3	10 µl	10 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 4*; ogni cuvetta è stata nuovamente agitata, capovolgendola delicatamente, e dopo un'attesa di 10 minuti si è passati alla lettura della seconda assorbanza (A2), sempre a 340 nm.

Calcoli

Una volta ottenute le 2 diverse assorbanze, per determinare in g/l la concentrazione di L-acido lattico, sono state applicate rispettivamente le due formule sotto riportate:

$$1. \Delta A1 = A2 - A1$$

$$2. \text{Concentrazione del L-acido lattico in g/l} =$$

$$[\Delta A1 - 0,001(\text{bianco})] \times 0,3204 \times 50 \text{ (fattore di diluizione)}$$

3.4.10 Determinazione dell'acido malico

La determinazione dell'acido lattico in g/l, nel vino spumante, è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico della ditta Megazyme.

Il kit contiene:

Flacone 1: Tampone (6 mL, pH 10,0) più L-glutammato e azide di sodio (0,02% p/v) come conservante.

Bottiglia 2: NAD⁺ più PVP.

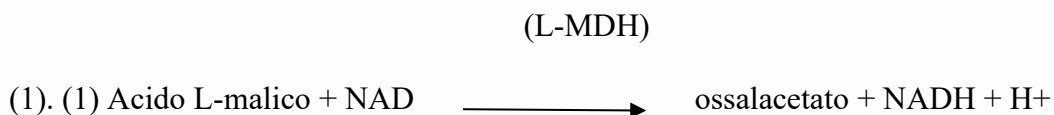
Flacone 3: Glutammato-ossalacetato transaminasi sospensione (1,25 ml).

Bottiglia 4: Sospensione di L-Malato deidrogenasi (1,25 ml).

Flacone 5: Soluzione standard di acido L-malico (5 mL, 0,15 mg/mL).

Principio

Il rilevamento dell'acido L-malico richiede due reazioni enzimatiche. Nella prima reazione catalizzata dalla L-malato deidrogenasi (L-MDH), l'acido L-malico viene ossidato a ossalacetato da nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD⁺)



Tuttavia, poiché l'equilibrio di reazione (1) risiede saldamente a favore dell'acido L-malico e del NAD⁺, è necessaria un'ulteriore reazione per "intrappolare" il prodotto NADH, e ciò

si ottiene mediante la conversione dell'ossalacetato in L-aspartato e 2-ossoglutarato, in presenza di un grande eccesso di L-glutammato, da glutammato-ossalacetato transaminasi (GOT)



La quantità di NADH formata nella reazione accoppiata di cui sopra è stechiometrica con la quantità di acido L-malico. È il NADH che viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 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	2,10 ml	2,00 ml
Campione	-	0,10 ml
Soluzione 1	0,10 ml	0,10 ml
Soluzione 2	0,10 ml	0,10 ml
Soluzione 3	0,02 ml	0,02 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, 0,02 ml della *soluzione 4*; ogni cuvetta è stata nuovamente agitata, capovolgendola delicatamente, e dopo un'attesa di 3 minuti si è passati alla lettura della seconda assorbanza (A2), sempre a 340 nm.

Calcoli

Una volta ottenute le 2 diverse assorbanze, per determinare in g/l la concentrazione di L-acido malico, sono state applicate rispettivamente le due formule sotto riportare:

1. $\Delta A1 = A2 - A1$

2. **Concentrazione del L-acido malico in g/l =**

$\Delta A1 * 0,4980$

3.5 Analisi sensoriale

Conclusa la fase di remuage, i vini spumanti prodotti in laboratorio con metodo tradizionale, sono stati sottoposti ad una valutazione sensoriale mediante degustazione. La prova è stata allestita sulla base della valutazione di 2 parametri: olfatto e gusto. Un gruppo di 8 assaggiatori, di cui 2 enologi e 6 tecnici del settore, sono stati chiamati a valutare i vini ed esprimere un giudizio su ciascuna categoria sensoriale utilizzando una scala da 1 a 9, dove 9 era il punteggio che quantitativamente rappresentava il giudizio migliore (massimo

gradimento), mentre 1 era il punteggio da attribuire in caso di scarso gradimento. I vini sono stati versati in bicchieri di vetro da 250 ml, precedentemente avvinati, ai quali era stato assegnato un codice di identificazione; successivamente sono stati presentati in ordine casuale a ciascun assaggiatore. I dati così elaborati sono stati usati per costruire dei grafici che fornissero indicazioni principalmente sulle differenze significative tra i vini spumanti in relazione a ciascun descrittore.

Capitolo quarto

RISULTATI

Al fine di valutare il contributo dei diversi ceppi di lievito, appartenenti ai generi *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Torulaspota* e *Brettanomyces*, nella elaborazione di vini spumanti, sul profilo analitico e aromatico, sono state condotte analisi su spumanti prodotti con metodo classico in laboratorio, e su spumanti prodotti in autoclavi da 50 litri in cantina.

4.1 Valutazione sui campioni di spumante prodotti con metodo classico in laboratorio

4.1.1 Cinetica di fermentazione

I valori di pressione, espressi in bar, sono stati presi dalla lettura degli afrometri durante tutto il periodo della rifermentazione (Figura 1).

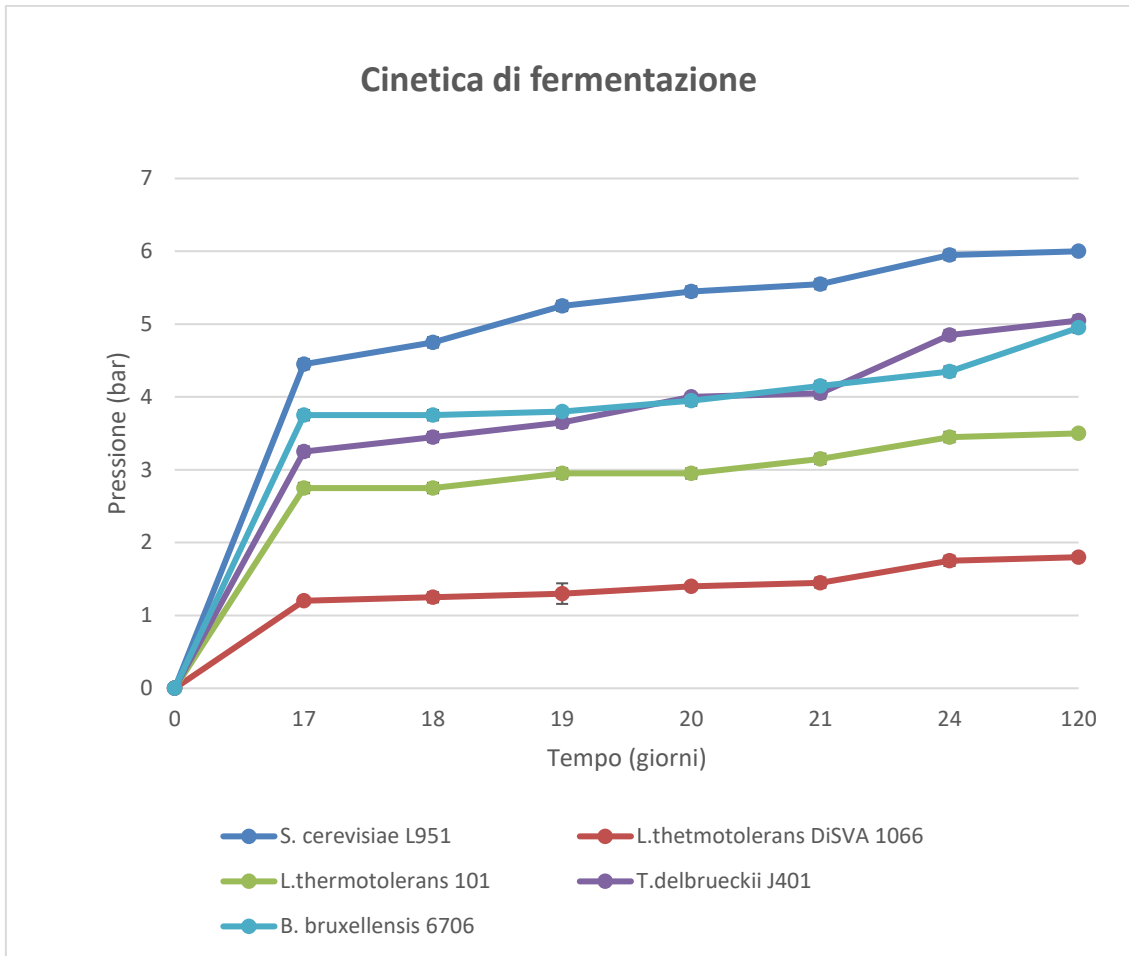


Figura 1: Cinetica di fermentazione di ogni ceppo utilizzato per la produzione di spumante con metodo tradizionale.

Tutti i lieviti, ad eccezione di *L. thermotolerans* DiSVA 1066 che mostra un andamento fermentativo più lento dall'inizio della fermentazione fino alla fine, manifestano un consistente aumento di pressione durante i primi 17 giorni. *S. cerevisiae* L951 mostra un andamento fermentativo maggiore rispetto agli altri lieviti testati, raggiungendo il massimo della pressione di 6 bar. Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* J401 e *B. bruxellensis* mostrano un andamento fermentativo paragonabile tra loro, evidenziando una

pressione finale di 5 bar. Per quanto riguarda *L. thermotolerans* DiSVA 1066, risulta essere il lievito meno performante in termini di velocità di fermentazione e di quantità di CO₂ prodotta, raggiungendo il minor valore di pressione (circa 2 bar).

4.1.2 Evoluzione della popolazione microbica

I campioni sono stati analizzati ai tempi prestabiliti di rifermentazione 0, 17, 24 e 120 giorni. La conta al tempo t₀ indica la quantità di cellule di lievito presente nella bottiglia nel momento dell'inoculo. I dati ottenuti sono stati riportati nella Figura 2.

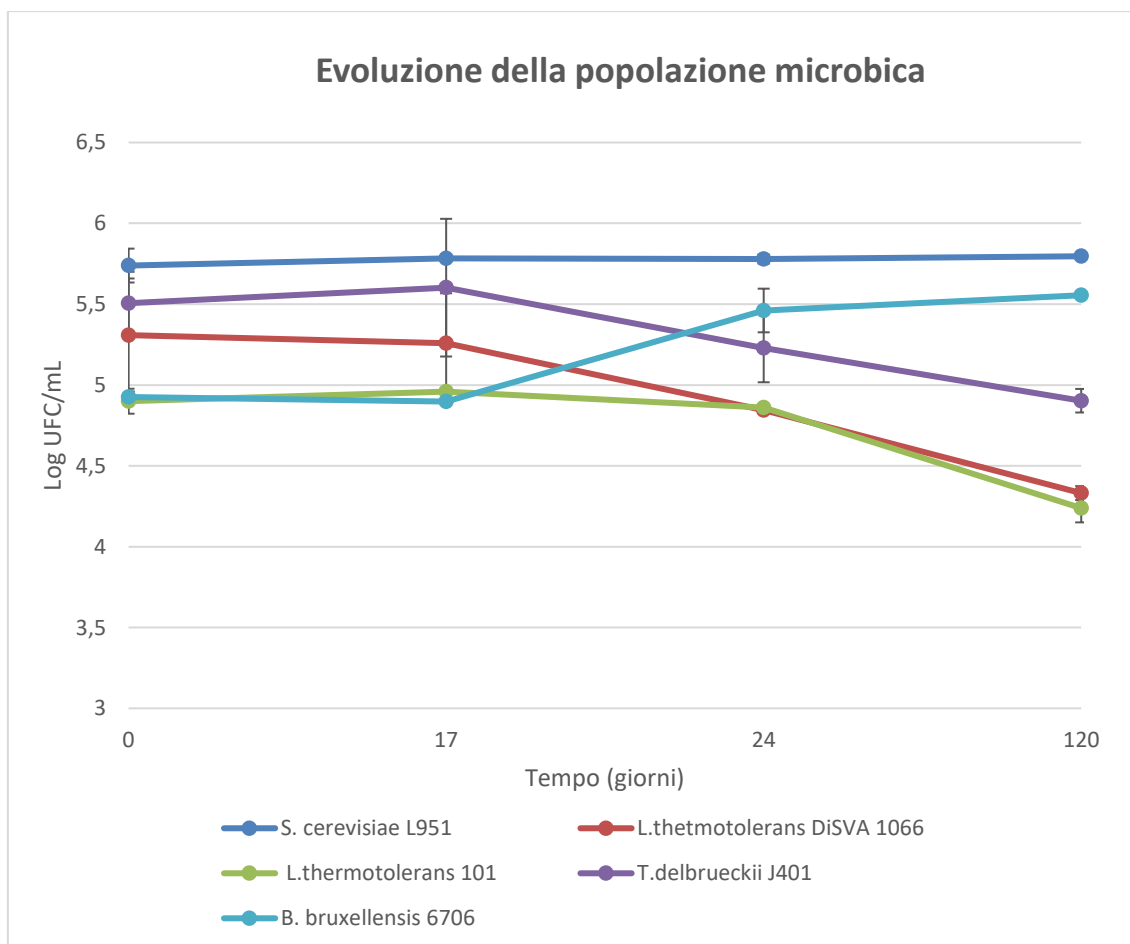


Figura 2: Evoluzione della popolazione microbica di ogni ceppo utilizzato per la produzione di spumante con metodo tradizionale.

Da come è possibile osservare graficamente, i ceppi *L. thermotolerans* DiSVA 1066, *T. delbrueckii* J401 e *L. thermotolerans* 101 effettuano un decremento di biomassa nell'intervallo di tempo t17 e t120; in particolare *L. thermotolerans* DiSVA 1066 e *T. delbrueckii* J401 mostrano un tasso di decrescita maggiore rispetto a *L. thermotolerans* 101 nell'intervallo di tempo tra t17 e t24. *B. bruxellensis* 6706 presenta invece una fase di aumento di biomassa nell'intervallo tra il tempo t17 e t120, ma si osserva una velocità di crescita maggiore nell'intervallo di tempo tra t17 e t24. Per quanto riguarda *S. cerevisiae* L951 invece, ha mostrato una evoluzione della popolazione microbica costante in tutto il tempo di rifermentazione.

4.1.3 Analisi chimiche

4.1.3.1 Determinazione del pH

Di seguito nella Figura 3 sono state riportate le misurazioni del pH, per ognuno dei ceppi di lievito in esame.

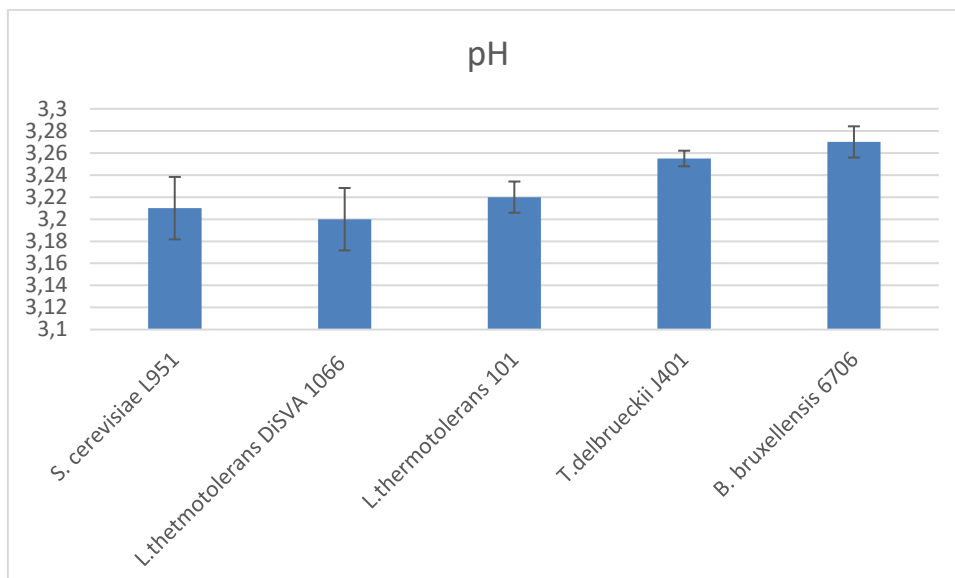


Figura 3: Valori di pH dei campioni di spumante con metodo tradizionale, determinato per ciascun ceppo preso in esame.

Il campione di spumante ottenuto dalla rifermentazione con *B. bruxellensis* 6706 mostra il livello di pH maggiore (3,27). Tuttavia, non ci sono grandi differenze per quanto riguarda il valore di pH tra i vari campioni di spumante relativi alla rifermentazione di ciascun ceppo; infatti, tutti i campioni mostrano un pH compreso tra 3,22 e 3,27.

4.1.3.2 Determinazione degli zuccheri residui

La determinazione degli zuccheri residui a fine della rifermentazione è stata effettuata al fine di ottenere una stima del consumo degli zuccheri totali da parte di tutti i ceppi di lievito in esame.

Di seguito il grafico (Figura 4), raffigurante il consumo del substrato preferenziale per ogni ceppo:

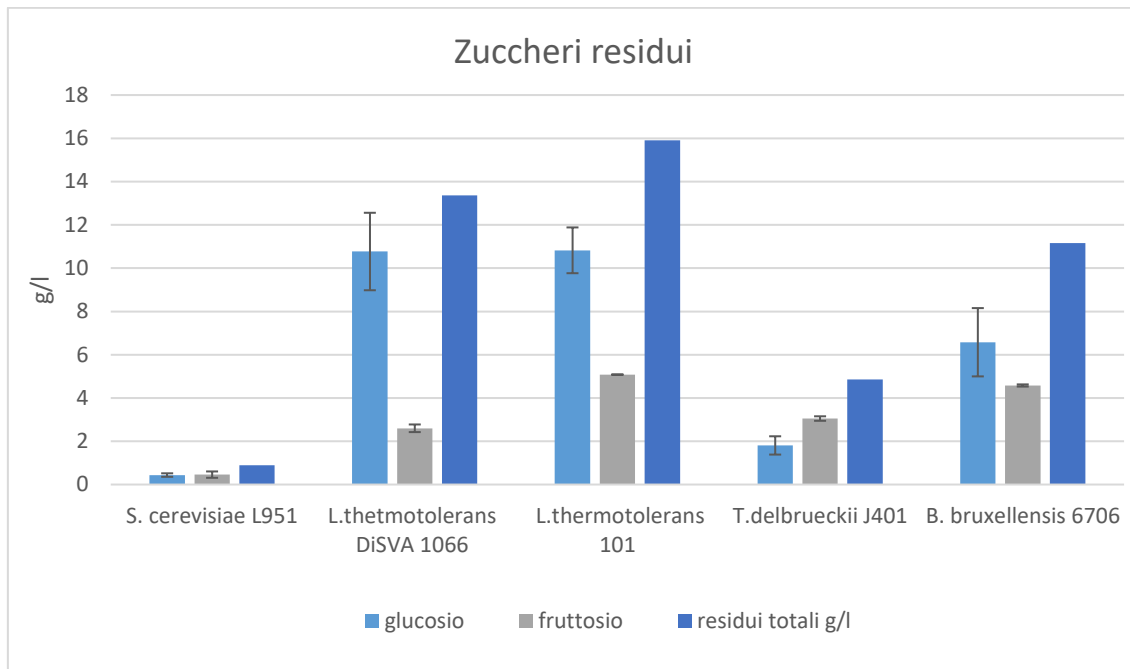


Figura 4: Concentrazione degli zuccheri residui dei campioni di spumante con metodo tradizionale, determinata per ciascun ceppo preso in esame.

Dal grafico emerge che *S. cerevisiae* L951 mostra la concentrazione di zuccheri residui più bassa tra tutti i lieviti in esame (0,90 g/l). *S. cerevisiae* L951 mostra, inoltre, un consumo equivalente di entrambi gli zuccheri (0,44 g/l di glucosio e 0,46 g/l di fruttosio residui). Il fruttosio, fatta eccezione per il ceppo *T. delbrueckii* J401, sembra invece il substrato nutritivo preferenziale dei non-*Saccharomyces*. Infatti, il campione di spumante prodotto con il ceppo *L. thermotolerans* DiSVA 1066 presenta una quantità di glucosio residuo pari

a 10,77 g/l e 2,66 g/l di fruttosio. Il campione di spumante prodotto con il ceppo *L. thermotolerans* 101, invece, risulta avere una concentrazione residuale di glucosio pari a 10,83 g/l e 5,08 g/l di fruttosio. Il campione di spumante prodotto con *B. bruxellensis* 6706 mostra una quantità residua di glucosio di 6,58 g/l e 4,58 g/l di fruttosio. Il ceppo *T. delbrueckii* J401 invece risulta avere come substrato preferenziale il glucosio, tanto che il campione di spumante inoculato con questo ceppo risulta avere una concentrazione residuale di glucosio pari a 1,81 g/l e pari a 3,05 g/l di fruttosio.

4.1.3.3 Determinazione dell'acido lattico

Di seguito il grafico a colonne (Figura 5), riportante le concentrazioni di acido lattico, espresse in g/l, per ognuno dei ceppi in esame.

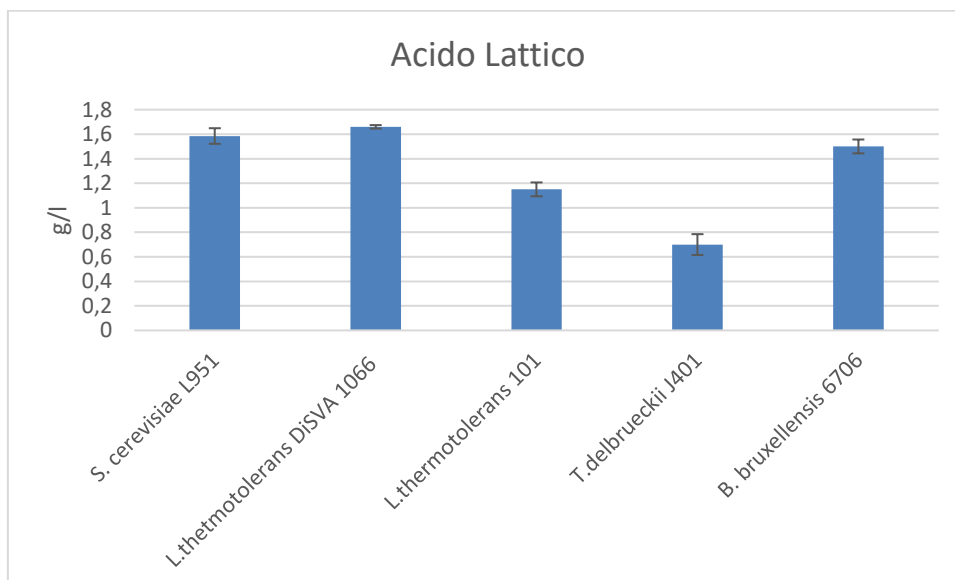


Figura 5: Concentrazione di acido lattico dei campioni di spumante con metodo tradizionale, determinata per ciascun ceppo preso in esame.

I ceppi *S. cerevisiae* L951 e *L. thermotolerans* DiSVA 1066 e *B. bruxellensis* 6706 hanno prodotto, da come si può evincere dal grafico, le maggiori quantità di acido lattico, presentando a livello dei campioni di spumante concentrazioni rispettivamente di 1,66 g/l, 1,59 g/l e 1,5 g/l. *L. thermotolerans* 101 invece mostra una produzione pari a 1,15 g/l. Il ceppo *T. delbrueckii* J401 è quello che rivela la minore quantità di acido lattico, ossia 0,7 g/l.

4.1.3.4 Principali prodotti secondari di fermentazione

I dati relativi alla produzione dei principali prodotti secondari sono riportati in Tabella 1.

Nello specifico si osserva che il ceppo *S. cerevisiae* L951 presenta una concentrazione di acetaldeide significativamente più bassa rispetto a tutti i lieviti testati (3,68 mg/l). Nel campione di spumante realizzato con *B. bruxellensis* 6706 si riscontra una produzione di acetaldeide significativamente più alta rispetto agli altri ceppi (15,58 mg/l). Tutti gli altri lieviti, invece, presentano un contenuto intermedio di acetaldeide.

Il ceppo che ha prodotto una concentrazione significativamente maggiore di etilacetato rispetto agli altri lieviti è *T. delbrueckii* J401 (19,65 mg/l), mentre *S. cerevisiae* L951 è quello che ne ha prodotto la minor quantità (9,48 mg/l). L'etilacetato, come l'acetaldeide, se presente in quantità oltre il limite di 175 mg/l, ha un effetto negativo (responsabile

dell'odore di vernice), mentre in basse quantità conferisce un aroma fruttato di banana e pera.

Confrontando con gli altri ceppi, *S. cerevisiae* L951 e *B. bruxellensis* 6706 hanno prodotto una quantità di amilicoattivo significativamente maggiore, corrispondente rispettivamente a 9,80 mg/l e 9,19 mg/l. *T. delbrueckii* J401 invece registra la minor produzione di amilicoattivo in assoluto, corrispondente a una concentrazione di 3,29 mg/l. L'amilicoattivo, presente a basse concentrazioni, può conferire un gradevole odore di marzapane.

L'alcol isoamilico, responsabile anch'esso, a basse concentrazioni, dell'odore di marzapane, è il prodotto secondario che è stato prodotto in concentrazione maggiore rispetto agli altri composti, da parte di tutti i lieviti. *T. delbrueckii* J401 in particolare mostra una produzione particolarmente elevata, corrispondente a 87,88 mg/l, seguito da *L. thermotolerans* 101 (77,47 mg/l) e *B. bruxellensis* 6706 (70,23 mg/l). *L. thermotolerans* DiSVA 1066 e *T. delbrueckii* J401 sono invece i ceppi che hanno prodotto una quantità significativamente minore di alcol isoamilico, presentando una concentrazione rispettivamente di 42,71 mg/l e 34,38 mg/l.

Ad alte concentrazioni, l'amilicoattivo e l'alcol isoamilico sono responsabili dell'odore sgradevole di vernice.

	S. cerevisiae L951	L. thermotolerans DiSVA 1066	L. thermotolerans 101	T. delbrueckii J401	B. bruxellensis 6706
acetaldeide (mg/l)	3,68±1,56 ^c	8,83±0,29 ^{bc}	11,33±2,38 ^{ab}	7,47±1,66 ^{bc}	15,58±1,00 ^a
etilacetato (mg/l)	9,48±0,65 ^c	13,91±1,55 ^{bc}	16,69±0,67 ^{ab}	19,65±2,01 ^a	13,17±1,47 ^{bc}
propanolo (mg/l)	33,27±0,76 ^a	28,59±1,59 ^a	37,18±1,47 ^a	29,71±1,73 ^a	37,24±1,18 ^a
isobutanolo (mg/l)	8,84±0,89 ^a	6,77±0,94 ^a	6,89±0,68 ^a	6,96±0,58 ^a	8,41±1,56 ^a
amilico attivo (mg/l)	9,80±0,25 ^a	5,76±0,15 ^c	6,33±0,49 ^b	3,29±1,31 ^d	9,19±0,97 ^a
isoamilico (mg/l)	87,88±1,38 ^a	42,71±1,67 ^c	77,47±1,40 ^{ab}	34,38±1,45 ^c	70,23±2,23 ^b

Tabella 1: Concentrazioni di prodotti secondari presenti nei campioni di spumante con metodo tradizionale determinate per ogni ceppo. I dati sono media ± DS dei risultati sperimentali di due prove. I valori che mostrano differenti lettere (a, b, c) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%).

4.1.3.5 Valutazione della produzione dei composti volatili

I dati relativi alle concentrazioni dei composti volatili per ciascuno dei campioni di vino spumante sono riportati in Tabella 2.

Si può notare che *L. thermotolerans* 101 (2,04 mg/l), insieme a *L. thermotolerans* DiSVA 1066 (2,03 mg/l) e *S. cerevisiae* L951 (1,82mg/l) producono una quantità significativamente maggiore di etilbutirrato rispetto a *T. delbrueckii* J401 (0,81 mg/l) e *B. bruxellensis* 6706 (0,59 mg/l), il quale risulta il minore produttore di etilbutirrato in assoluto. L'etilbutirrato è il composto volatile responsabile dell'aroma di ananas.

Il campione di spumante prodotto dalla fermentazione del ceppo *L. thermotolerans* DiSVA 1066 è quello in cui viene rilevata una quantità di acetato di isoamile (1,92 mg/l), conferente odore di pera e banana, significativamente maggiore rispetto a quanto è stato prodotto dagli altri lieviti. Infatti, *L. thermotolerans* 101 e *B. bruxellensis* 6706 hanno prodotto rispettivamente 1,36 mg/l e 1,41 mg/l di acetato di isoamile, seguiti da *T. delbrueckii* J101 (0,63mg/l). *B. bruxellensis* 6706 mostra una concentrazione di acetato di isoamile significativamente minore rispetto agli altri ceppi.

Per quanto riguarda l'etilesanoato, *B. bruxellensis* 6706 e *T. delbrueckii* J101 risultano i maggior produttori, rivelando una concentrazione rispettivamente di 2,04 mg/l e 1,77 mg/l, ossia significativamente più alta in confronto agli altri lieviti. *S. cerevisiae* L951 invece, rivela la concentrazione significativamente più bassa in assoluto di etilesanoato (0,25 mg/l). L'etilesanoato è responsabile dell'aroma di mela, banana e violetta.

A confronto con gli altri ceppi, il campione di spumante realizzato con il ceppo *L. thermotolerans* 101 presenta una quantità di feniletilacetato, che conferisce odore di rosa e di miele, significativamente maggiore (0,66 mg/l), al contrario *S. cerevisiae* L951 mostra una concentrazione significativamente minore (0,1 mg/l).

L. thermotolerans DiSVA 1066 e *L. thermotolerans* 101 producono una concentrazione significativamente maggiore di β -feniletanolo rispetto agli altri lieviti, presentando una concentrazione nei campioni di spumante rispettivamente di 8,29 mg/l e 8,21 mg/l. *B. bruxellensis* 6706 produce una concentrazione di β -feniletanolo di 7,21 mg/l, seguito da *S. cerevisiae* L951 che ne produce 5,07 mg/l. *T. delbrueckii* J401, invece, risulta il lievito che ne ha prodotto una quantità significativamente minore rispetto agli altri lieviti (4,69 mg/l). Il β -feniletanolo conferisce un gradevole odore di rosa.

Per quanto riguarda gli altri composti volatili, non si riscontrano differenze significative.

	S. cerevisiae L951	L. thermotolerans DiSVA 1066	L. thermotolerans 101	T. delbrueckii J401	B. bruxellensis 6706
Etilbutirrato (mg/l)	1,82±0,32 ^a	2,03±0,48 ^a	2,04±0,24 ^a	0,81±0,10 ^b	0,59±0,26 ^b
Acetato di isoamile (mg/l)	1,36±0,38 ^{ab}	1,92±0,27 ^a	1,41±0,05 ^{ab}	0,63±0,02 ^b	0,33±0,47 ^c
Etilacetato (mg/l)	0,25±0,01 ^c	0,38±0,19 ^{bc}	0,87±0,26 ^b	1,77±0,33 ^a	2,04±0,16 ^a
Esanolo (mg/l)	0,01±0,01 ^a	0,03±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a	0,02±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a
Linalolo (mg/l)	0,00±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,05±0,21 ^a	0,03±0,04 ^a
Dietilsuccinato (mg/l)	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a
acido butirrico (mg/l)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Fenilacetato (mg/l)	0,1±0,02 ^b	0,33±0,05 ^{ab}	0,66±0,25 ^a	0,27±0,14 ^{ab}	0,38±0,15 ^{ab}
Nerolo (mg/l)	0,00±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a
β-feniletanolo (mg/l)	5,07±0,04 ^c	8,29±0,02 ^a	8,21±0,05 ^a	4,69±0,52 ^d	7,21±0,06 ^b
β-damascenone (mg/l)	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a	0,13±0,10 ^a	0,13±0,17 ^a

Tabella 2: Concentrazioni composti volatili presenti nei campioni di spumante con metodo tradizionale determinate per ogni ceppo. I dati sono media \pm DS dei risultati sperimentali di due prove. I valori che mostrano differenti lettere (a, b, c) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%).

4.1.4 Analisi sensoriale

I vini spumanti sono stati sottoposti a valutazione sensoriale mediante degustazione, in particolare focalizzando l'analisi sulla valutazione olfattiva e gustativa. I vini spumanti sono stati valutati su ciascun parametro, sulla base di una scala da 1 a 9, dove 9 è il punteggio che quantitativamente rappresenta il giudizio di massima percezione, mentre 1 è, al contrario, il punteggio attribuito in caso di scarsa percezione. Le Figure 5 e 6 riportano i risultati rispettivamente della valutazione olfattiva e gustativa.

Per quanto riguarda la valutazione olfattiva, lo spumante prodotto con *S. cerevisiae* L951 si è contraddistinto per l'odore di agrumato e miele. Lo spumante prodotto con *L. thermotolerans* DiSVA 1066 si caratterizza per il buon punteggio ottenuto per la percezione di parametri olfattivi quali l'odore di erbe aromatiche e l'erba. *L. thermotolerans* 101 e *T. delbrueckii* J401 si differenziano entrambi per la percezione

dell'odore di frutta matura. *B. bruxellensis* 6706 ha ottenuto il punteggio maggiore per quanto riguarda i parametri vegetale cotto e fenolico.

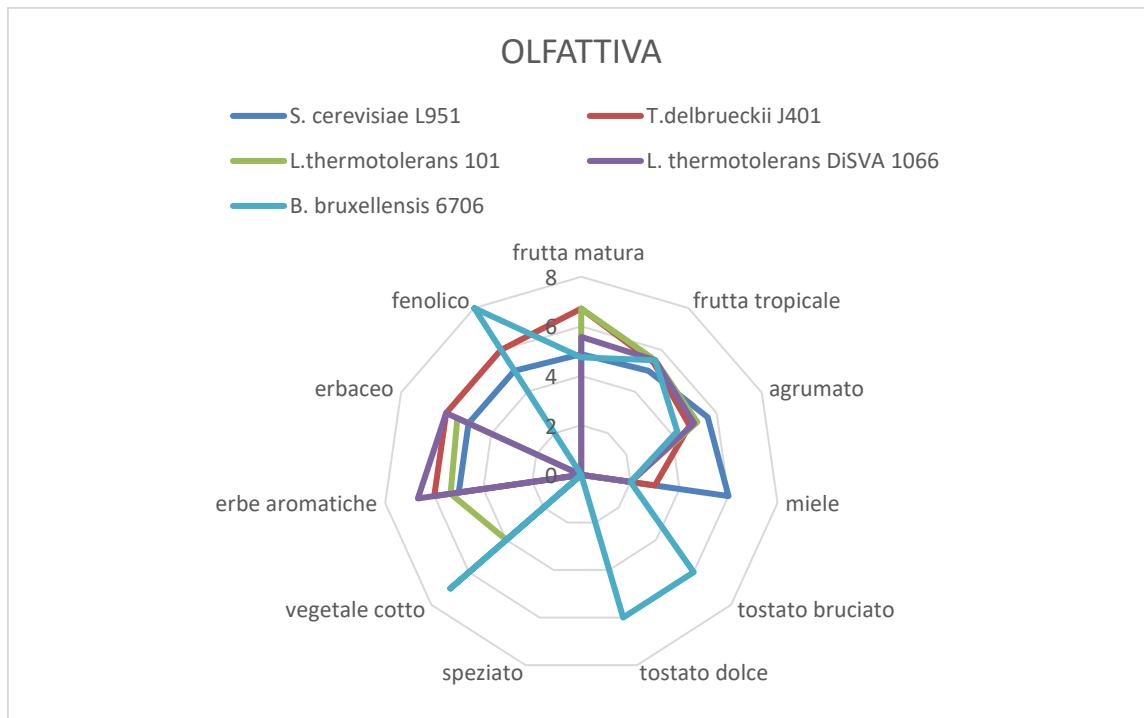


Figura 5: rappresentazione grafica dei risultati relativi alla valutazione olfattiva.

Riguardo la valutazione gustativa (Figura 6), lo spumante prodotto con *S. cerevisiae* L951 ha ottenuto buoni punteggi nei parametri gustativi riguardanti l'acidità e l'equilibrio. Il campione di spumante prodotto con *L. thermotolerans* DiSVA 1066 si caratterizza per la morbidezza. Morbidezza ed equilibrio distinguono invece lo spumante prodotto con *L. thermotolerans* 101 da quello prodotto con altri lieviti, che nei parametri appena citati ha ottenuto il maggior punteggio. Lo spumante prodotto con *T. delbrueckii* J401 non evidenzia elevati punteggi sui parametri gustativi rispetto agli altri lieviti; tuttavia, risulta

una percezione maggiore del parametro equilibrio, rispetto ad altri parametri. Stesso discorso dello spumante prodotto con *T. delbrueckii* J401, può essere fatto per quello prodotto con *B. bruxellensis* 6706, che però risulta avere un maggior punteggio nei parametri acidità e alcolicità. Inoltre, lo spumante prodotto con *B. bruxellensis* 6706 rileva il minor punteggio di tannicità, mentre negli spumanti prodotti con altri lieviti la tannicità è un parametro percepito.

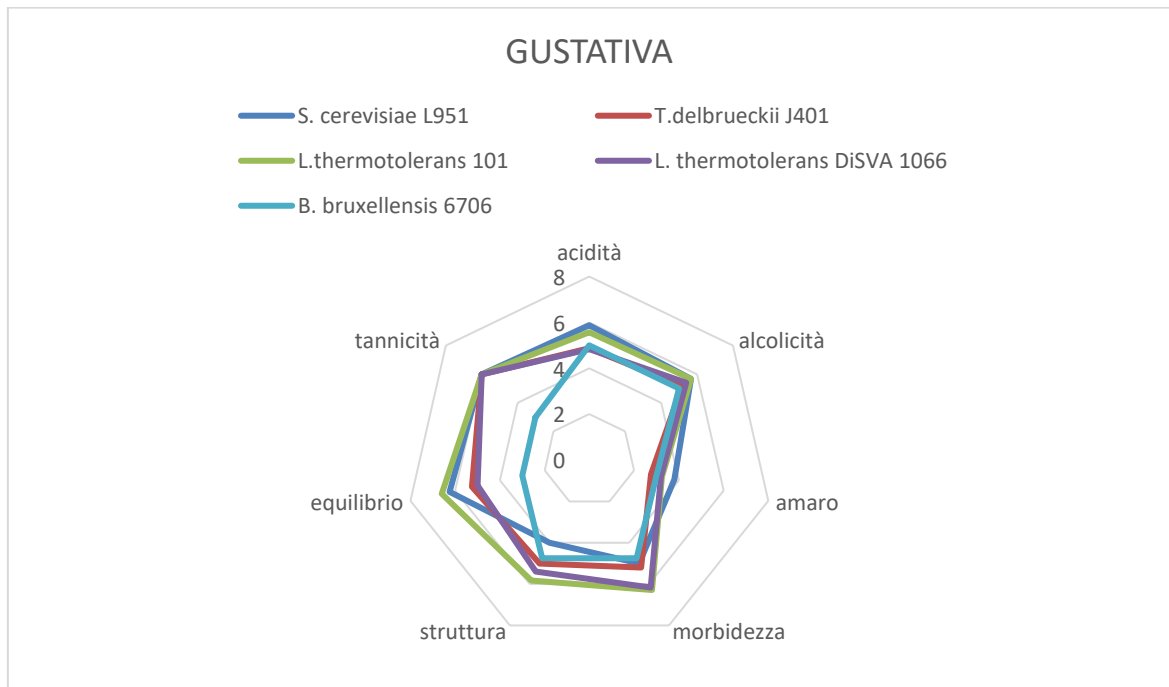


Figura 6: rappresentazione grafica dei risultati relativi alla valutazione gustativa.

4.2 Valutazioni sui campioni di spumante prodotti con metodo industriale in azienda

Due ceppi utilizzati nella prova di laboratorio, *L. thermotolerans* 101 e *T. delbrueckii* J401 sono stati utilizzati per una prova di rifermentazione in autoclave su volumi di 50 L.

4.2.1 Cinetica di fermentazione

I valori di pressione, espressi in bar, sono stati presi durante tutto il periodo della rifermentazione (Figura 7).

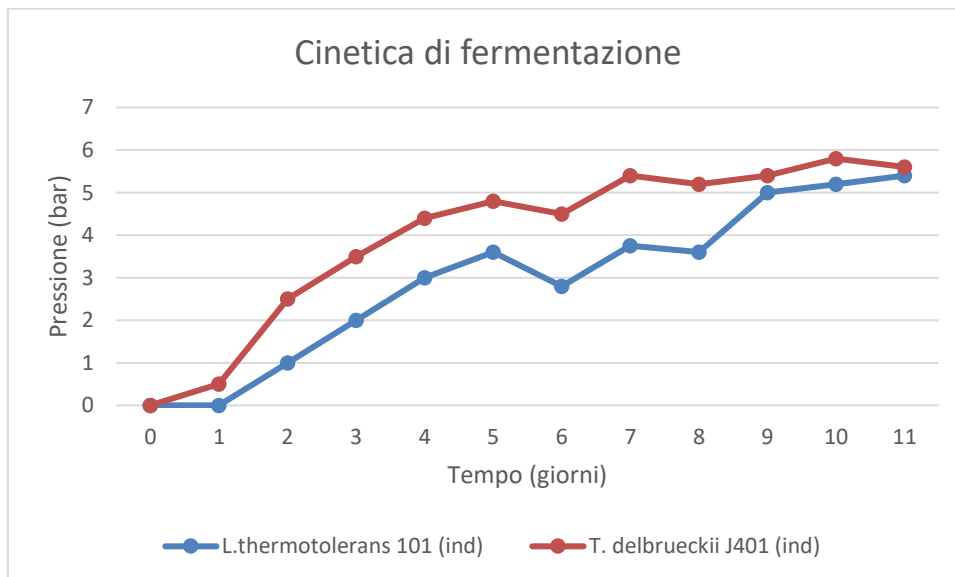


Figura 7: Cinetica di fermentazione secondaria di ogni ceppo utilizzato per la produzione di spumante con metodo industriale.

Sia *L. thermotolerans* 101 che *T. delbrueckii* J401 effettuano una fermentazione in autoclave performante. Infatti, come evidenzia il grafico della Figura 7, *T. delbrueckii* J401 raggiunge un valore di pressione massimo di 5,6 bar, mentre *L. thermotolerans* 101 raggiunge un valore di pressione massimo di 5,4 bar. *T. delbrueckii* J401 inizia la fermentazione già dal primo giorno, sebbene con un tasso di fermentazione relativamente basso, per poi proseguire con

una velocità di fermentazione decisamente più elevata tra il primo e il secondo giorno. Si osserva un decremento della fermentazione tra il t5 e il t6 per poi verificarsi il secondo aumento consistente della velocità di fermentazione tra il t6 e il t7. Un secondo decremento si verifica tra il t7 e il t8, a cui segue un ulteriore incremento della velocità di fermentazione tra il t8 e il t10, dove viene raggiunto il picco di produzione della CO₂. *L. thermotolerans* 101 tra il t2 e il t5 mostra un aumento lineare della produzione di CO₂. Tra il t5 e il t6, invece, si verifica un decremento della fermentazione. Tra il t6 e il t7 avviene il secondo aumento del tasso fermentativo, a cui segue un decremento tra il t7 e il t8, per poi verificarsi un ulteriore aumento tra il t8 e il t9, raggiungendo il picco del livello di pressione al t11.

4.2.2 Alcool

La quantità di etanolo del vino base e del vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave è espressa come Volume % ed è rappresentata in Figura 8.

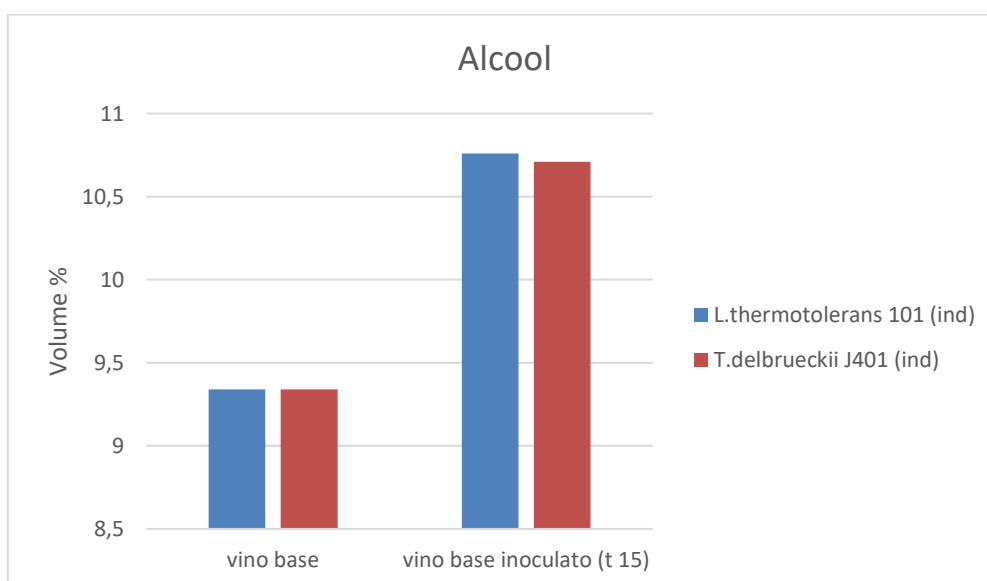


Figura 8: concentrazione di alcool etilico nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Rispetto al vino base, che presenta una concentrazione di etanolo pari a 9,34 Vol %, dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave la concentrazione di alcool etilico aumenta fino a 10,76 Vol % nel vino inoculato con *L. thermotolerans* 101 e fino a 10,71 Vol % nel vino inoculato con *T. delbrueckii* J401.

4.2.3 Acidità

Sono state analizzate le acidità totale (Figura 9) e volatile (Figura 10) del vino base e del vino inoculato dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

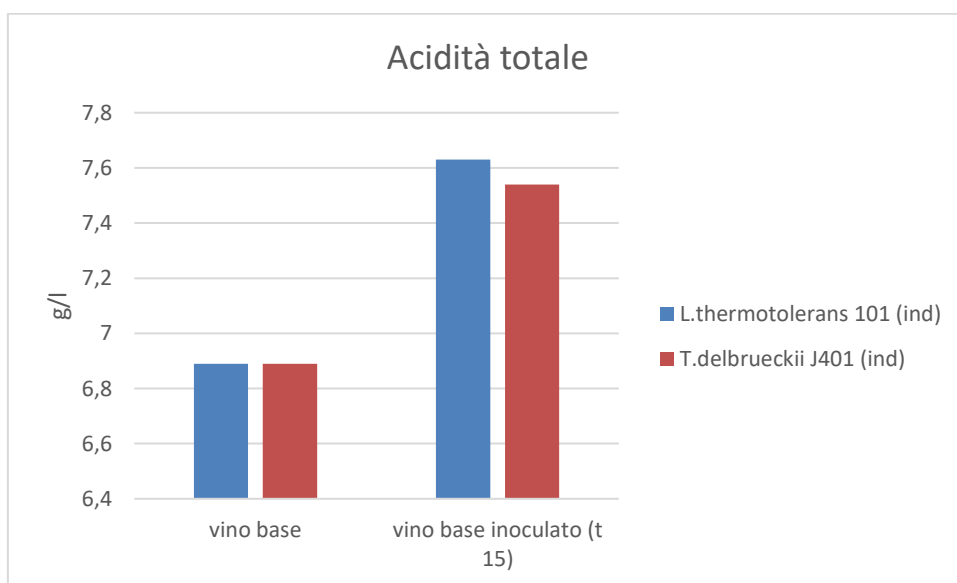


Figura 9: valori di acidità totale riscontrati nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Dal grafico in Figura 9 emerge che il valore di acidità totale, intesa come grammi di acido tartarico per litro di vino, cresce dal vino base (6,89 g/l) fino al vino inoculato dopo 15 giorni rifermentazione, sia per quanto riguarda il vino inoculato con *T. delbrueckii* J401 (7,54 g/l), sia per quanto riguarda il vino inoculato con *L. thermotolerans* 101 (7,63 g/l).

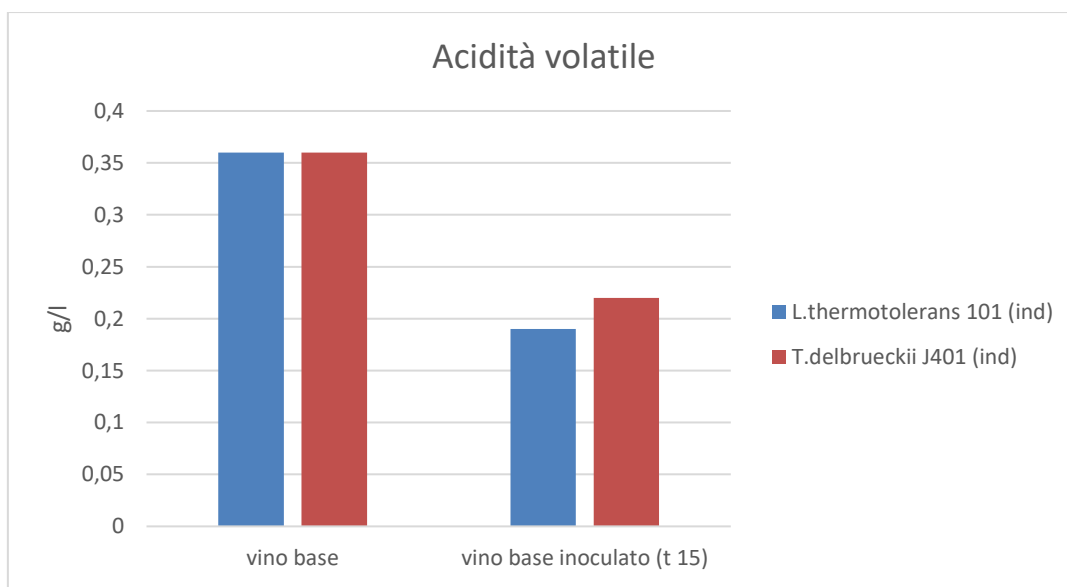


Figura 10: valori di acidità volatile riscontrati nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Per quanto riguarda l'acidità volatile, intesa come grammi di acido acetico per litro di vino, si osserva un decremento di concentrazione dal vino base (0,36 g/l) fino al vino inoculato dopo 15 giorni rifermentazione, sia per il vino inoculato con *L. thermotolerans* 101 (0,19 g/l), sia per il vino inoculato con *T. delbrueckii* J401 (0,22 g/l).

4.2.4 pH

La Figura 11 mostra i valori di pH misurati a livello del vino base e del vino inoculato dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

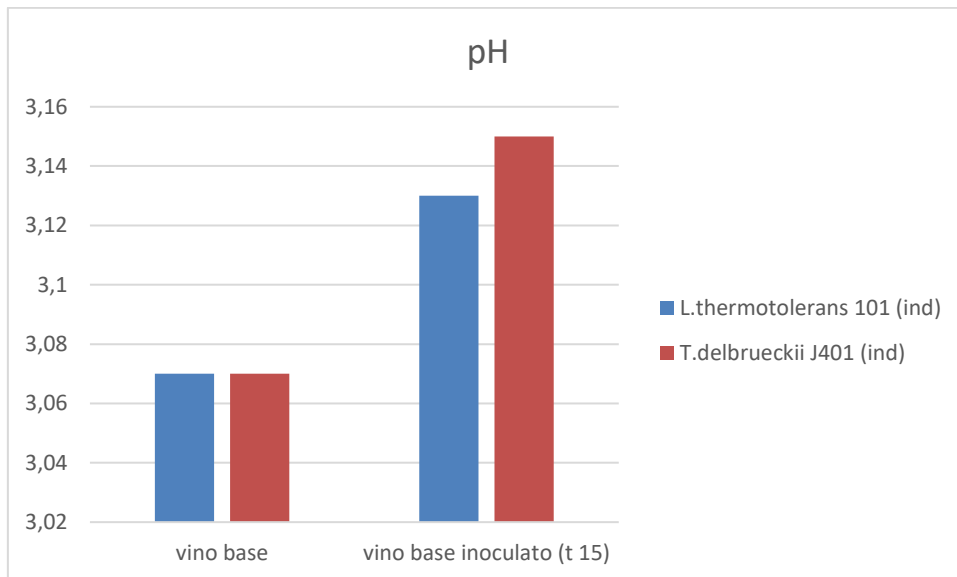


Figura 11: valori di pH del vino base e del vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Si assiste a un aumento del valore relativo al pH rispetto al vino base (3,07), sia per quanto riguarda il vino al momento dell'inoculo con *L. thermotolerans* 101 (3,08) e dopo 15 giorni di rifermentazione (3,13), sia per il vino inoculato con *T. delbrueckii* J401 che al momento dell'inoculo presenta un pH di 3,12 e dopo rifermentazione mostra un pH di 3,15.

4.2.5 Zuccheri residui

Dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave, si osserva un consumo differenziale della quantità di substrato glucidico presente nel vino base (34,15 g/l). Infatti, lo spumante

prodotto dall'inoculo con *L. thermotolerans* 101 risulta avere una concentrazione residuale di zuccheri pari a 13,61 g/l, mentre quello prodotto dall'inoculo con *T. delbrueckii* J401 risulta avere una concentrazione di 11,48 g/l.

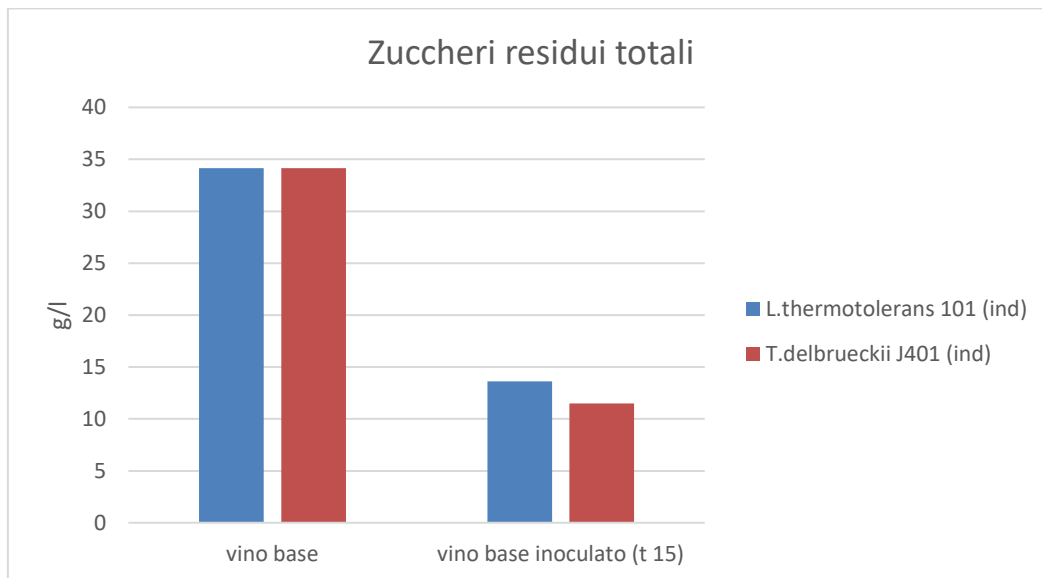


Figura 12: zuccheri residui totali presenti nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

4.2.6 Anidride solforosa

È stata misurata la concentrazione di anidride solforosa totale (Figura 13) e libera (Figura 14) del vino base e del vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

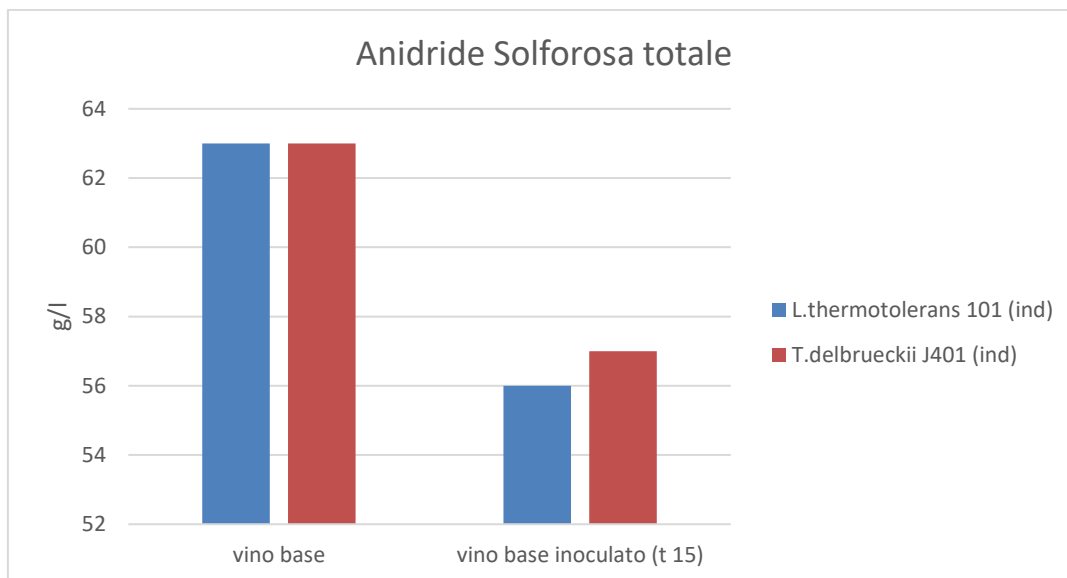


Figura 13: livelli di anidride solforosa totale presenti nel vino base, nel vino base al momento dell'inoculo e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Dalla Figura 13 emerge un decremento di anidride solforosa totale, rispetto alla quantità presente nel vino base (63 g/l). Riguardo il vino inoculato con *T. delbrueckii* J401, dopo 15 giorni di rifermentazione la concentrazione scende a 57 g/l, mentre nel vino inoculato con *L. thermotolerans* 101 la concentrazione risulta di 56 g/l.

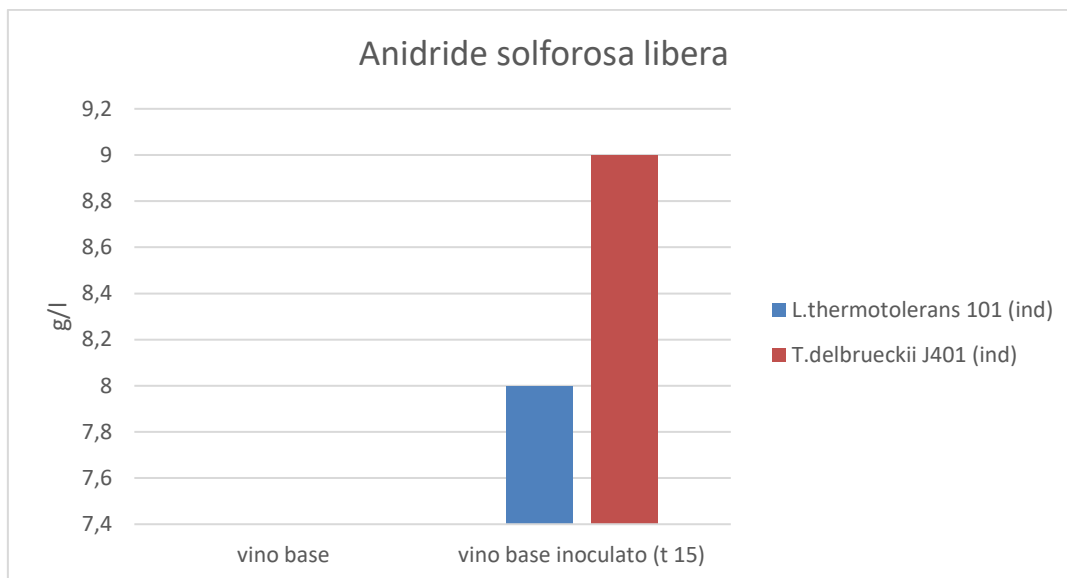


Figura 14: livelli di anidride solforosa libera presenti nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Dopo 15 giorni di rifermentazione si assiste a un incremento sostanziale della quantità di anidride solforosa libera. Il vino inoculato con *L. thermotolerans* 101 risulta avere un livello di solforosa libera pari a 8 g/l, mentre il vino inoculato con *T. delbrueckii* J401 risulta avere una concentrazione di 9 g/l.

4.2.7 Acido malico

Come si evince dalla Figura 15, la concentrazione di acido malico cresce linearmente nel vino inoculato rispetto alla quantità presente nel vino base (0,78 g/l). Infatti, dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave, il vino inoculato con *L. themotolerans* 101 presenta un

incremento maggiore rispetto a quello inoculato con *T. delbrueckii* J401, presentando rispettivamente un livello di acido malico pari a 2,49 g/l e 2,45 g/l.

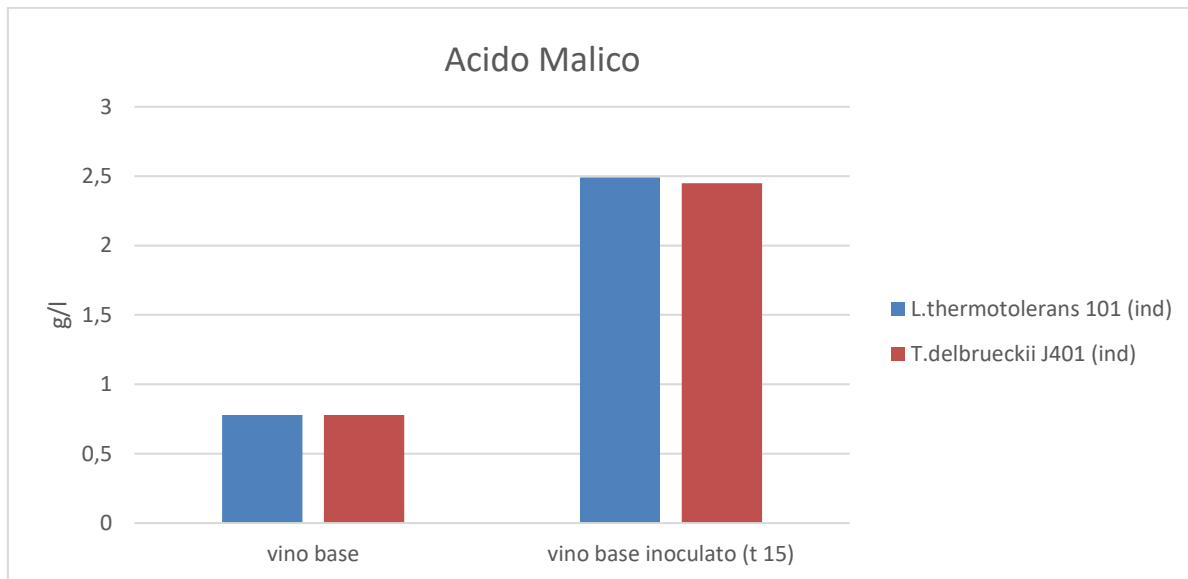


Figura 15: quantità di acido malico presente nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

4.2.8 Acido lattico

La Figura 16 mostra i livelli di acido lattico misurati a livello del vino base e del vino inoculato dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

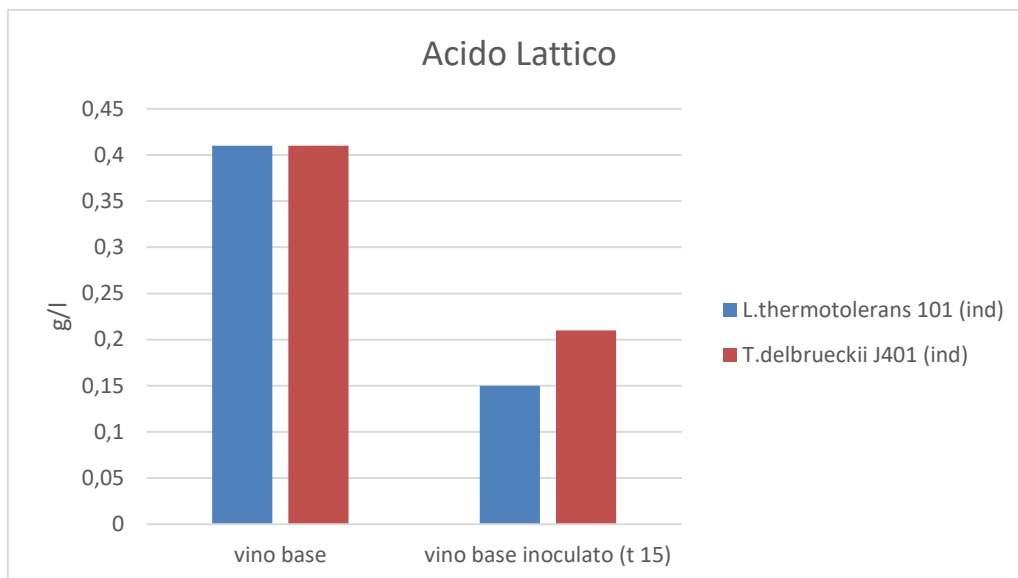


Figura 16: quantità di acido lattico presente nel vino base e nel vino dopo 15 giorni di rifermentazione in autoclave.

Si può notare, dal grafico nella Figura 16, un decremento della concentrazione di acido lattico dopo 15 giorni di rifermentazione, rispetto alla concentrazione riscontrata nel vino base (0,41 g/l). Dopo rifermentazione in autoclave, infatti, lo spumante prodotto con *L. thermotolerans* 101 presenta una concentrazione di 0,15 g/l, mentre lo spumante prodotto con *T. delbrueckii* J401 risulta avere una concentrazione di 0,21 g/l.

4.2.9 Principali prodotti secondari di fermentazione

L'analisi statistica dei dati relativi alla produzione di prodotti secondari relativa agli spumanti prodotti con metodo industriale è riportata in Tabella 3.

	<i>L.thermotolerans</i> 101(industriale)	<i>T.delbrueckii</i> J401(industriale)
acetaldeide (mg/l)	29,29±0,92 ^a	20,21±0,30 ^b
etilacetato (mg/l)	4,02±2,71 ^b	24,16±1,82 ^a
propanolo (mg/l)	41,90±1,46 ^a	30,05±2,40 ^b
isobutanolo (mg/l)	10,28±0,24 ^a	11,65±0,63 ^a
Amilico attivo (mg/l)	10,35±0,05 ^a	7,47±0,39 ^b
isoamilico (mg/l)	87,59±2,38 ^a	46,66±5,37 ^b

Tabella 3: Concentrazioni di prodotti secondari presenti nei campioni di spumante con metodo tradizionale determinate per ogni ceppo. I dati sono media \pm DS dei risultati sperimentali di due prove. I valori che mostrano differenti lettere (a, b, c) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%).

Dalla Tabella 3 è possibile notare come, per quanto riguarda la produzione industriale, *L. thermotolerans* 101 incrementi significativamente la concentrazione di quasi tutti i prodotti secondari rispetto a *T. delbrueckii* J401. Le uniche eccezioni riguardano l'etilacetato, che risulta essere presente in concentrazione significativamente maggiore nel campione di spumante prodotto con *T. delbrueckii* J401, e per l'isobutanolo per il quale non si osservano differenze significative.

4.2.10 Valutazione della produzione dei composti volatili

L'analisi statistica dei dati relativi alla produzione di prodotti seconda relativa agli spumanti prodotti con metodo industriale è riportata in Tabella 4.

	<i>L.thermotolerans</i> 101 (industriale)	<i>T. delbrueckii</i> J401 (industriale)
etilbutirrato (mg/l)	0,67±0,02 ^a	0,76±0,08 ^a
acetato di isoamile (mg/l)	1,72±0,03 ^a	1,37±0,30 ^a
etilesanoato (mg/l)	2,76±0,22 ^a	1,44±0,05 ^b
Esanolo (mg/l)	0,03±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a
Dietilsuccinato (mg/l)	0,02±0,01 ^a	0,01±0,00 ^a
feniletacetato (mg/l)	0,27±0,04 ^a	0,29±0,02 ^a
Nerolo (mg/l)	0,01±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a
β-feniletanolo (mg/l)	8,65±1,07 ^a	9,72±0,23 ^a
β-damascenone (mg/l)	0,01±0,01 ^a	0±0,00 ^a

Tabella 4: Concentrazioni composti volatili presenti nei campioni di spumante con metodo tradizionale determinate per ogni ceppo. I dati sono media ± DS dei risultati sperimentali di due prove. I valori che mostrano differenti lettere (a, b, c) all'interno di ogni colonna, indicano significative differenze in accordo con il test di Duncan (0,05%).

Si riscontra una produzione significativamente maggiore da parte di *L. thermotolerans* 101 di etilesanoato (2,76 mg/l), rispetto a quanto osservato in *T. delbrueckii* J401 (1,44 mg/l). Il

β -feniletanolo è il composto prodotto in misura maggiore da entrambi i lieviti, infatti *L. thermotolerans* 101 risulta averne prodotto in quantità di 8,65 mg/l, mentre *T. delbrueckii* J401 risulta una produzione di 9,72 mg/l. Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda la produzione degli altri composti volatili.

Capitolo quinto

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Nella produzione di vino spumante, *S. cerevisiae* è stato considerato la specie di lievito migliore sia per la fermentazione primaria che per la rifermentazione. *S. cerevisiae*, infatti, è il lievito ampiamente utilizzato in vinificazione perché possiede molte importanti caratteristiche utili quali l'alta capacità fermentativa e la resistenza in condizioni ostili (alti livelli di etanolo e solforosa). Ci sono pochi studi riguardo l'uso dei lieviti non-*Saccharomyces* nella fermentazione secondaria per la produzione di spumante (Canonico et al., 2018; Velázquez et al., 2019; Tofalo et al., 2022). Diversi lavori riguardano l'utilizzo di *T. delbrueckii*, per la sua abilità di influenzare positivamente la componente volatile e la corposità del vino, nonché la capacità di ridurre l'acidità volatile. Due studi in particolare, quello di Velázquez et al. (2019) e quello di Canonico et al. (2018), riportano risultati contrastanti riguardo l'utilizzo di *T. delbrueckii* nel processo di spumantizzazione. In termini di parametri chimici, Velázquez et al. (2019), riportano risultati che evidenziano un contributo negativo di *T. delbrueckii* nella produzione di spumante a causa del basso livello di pressione raggiunto, dell'alta quantità di zuccheri residui e del pH relativamente elevato del prodotto finale. Inoltre, sempre nello studio appena citato, *T. delbrueckii* mostra una diminuzione della biomassa più consistente rispetto a *S. cerevisiae*. Gli autori attribuiscono la causa di questo fenomeno alla maggiore sensibilità di *T. delbrueckii* per la pressione dovuta a CO₂, rispetto a *S. cerevisiae*. Canonico et al. (2018), invece, hanno evidenziato come altri ceppi di *T. delbrueckii*, Td130 e Td313, mostrino un consumo completo di

zuccheri e una cinetica di fermentazione comparabile a quella di *S. cerevisiae*. Il presente lavoro di tesi è in linea con i risultati di Canonico et al. (2018) per quanto riguarda il livello di pressione raggiunto da *T. delbrueckii* Td130, infatti *T. delbrueckii* J401 raggiunge una pressione paragonabile a quella di *S. cerevisiae*. Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, *B. bruxellensis* 6706 risulta essere un lievito con una performance fermentativa notevole, in quanto raggiunge lo stesso livello di pressione di *T. delbrueckii* J401, sebbene con un tasso fermentativo iniziale più lento. *T. delbrueckii* J401 si conferma essere adatto anche durante il processo di spumantizzazione in autoclave. *L. thermotolerans* DiSVA 1066 e *L. thermotolerans* 101, invece, risultano i lieviti meno performanti dal punto di vista della fermentazione. Tuttavia, *L. thermotolerans* 101 ha mostrato avere una buona efficienza di fermentazione durante il processo di spumantizzazione in autoclave. È necessario sottolineare che *L. thermotolerans* 101 e *T. delbrueckii* J401 raggiungono entrambi livelli di pressioni maggiori nel processo di produzione in autoclave rispetto al processo di rifermentazione in bottiglia.

Velázquez et al. (2019) attribuisce al pH relativamente elevato del prodotto finale una delle cause della produzione di spumante di cattiva qualità da parte di *T. delbrueckii*, corrispondente a un valore di 3,57. I risultati relativi al pH riscontrati in questo lavoro di tesi risultano invece inferiori, sia per quanto riguarda *S. cerevisiae* che per tutti i ceppi non-*Saccharomyces*. Infatti, gli spumanti prodotti tramite rifermentazione in bottiglia hanno un pH inferiore a 3,27, mentre lo spumante prodotto in autoclave da *T. delbrueckii* J401 mostra un pH di 3,15.

Riguardo la capacità di *T. delbrueckii* di ridurre l'acidità volatile del vino spumante, citata da Velázquez et al. (2019), si può affermare che anche *T. delbrueckii* J401 mostra questa

attitudine nel processo di spumantizzazione in autoclave, riducendo il livello di acidità volatile rispetto a quello del vino base. Tuttavia, questa tendenza non può essere confermata anche per quanto riguarda l'acidità totale dello spumante prodotto da *T. delbrueckii* J401 con metodo Charmat, che invece risulta aumentata rispetto al vino base di partenza e che potrebbe essere dovuta alle modalità di esecuzione del processo rifermentativo.

La quantità di zuccheri residui è un parametro importante che influenza la qualità del prodotto finito. In questo lavoro, solo *S. cerevisiae* consuma quasi tutti gli zuccheri presenti nel vino base, ma tra i lieviti non-*Saccharomyces*, possiamo notare che *T. delbrueckii* J401 è il ceppo di lievito che ha evidenziato un contenuto di zuccheri residui solo leggermente superiore. Quindi, sebbene non abbia consumato tutti gli zuccheri, si può affermare che *T. delbrueckii* J401 ha prodotto uno spumante con una quantità di zuccheri residui paragonabile a quella di *S. cerevisiae* L951, per quanto riguarda lo spumante prodotto con metodo tradizionale. Gli spumanti prodotti con il metodo Charmat hanno entrambi evidenziato un residuo zuccherino intorno a 10 g/l ma occorre tener conto che il vino base è stato addizionato con 33 g/l. Il consumo di zuccheri (23 g) ha determinato una produzione di CO₂ che ha prodotto un livello di pressione di circa 6 bar con una produzione di etanolo pari a 10,7 Vol%.

Balikci et al. (2016), enfatizzano l'abilità di *L. thermotolerans* di produrre acido lattico da glucosio e fruttosio, che può essere usata per incrementare l'acidità degli spumanti prodotti in regioni viticole calde. *L. thermotolerans* DiSVA 1066 risulta infatti il maggior produttore di acido lattico tra i ceppi, seguito da *S. cerevisiae* L951 e *B. bruxellensis* 6706.

L. thermotolerans 101, invece, insieme a *T. delbrueckii* J401 sono i minori produttori di acido lattico. Infatti, nei campioni di spumante prodotti tramite rifermentazione in autoclave si rilevano concentrazioni addirittura inferiori a quelle presenti nel vino base.

In termini di produzione di composti volatili e metaboliti secondari, Velázquez et al. (2019), sottolineano come *T. delbrueckii* possa implementare la qualità del vino solo se inoculato in fermentazione mista con *S. cerevisiae*, producendo in questa modalità un significativo aumento di composti conferenti la percezione di aroma fruttato. Canonico et al. (2018), sottolineano invece l'impatto positivo dei ceppi Td 130 e Td 313 in fermentazione pura per l'aumentata produzione di esteri come etilbutirrato, etilesanoato e isoamilacetato, e per la riduzione di acetaldeide e alcuni alcoli superiori, come propanolo e alcol isoamilico. *T. delbrueckii* J401, dopo rifermentazione in autoclave, si distingue per la produzione di etilesanoato, e anche per una quantità considerevole di beta-feniletanolo. Per quanto riguarda lo spumante prodotto da rifermentazione in bottiglia, invece, l'etilesanoato è prodotto in quantità rilevanti da *B. bruxellensis* 6706 e da *T. delbrueckii* J401, ma solo in quest'ultimo viene percepito in maniera maggiore l'aroma fruttato. Probabilmente l'aroma, come suggerisce Velázquez et al (2019), potrebbe essere mascherato dalla presenza degli zuccheri residui o dalla complessità della componente aromatica. Infatti, la discordanza tra la presenza di un composto e la corrispettiva percezione sensoriale può essere dovuta al fatto che la percezione risulta essere molto complessa in quanto dipende dall'interazione di un'ampia varietà di componenti. L'aumento della concentrazione di esteri è importante in quanto sono i composti responsabili dell'aroma fruttato e, in generale, della buona qualità di uno spumante. Si può verificare dall'analisi sensoriale che, l'aumentata produzione dell'estere etilbutirrato da parte di *L. thermotolerans* 101, si riflette in un punteggio di

preferenza sensoriale più elevato rispetto agli altri spumanti. Nello studio di Caliri et al. (2015), è stato riportato che i vini spumanti prodotti con metodo tradizionale mostrano una concentrazione più alta di esteri come isoamil acetato ed etilesanoato, rispetto allo spumante prodotto con metodo Charmat. In questo lavoro di tesi, invece, è interessante notare una produzione di beta-feniletanolo più elevata nello spumante ottenuto dalla fermentazione di *T. delbrueckii* J401 prodotto con metodo Charmat, rispetto a quello prodotto con metodo tradizionale.

In conclusione, questi dati evidenziano che l'uso dei lieviti non-*Saccharomyces* per la rifermentazione può essere una strategia per ottenere un vino spumante con una composizione aromatica e un profilo sensoriale differente da uno spumante convenzionale ottenuto utilizzando lo starter convenzionale *S. cerevisiae*. Inoltre, utilizzando il metodo di rifermentazione in autoclave, è possibile migliorare la cinetica di fermentazione di alcuni lieviti non-*Saccharomyces* meno performanti a livello fermentativo, ma interessanti per il bouquet aromatico che potrebbero potenzialmente conferire al prodotto finale.

Capitolo sesto

BIBLIOGRAFIA

- **Alexandre H. & Guilloux-Benatier M., 2006.** Yeast autolysis in sparkling wine. *Aust J Grape Wine Res* 12: 119-127.
- **Amerine A.M., Berg H.V., Kunkee R.E., Ough C.S., Singleton V.L. & Webb A.D., 1980.** The technology of winemaking. (4th ed.). Westport, CT: AVI Technical Books Inc. 46:486–492.
- **Andre´s-Lacueva C., Lopez-Tamames E., Lamuela-Ravento´s R. M., Buxaderas S., and del Carmen de la Torre-Boronat M., 1996.** Characteristics of Sparkling Base Wines Affecting Foam Behavior. *J. Agric. Food Chem.* 44, 989-995
- **Balikci E.K., Tanguler H., Jolly N. P., Erten H., 2016.** Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 33, 313-321.
- **Baumes R., Cordonnier R., Nitz S. & Drawert F., 1986.** Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. I. *Sci. FoodAgric.* 37, 927-943.
- **Bely M., Stoeckle P., Masneuf-Pomarède I., Dubourdiou D., 2008.** Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122:312–320.

- **Berry D.R., 1995.** Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A.G.H. & PIGGOTT, J.R. (eds). Fermented beverage production. Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp. 32-44
- **Bidan P., Feuillat M., Moulin J.P., 1986.** Les vins mousseux. Bull. l'OIV, 59, 663–664.
- **Bordiga M., Rinaldi M., Locatelli M., Piana G., Travaglia F., Coisson J.D., 2013.** Characterization of Muscat wines aroma evolution using comprehensive gas chromatography followed by a post-analytic approach to 2D contour plots comparison. Food Chemistry, 140 (1-2), 57-67
- **Borrull A., Poblet M., Rozès N., 2015.** New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. Food Microbiol. 48, 41–48.
- **Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F. & Kunkee R.E., 1995.** Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York.
- **Brissonnet F., Maujean A., 1993.** Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 297–301
- **Brissonnet, F., Maujean, A., 1991.** Identification of some foam-active compounds in champagne base wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 97-102.
- **Buxaderas S., López-Tamames E., 2012.** Sparkling wines: Features and trends from tradition. Adv. Food Nutr. Res., 66, 1–45.
- **Caliari V., Burin V. M., Rosier J. P., Bordignon Luiz M. T., 2014.** Aromatic profile of Brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties. Food Research International, 62, 965–973.

- **Caliari V., Panceri C.P., Rosier J.P., Bordignon-Luiz M.T., 2015;** Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 61, Issue 2, Pages 393-400.
- **Canonico L., Comitini F., Ciani M., 2018.** *Torulaspota delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiol.*, 74, 100–106.
- **Cebollero E., Gonzalez R., 2006.** Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4121–4127.
- **Charoenchai C., Fleet G.H., Henschke P.A. & Todd B.E.N., 1997.** Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Austr. I. Grape Wine Res.* 3, 2-8.
- **Charpentier C., Feuillat M., 1993.** Yeast autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G.H., Ed.; Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland; pp. 225–242.
- **Charters S., Velikova N., Ritchie C., Fountain J., Thach L., Dodd T. H., Terblanche N., 2011.** Generation Y and sparkling wines: A cross-cultural perspective. *International Journal of Wine Business Research*, 23, 161–175.
- **Chasseriaud L., Coulon J., Marullo P., Albertin W., Bely M., 2018.** New oenological practice to promote non-*Saccharomyces* species of interest: Saturating grape juice with carbon dioxide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 3779–3791.
- **Comitini F., Capece A., Ciani M., Romano P., 2017.** New insights on the use of wine yeasts. *Curr. Opin. Food Sci.*, 13, 44–49.

- **Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., 2011.** Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28, 873-888.
- **Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., 2011.** Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol., 5, 873–882.
- **Condé B. C., Bouchard E., Culbert J. A., Wilkinson K. L., Fuentes S., and Howell K. S., 2017.** Soluble Protein and Amino Acid Content Affects the Foam Quality of Sparkling Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65 (41), 9110-9119.
- **Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C., 2014.** Evaluation of non-*Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine. Appl Environ Microbiol 80:1670–1678.
- **Cotea V.V., Focea M.C., Luchian C.E., Colibaba L.C., Scutarasu E.C., Marius N., Zamfir C.I., Popirda A., 2021.** Influence of different commercial yeast on volatile fraction of sparkling wines. Foods, 10, 247.
- **Domizio P., Liu Y., Bisson L.F., Barile D., 2014.** Use of non-*Saccharomyces* wine yeast as novel sources of mannoproteins in wine. Food Microbiol 43:5–15.
- **Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M., 2011.** Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of

- putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 147, 170–180.
- **Duteurtre B., 2006.** Assemblage. In *Le Champagne: De La Tradition à La Science*; Lavoisier/Tec & Doc: Paris, France; pp. 116–125.
 - **Escudero A., Charpentier, M.; Etiévant, P., 2000.** Characterization of aged champagne wine aroma by GC-O and descriptive profile analyses. *Sci. des Aliment.*, 20, 331–346.
 - **Farrer K. T. H., 1956.** The autolysis of yeasts. *Food Science Abstracts*, 28, 1–12
Foam measurements and effect of wine filtration on foam behavior. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 287-392.
 - **Fujii T., Nagasawa N., Iwamatsu A., Bogaki T., Tamai Y., Hamachi M., 1994.** Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 2786-2792.
 - **García M. J., Alexandre J. L., Álvarez I., & Lizama V., 2009.** Foam aptitude of Bobal variety in white sparkling wine elaboration and study of volatile compounds. *European Food Research and Technology*, 229, 133–139.
 - **Garofalo C., Arena M.P., Laddomada B., Cappelo M.S., Bleve G., Grieco F., Beneduce L., Berbegal C., Spano G., Capozzi V., 2016.** Starter Cultures for sparkling Wine. *Fermentation*, 2, 21.
 - **Giovani G., Rosi I., Bertuccioli M., 2012.** Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 160:113–118.

- **Gobert A., Tourdot- Maréchal R., Morge C., Sparrow C., Liu Y., Quintanilla-Casas B., Vichi S., Alexandre H., 2017.** Non- *Saccharomyces* yeast nitrogen source preferences: impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. *Front. Microbiol.* 8: 2175
- **Gonzalez-Royo E., Pascual O., Kontoudakis N., Esteruelas M., Esteve-Zarzoso B., Mas A., Canals J.M., Zamora F., 2015.** Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999-1012.
- **Guilloux-Benatier M., Guerreau J., Feuillat M.,1995.** Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganism. *Am J. Enol Vitic.* 46:486-492.
- **Gurbuz O., Rouseff J.M. & Rouseff R.L., 2006.** Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography olfactometry and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 3990–3996.
- **Hardy G., 1990.** Importance of press in the quality of base wines for Champenoise method. *A. C. E. Revista d’Enologia*, 20,17-22.
- **Ivit N.N., Kemp B., 2018.** The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. *Fermentation* , 4, 73.
- **Jackson R.S., 2008.** *Wine Science Principles and Applications* (789 pp.), third ed. Academic Press, London, UK.
- **Jackson R.S., 2014.** Chemical Constituents of Grapes and Wine. *Wine Sci.*, 347–426

- **Jackson R.S., 2014.** Specific and Distinctive Wine Styles. In *Wine Science: In Principles and Applications*; Academic Press/Elsevier: Hoboken, NJ, USA; pp. 677–759.
- **Jolly N.P., Varela C., Pretorius I.S., 2014.** Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.*, 14, 215–237.
- **Kemp B., Alexandre H., Robillard B., Marchal R., 2015.** Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *J. Agric. Food Chem.* 63, 19-38.
- **Lambrechts M.G., Pretorius I.S., 2000.** Yeast and its Importance to Wine Aroma- A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 97–129
- **Lengyel E., 2012.** Primary aromatic character of wine. *Acta Univ. Cibiniensis Ser. E Food Technol.*, XVI, 1.
- **Lombardi J. S., De Leonardis A., Lustrato G., Testa B., & Iorizzo M., 2015.** Yeast autolysis in sparkling wine aging: Use of killer and sensitive *Saccharomyces cerevisiae* strains in co-culture. *Recent Patents on Biotechnology*, 9, 223–230.
- **Martínez-Rodríguez A., Carrascosa A.; Polo M., 2001.** Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, 155–160.
- **Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa A.V., Barcenilla J.M., PozoBayon M.A and Polo M.C., 2001b.** Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology* 18, 183–191.

- **Martínez-Rodríguez A.J., Polo M.C., 2000.** Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1081–1085.
- **Martínez-Rodríguez A.J., Polo M.C., 2003.** Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chem.*, 81, 383–388.
- **Martínez-Rodríguez A.J., Pueyo E., 2009.** Sparkling wines and yeast autolysis. In Springer (Ed.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, pp.61-80.
- **Masneuf-Pomarede I., Bely M., Marullo P., Albertin W., 2016.** The genetics of non-conventional wine yeasts: Current knowledge and future challenges. *Front. Microbiol.*, 6, 1563.
- **Maturano Y.P., Rodríguez Assaf L.A., Toro M.E., Nally M.C., Vallejo M., Castellanos de Figueroa L.I., Combina M., Vazquez F., 2012.** Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 155:43–50.
- **Medina-Trujillo L., González-Royo E., Sieczkowski N., Heras J., Fort F., Canals J.M., Zamora F., 2017.** Effect of sequential inoculation (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foam properties of sparkling wine (Cava). *Eur. Food Res. Technol.*, 243, 681–688.
- **Medina-Trujillo L., González-Royo E., Sieczkowski N., Heras J., Fort F., Canals J.M., Zamora F., 2016.** Effect of sequential inoculation (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foam

properties of sparkling wine (Cava). *BIO Web of Conferences* 7, 02024; 39th World Congress of Vine and Wine.

- **Morfaux J.N., Dupuy P., 1966.** Comparaison de l'exorption des acides aminés par une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et un mutant résistant à la canavanine. *Compte Rendu de l' Académie des Sciences* 263, 1224.
- **Nordstrom K., 1964.** Formation of esters from acids by brewer's yeast. II. Formation from lower fatty acids. *J. Inst. Brew.* 70, 42-55
- **Nunez Y. P., Carrascosa A. V., González R., Polo M. C., Martínez-Rodríguez A. J., 2005.** Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7232–7237.
- **Nykanen L., Nykanen I., 1977.** Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. Inst. Brew.* 83, 30-31.
- **Oro L., Ciani M., Comitini F., 2014.** Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 116:1209–1217.
- **Padilla B., Gil J.V., Manzanares P., 2016.** Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.*, 7, 411.
- **Pampulha M.E., Loureiro-Dias M.C., 1989.** Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 375–380.
- **Perpetuini G., Di Gianvito P., Arfelli G., Schirone M., Corsetti A., Tofalo R., Suzzi, G., 2016.** Biodiversity of autolytic ability in flocculent *Saccharomyces*

cerevisiae strains suitable for traditional sparkling wine fermentation. *Yeast*, 33; 303-312.

- **Pineau B., Barbe J.C., Leeuwen C.V. & Dubourdieu D., 2007.** Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4103–4108.
- **Pozo-Bayon M. Á., Martínez-Rodríguez A., Pueyo E., & Moreno-Arribas M. V., 2009.** Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 289–299.
- **Pozo-Bayon M.A., Hernandez M.T., Martín Alvares P.J., Polo M.C., 2003.** Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2089-2095.
- **Pozo-Bayon M.A., Martín-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V., Andujar-Ortiz I., Pueyo E., 2010.** Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rose Cava sparkling wines. *Food Sci. Technol.* 43, 1526-1532.
- **Pueyo E., Martínez-Rodríguez A.J., 2009.** Sparkling wines and yeast autolysis. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), Chapter 3A. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 1 edition. Springer, p. 735.
- **Rapp A., 1998.** Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42, 351-363.
- **Rapp A., Mandery H., 1986.** Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.

- **Rapp A., Versini G., 1991.** Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ (ed). Proceedings of the International symposium on nitrogen in grapes and wines. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture. pp. 156-164.
- **Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maugean A. & Dubourdieu D., 1998.** Tome 2, Chimie du vin, stabilisation et traitements. Dunod, Paris.
- **Riu-Aumatell M., Bosch-Fusté J., López-Tamames E., Buxaderas S., 2006.** Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. Food Chem., 95, 237–242.
- **Riu-Aumatell M., Torrens J., Buxaderas S., López-Tamames E., 2013.** Cava (Spanish sparkling wine) aroma: Composition and determination methods. In Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III; Muñoz-Torrero, D., Cortés, A., Mariño, E.L., Eds.; Transworld Research Network: Kerala, India; pp. 45–60.
- **Robillard B., Delpuech E., Viaux L., Malvy J., Vignes-Alder M., Duteurtre B., 1993.** Improvements of methods for sparkling base wine foam measurement and effect of wine filtration on foam behavior. Am J Enol Vitic. 44: 387-392.
- **Romani C., Lencioni L., Gobbi M., Mannazzu, I., Ciani, M., Domizio, P., 2018.** *Schizosaccharomyces japonicus*: A polysaccharide-overproducing yeast to be used in winemaking. Fermentation, 4, 14.
- **Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyerd D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, Vichi S, Guérin-Schneider R, Caixach J, Alexandre H., 2012.** Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of sauvignon blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces*

yeasts. *Food Microbiol* 32:243–253.

- **Scheper T., Henzler H.J., Kieran P.M., Kretzmer G., Macloughlin P.F., Malone D.M., Schumann W., 2000.** Influence of stress on cell growth and product formation. Springer–Verlag Telos 1st ed., 190.
- **Soles R.M., Ough C.S., Kunkee R.E., 1982.** Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 94-98.
- **Stefenon C.A., Colombo M., Bonesi, C.D.M., Marzarotto, V., Vanderlinde, R., Salvador, M., Henriques, J.A.P., 2010.** Antioxidant activity of sparkling wines produced by Champenoise and Charmat methods. *Food Chem.* 119, 12-18.
- **Strauss C.R., Wilson B., Gooley P.R., Williams P.J., 1986.** Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. *ACS Symp. Ser.*, 222–242.
- **Suzzi G., Tofalo R., 2014.** *Microbiologia Enologia*. Edizione Edagricole Università & Formazione.
- **Todd B.E.N., Fleet G.H., Henschke P.A., 2000.** Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 65–72.
- **Tofalo R., Perpetuini G., Rossetti A.P., Gaggiotti S., Piva A., Olivastri L., Cichelli A., Compagnone D., Arfelli G., 2022.** Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts to improve traditional sparkling wines production. *Food Microbiology*, 108.
- **Torrens J., Urpí P., Riu-Aumatell M., Vichi S., López-Tamames E., Buxaderas, S., 2008.** Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 124, 48–57.

- **Torresi S., Frangipane M.T., Anelli G., 2011.** Biotechnologies in sparkling wine. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129; 1232-1241.
- **Vannier A., Brun O.X., Feinberg M.H., 1999.** Application of sensory analysis to champagne wine characterization and discrimination. *Food Qual. Prefer.* 10,101-107.
- **Vanrell G., Esteruelas M., Canals J.M., Zamora F., 2005.** Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des OEnologues*, 114, 28–30.
- **Varela C., 2016.** The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9861–9874.
- **Varela C., Siebert T., Cozzolino D., Rose L., Mclean H., Henschke P.A., 2009.** Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with ‘wild’ indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 15, 238–248.
- **Velázquez R., Zamora E., Alvarez M. L., Ramírez M., 2019.** Using *Tourolaspora delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 134-144.
- **Viaux L., Morard C., Robillard B., Duteurtre B., 1994.** The impact of base wine filtration on champagne foam behavior. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 407-409.
- **Vigentini I., Cardenas S.B., Valdetara F., Faccincani M., Panont C.A., Picozzi C., Foschino R., 2017.** Use of Native Yeast Strains for In-Bottle Fermentation to Face the Uniformity in Sparkling Wine Production. *Front. Microbiol.*, 8, 1225.

- **Vincenzini M., Romano P., Farris G.A., 2005.** Microbiologia del vino. Casa Editrice Ambrosiana.
- **Zambonelli C., 2006b.** Le caratteristiche enologiche dei lieviti. Le modalità di sviluppo nei mezzi liquidi. In: Edagricole (Ed.) Microbiologia e biotecnologia dei vini. I processi biologici e le tecnologie della vinificazione, pp. 144–151.
- **Zoecklein B., 2002.** A review of Méthode champenoise production. Virginia Tech. Reprinted 2002. Publication 463-017W.