



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Uve Malvasia:

**un potenziale sensoriale che i lieviti indigeni sono in grado di
esaltare**

Malvasia grapevine cultivar:

**a sensory potential that can be intensified through the enzymatic
activity of autochthonous yeasts**

Studente
Riccardo Rossi

Relatore
Prof.ssa Francesca Clementi

Anno Accademico 2018/2019

Sommario

Introduzione.....	2
1. Storia della Malvasia	4
2. Malvasia nelle Marche.....	7
2.1 Malvasia bianca di Candia:.....	7
2.2 Malvasia bianca lunga:	9
3. Studi sulla fermentazione spontanea di uve Malvasia	17
3.1 La fermentazione spontanea dei mosti	17
3.2 Ricerche sul microbiota spontaneo di mosti Malvasia.....	20
4. Studio delle caratteristiche aromatiche della Malvasia	30
4.1 Caratteristiche sensoriali dei vini e contributo dei lieviti	30
4.2 Caratteristiche aromatiche varietali dei vini Malvasia	36
4.3 Studio comparativo tra il profilo aromatico della Malvasia di Candia aromatica e la Malvasia odorosissima.....	42
Bibliografia	49

Introduzione

La Malvasia è un vitigno che comprende moltissime varietà, sia a bacca bianca che a bacca nera, ed è una delle cultivar più diffuse in Italia. Il crescente interesse per i vini Malvasia sul mercato internazionale apre buone prospettive per riproporre la diversificazione dei prodotti enologici dalle cultivar Malvasia sottoutilizzate (G. Vasile Simone et al., 2017).

Per far fronte a questa crescente richiesta diventa necessario mettere a disposizione dei consumatori vini che siano unici o comunque presentino particolarità positive, sia a livello aromatico che al gusto. Questo può essere realizzato attraverso pratiche di fermentazione spontanea, in cui la trasformazione da mosto a vino è mediata da microrganismi, lieviti e non solo, in grado di colonizzare un determinato ambiente vitivinicolo, rendendo questi microrganismi specifici per quel vigneto, ma anche per la cantina stessa. Questo approccio influenzerà l'andamento del processo fermentativo, in cui diverse specie di lieviti indigeni e diversi ceppi, parteciperanno alla produzione di composti secondari, in grado di caratterizzare la componente aromatica del vino.

La presente tesi ha lo scopo di condurre uno studio compilativo focalizzato su questa cultivar e, in particolare, su fermentazioni spontanee di mosti da uve Malvasia e sugli aspetti sensoriali caratterizzanti i vini prodotti in queste condizioni, anche con la finalità di evidenziare le relazioni esistenti tra la biodiversità dei lieviti indigeni coinvolti nel processo fermentativo e l'esaltazione delle caratteristiche sensoriali dei vini ottenuti, con particolare riferimento alla liberazione di aromi varietali.

Purtroppo in letteratura esiste un numero molto limitato di lavori scientifici dedicati a questi aspetti relativamente alla vinificazione da uve Malvasia e nessuno di questi lavori riguarda le varietà di Malvasia coltivate nella regione Marche. Per questo motivo, dopo alcuni capitoli introduttivi riguardanti la Storia della Malvasia e la Malvasia coltivata nelle Marche, incluso il relativo disciplinare di produzione di vini IGT, lo studio compilativo si è focalizzato sugli

aspetti fermentativi e sensoriali sopra citati prendendo in considerazione articoli scientifici relativi alla cultivar di Malvasia di Candia aromatica, coltivata principalmente nella zona dell'Emilia-Romagna e Lombardia, alla Malvasia Odorosissima (anche nota come Malvasia aromatica di Parma) e, in misura minore alla Malvasia delle Lipari.

1. Storia della Malvasia

Malvasia è un termine con il quale vengono indicati numerosi vitigni, i quali si differenziano notevolmente per morfologia delle piante, sapore, colore e composizione chimica del frutto, precocità di maturazione, produttività ed attitudine alla vinificazione.

L'origine della parola *Malvasia*, va ricercata nel riferimento a vini dolci che venivano prodotti in Grecia in seguito all'appassimento delle uve al sole, vini chiamati nell'antichità *criticos* (dai Cretesi dell'isola di Creta). All'inizio del quindicesimo secolo i Veneziani occuparono il Peloponneso e cominciarono ad importare questo vino dalla città di Monemvasia (il cui nome significa porto che ha una sola entrata), indicandolo con il nome di Monemvasia, Monovasia o Malvasia. La crescente domanda di questo vino da parte dei mercati di Nord-Europa indusse la Repubblica di Venezia a promuovere la coltivazione delle uve da cui veniva prodotto, in particolare a Creta, zona che si prestava climaticamente e morfologicamente a questa cultura. Grazie all'opera dei Veneziani, tra il 1500 e il 1700 la Malvasia divenne il vino più importante di Europa e a Venezia nacquero osterie che vendevano esclusivamente questo vino.

La diffusione in Italia cominciò a partire dal 1540, con la conquista di Creta per opera dei Turchi; Venezia per non rinunciare al ricco mercato di questo vino, ne favorì la produzione nei luoghi più disparati, lungo le rotte navali che dal Mediterraneo portavano alla città lagunare. Le varietà adoperate erano le più disparate. Nelle regioni più settentrionali la tecnica dell'appassimento delle uve al sole non poteva essere effettuata e si ricorreva pertanto alla cottura del mosto per concentrarlo.

Nel 1700 si sviluppò in Europa la pratica del taglio delle uve di diversa varietà e la Malvasia viene aggiunta ai vini per conferire aroma e freschezza ai vini da pasto.

Stabilire quale sia il vero progenitore della famiglia delle Malvasie è davvero difficile. Da una parte esistono in Grecia parecchi vitigni aromatici le cui caratteristiche corrispondono a quelle dei vini Malvasia descritti in passato e, verosimilmente, con ciascuno di essi sono stati prodotti

e importati dalla Grecia vini Malvasia. D'altro canto, in seguito al successo del vino Malvasia, a molte uve è stato attribuito questo nome per facilitarne il commercio. A riprova di ciò, oggi esistono parecchie varietà di uve denominate Malvasia, alcune a bacca bianca altre a bacca rossa che presentano caratteristiche organolettiche e morfologiche molto diverse. La loro coltivazione è ampiamente diffusa nell'area del Mediterraneo (Crespan et al., 2006), ma anche in Nord America (Bettiga et al., 2003), Sud America (Fielden, 2003; Ducati et al., 2009) e Australia.

Nel Registro Nazionale delle varietà di vite, oggi sono iscritti ben 19 vitigni, coltivati nelle più lontane regioni d'Italia:

A bacca bianca:

1. Malvasia Bianca;
2. Malvasia Bianca di Basilicata;
3. Malvasia Bianca di Candia;
4. Malvasia Bianca lunga;
5. Malvasia del Lazio;
6. Malvasia di Candia aromatica;
7. Malvasia di Casorzo;
8. Malvasia di Lipari;
9. Malvasia di Sardegna;
10. Malvasia Istriana;
11. Malvasia Moscata;

A bacca nera:

12. Malvasia Nera;
13. Malvasia di Schierano;

14. Malvasia Casalini;
15. Malvasia Nera lunga;
16. Malvasia Nera di Basilicata;
17. Malvasia Nera di Brindisi;
18. Malvasia Nera di Lecce;

A bacca rosa:

19. Malvasia Rosa;

2. Malvasia nelle Marche

Nelle Marche sono presenti solo 2 varietà:

2.1 Malvasia bianca di Candia:

varietà a bacca bianca coltivata in molte regioni Italiane centro-settentrionali; di probabile origine greca, e, in particolare dell'isola di Creta (Candia era la capitale di Creta, il nome che tutta l'isola assunse sotto l'occupazione dei Veneziani tra il XII e il XVII secolo); è anche riconosciuta come *Malvasia rossa*, non per le caratteristiche del frutto, ma per il colore che assume il giovane germoglio.

a) Principali caratteristiche:

1. *Apice*: a ventaglio, lanuginoso (peluria chiara e morbida), di colore verde biancastro emarginato di rosa;
2. *Foglia*: di grandi dimensioni, pentagonale, pentalobata, a volte trilobata. Seno peziolare a U o a lira aperta, seni laterali superiori a V aperti, inferiori a V poco profondi. Lembo a superficie liscia o leggermente rugosa, lobi revoluti. Pagina inferiore aracnoidea con nervature leggermente sfumate di rosa. Denti medi a margine rettilineo;
3. *Grappolo*: grande, conico spesso alato (due ali), semi-spargolo;
4. *Acino*: di media grandezza, sferoidale. Buccia sottile e consistente, poco pruinosa, di colore giallo-dorato con punteggiature marroni se i grappoli sono ben esposti al sole. Polpa a sapore semplice

b) Fenologia:

1. *Epoca di germogliamento*: medio- tardiva (II decade di Aprile);
2. *Epoca di fioritura*: media (prima decade di Giugno);
3. *Epoca d'invasatura*: media (fine Agosto);
4. *Epoca di maturazione*: medio-precoce (fine Settembre);

- c) Esigenze ambientali e colturali: la produzione è elevata e costante, peso medio del grappolo elevato: 400-600g. Preferisce terreni collinari, ben esposti, e si adatta anche a terreni argillosi e siccitosi, clima tendente al caldo. Sistema di allevamento consigliato: a media espansione, con potatura medio-lunga.
- d) Sensibilità malattie ed avversità: buona tolleranza alle gelate primaverili ed al vento, ottima resistenza alla siccità. Tollera abbastanza bene peronospora e marciume, mentre in annate e ambienti sfavorevoli, può andare soggetta ad oidio e mal dell'esca. Sensibile alla flavescenza dorata.
- e) Caratteristiche chimiche del vino:
1. *Grado alcolico*: 10,5-12 vol. %
 2. *pH*: 3,3-3,6
 3. *Acidità*: 5,0-7,0 g/l
- f) Caratteristiche sensoriale del vino: fornisce un vino giallo paglierino carico, sapido, leggermente abboccato, con un caratteristico sapore amarognolo, spesso privo di finezza, con tendenze all'ossidazione.
- g) DOP ed IGP
1. DOCG: Cannellino di Frascati, Frascati Superiore
 2. DOC: Abruzzo, Bianco Capena, Bosco Eliceo, Castelli Romani, Cerveteri, Colli Albani, Colli Lanuvini, Controguerra, Frascati, Genazzano, Marino, Molise o del Molise, Montecompatri - Colonna o Montecompatri o Colonna, San Severo, Sannio, Tarquinia, Terra d'Otranto, Terre Tollesi o Tullum, Valdichiana toscana, Velletri, Vignanello, Zagarolo
 3. IGT: Alleroni*, Alta Valle della Greve*, Alto Mincio, Barbagia, Benevento o Beneventano*, Bergamasca*, Bettona*, Castelfranco Emilia, Campania, Cannara*, Civitella d'Agliano*, Colli Aprutini*, Colli Cimini*, Colli del Limbara, Colli del Sangro, Collina del Milanese*, Colline Frentane, Colline Pescaresi*,

Colline Teatine*, Costa Toscana*, Del Vastese o Histonium, Trevenezie, Dugenta, Emilia o dell'Emilia*, Forli*, Frusinate o del Frusinate*, Isola dei Nuraghi, Lazio*, Marche*, Marmilla, Montecastelli, Narni*, Nurra, Ogliastra, Osco o Terre degli Osci*, Parteolla, Planargia, Provincia di Mantova*, Provincia di Nuoro, Provincia di Pavia*, Puglia*, Quistello*, Ravenna*, Romangia, Rotae*, Rubicone*, Sabbioneta*, Salento*, Sebino, Sibiola, Spello*, Tarantino*, Alpi Retiche*, Terre Aquilane o Terre de l'Aquila*, Terre di Chieti*, Terre Lariane, Tharros, Toscano o Toscana*, Trexenta, Umbria*, Val di Magra, Valle d'Itria*, Valle del Tirso, Valli di Porto Pino, Veneto

* è ammessa la menzione di questa varietà in etichetta

2.2 Malvasia bianca lunga:

Varietà a bacca bianca, coltivate in diverse regioni d'Italia, principalmente in Toscana, ma anche nelle Marche, in Umbria, Liguria, Lazio, Abruzzo, Puglia, e nella zona del Veronese.

a) Principali caratteristiche:

- 1) Apice: di forma piuttosto espansa, vellutato o cotonoso, di colore bianco, lievemente argenteo, con orlo carminato;
- 2) Foglia: medio o grande, pentagonale quinquelobata (talvolta eptalobata). Seno peziolare a lira chiusa con bordi sovrapposti, seni laterali superiori a lira chiusa con bordi sovrapposti, inferiori a U. Lembo leggermente a gronda e ondulato, bolloso, Lobi molto marcati, piegati leggermente a gronda. Pagina superiore glabra, mediamente brillante. Pagina inferiore fortemente aracnoidea o lanuginosa;

- 3) Grappolo: grande, allungato-piramidale, in genere con due ali, di aspetto compatto.
 - 4) Acino: medio o piccolo, sferoidale. Buccia pruinosa di colore verdognolo paglierino dorato, abbastanza resistente. Polpa succosa, di sapore neutro o particolare, gradevole e caratteristico.
- b) Fenologia:
- 1) *Epoca di germogliamento*: piuttosto tardiva (III o più sovente IV decade di Aprile);
 - 2) *Epoca di fioritura*: media (I decade di Giugno);
 - 3) *Epoca d'invasatura*: tardiva (inizio Settembre);
 - 4) *Epoca di maturazione*: medio-tardiva (inizio Ottobre);
- c) Esigenze ambientali e colturali: la produzione è abbondante e costante, peso medio del grappolo medio-elevato: 200-400 g. I terreni più idonei sono quelli collinari, non troppo freschi, clima temperato-caldo, forma di allevamento espansa, con potatura lunga e ricca.
- d) Sensibilità malattie ed avversità: molto sensibile alla peronospora, elevata sensibilità all'oidio, botrite e marciume acido. Buona resistenza ai freddi invernali, particolarmente sensibile a squilibri nutrizionali.
- e) Caratteristiche chimiche del vino:
- *Grado alcolico*: 10,9-13,4 vol. %
 - *pH*: 3,0-3,3
 - *Acidità*: 6,7-6,8 g/l
- f) Caratteristiche sensoriali del vino: vino di colore giallo paglierino, leggermente aromatico, sapido, di corpo, giustamente alcolico, morbido per l'acidità contenuta.
- g) DOP ed IGP:

- DOCG: Carmignano;
- DOC: Abruzzo, Amelia, Barco Reale di Carmignano, Bianchello del Metauro, Bianco Capena, Bianco di Custoza o Custoza, Bianco di Pitigliano, Cacc'e' Mmitte di Lucera, Colli dell'Etruria Centrale, Colli Etruschi Viterbesi o Tuscia, Colli Maceratesi, Colline Lucchesi, Controguerra, Cortona, Est! Est!! Est!!! di Montefiascone, Grance Senesi, Gravina, Lizzano, Maremma Toscana, Montecucco, Orcia, San Gimignano, San Torpè, Sant'Antimo, Terra d'Otranto, Terre Tollesi o Tullum, Val d'Arbia, Val d'Arno di Sopra o Valdarno di Sopra, Val di Cornia, Valdichiana toscana, Vignanello, Vin santo del Chianti, Vin santo del Chianti Classico, Vin santo di Carmignano, Vin santo di Montepulciano;

IGT: Alleron*, Alta Valle della Greve*, Bettona*, Cannara*, Civitella d'Agliano*, Colli Aprutini*, Colli Cimini*, Colli del Sangro*, Colle della Toscana Centrale*, Colline del Genovesato, Colline Frentane*, Colline Pescaresi*, Colline Savonesi, Colline Teatine*, Costa Toscana*, Daunia, Del Vastese o Histonium*, Trevenezie*, Frusinate o del Frusinate*, Lazio*, Liguria di Levante*, Marche, Montecastelli*, Murgia, Narni*, Puglia, Salento, Spello*, Tarantino, Terre Aquilane o Terre de l'Aquila*, Terre di Chieti*, Toscano o Toscana*, Umbria*, Val di Magra, Vallagarina, Valle d'Itria, Veneto*, Venezia Giulia, Verona o Provincia di Verona o Veronese

* è ammessa la menzione di questa varietà in etichetta

2.3 Disciplinare di Produzione IGT Marche con Malvasia

Per la produzione di vini “Malvasia IGT Marche” devono essere rispettati i parametri generali del disciplinare di produzione per vini “IGT Marche”, come di seguito riportato:

- ✓ La *indicazione geografica tipica "Marche"* con la specificazione di uno dei vitigni idonei alla coltivazione nella regione Marche è riservata ai vini ottenuti da uve Malvasia bianca di Candia B., per almeno l'85%. Possono concorrere, da sole o congiuntamente, alla produzione dei mosti e vini, le uve dei vitigni a bacca di colore analogo, idonei alla coltivazione nella regione Marche ed ivi coltivate fino ad un massimo del 15%:

Alicante N., Barbera N., Cabernet Franc N., Cabernet Sauvignon N., Chardonnay B., Ciliegiole N., Fiano B, Gaglioppo N., Grechetto B., Incrocio Bruni 54 B., Merlot N., Moscato bianco B., Passerina B., Pinot bianco B., Pinot grigio G., Pinot nero N., Rebo N., Riesling B., Sangiovese N., Sauvignon B., Syrah N., Trebbiano toscano B.
- ✓ La zona di produzione delle uve per l'ottenimento dei prodotti atti ad essere designati con la Indicazione Geografica Tipica “Marche” comprende l'intero territorio amministrativo delle province di Ancona, Ascoli Piceno, Fermo, Macerata e Pesaro Urbino nella Regione Marche.
- ✓ La produzione massima di uva per ettaro di vigneto in coltura specializzata, nell'ambito aziendale non deve essere superiore:
 - per i vini ad indicazione geografica tipica "Marche" bianco, rosso e rosato, a tonnellate 21,6;
 - per i vini ad indicazione geografica tipica "Marche" con la specificazione del vitigno, a tonnellate 22,00 per Malvasia bianca di Candia B.
- ✓ Le uve destinate alla produzione dei prodotti vinicoli ad indicazione geografica tipica "Marche" devono assicurare ai vini, compresi i mosti di uve parzialmente fermentati,

i vini frizzanti, i vini spumanti di qualità e i vini spumanti di qualità di tipo aromatico, un titolo alcolometrico volumico naturale minimo di:

- 9,5% Vol per il "Marche" bianco;
 - ai Vini di uve stramature un titolo alcolometrico volumico naturale non inferiore a 15% Vol.
 - ai vini ottenuti da uve appassite un titolo alcolometrico volumico naturale non inferiore a 16% Vol.
- ✓ Le uve destinate alla produzione dei vini ad indicazione geografica tipica "Marche", devono assicurare i seguenti titoli alcolometrici volumici naturali minimi:
- Malvasia bianca di Candia B. 9.5% Vol.
- ✓ Nel caso di annate particolarmente sfavorevoli, i valori dei titoli alcolometrici volumici naturali minimi possono essere ridotti dello 0.5% Vol..
- ✓ La Regione Marche, sentite le organizzazioni di categoria, con proprio decreto, di anno in anno, prima della vendemmia, tenuto conto delle condizioni ambientali e di coltivazione, può stabilire un limite massimo di produzione per ettaro inferiore a quello fissato dal presente disciplinare, dandone immediata comunicazione al Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali.
- ✓ La vinificazione delle uve destinate a produrre vini a indicazione geografica tipica "Marche" avviene all'interno della zona di produzione, tuttavia, tenuto conto delle situazioni tradizionali di produzione, è consentito che tali operazioni siano effettuate anche nell'ambito dell'intero territorio della provincia di Rimini
- ✓ Le categorie dei prodotti vitivinicoli ad indicazione geografica tipica "Marche", all'atto dell'immissione al consumo, devono avere le seguenti caratteristiche:
- "Marche" bianco
 - colore: Giallo pagliarino ;
 - odore: delicato, gradevole ;

- sapore: asciutto e fresco;
 - titolo alcolometrico volumico totale minimo: 9,5% vol.;
 - acidità totale minima: 3,50 g/l;
 - estratto non riduttore minimo: 13,0 g/l.
- ✓ Le uve destinate all'ottenimento dei prodotti vitivinicoli ad Indicazione Geografica Tipica "Marche" possono essere destinate alla produzione del Vino "Passito", Vino ottenuto da uve appassite e del Vino di uve stramature, dopo essere state sottoposte ad un periodo di appassimento (anche in vigna) che può protrarsi fino al 30 marzo dell'anno successivo a quello della vendemmia. La resa massima dell'uva in vino finito, non deve essere superiore al 80% per tutti i tipi di vino, ad eccezione del Vino Passito, del Vino ottenuto da uve appassite e del Vino di uve stramature che non deve essere superiore al 50%. L'immissione al consumo del vino a indicazione geografica tipica "Marche" nelle categorie Vino "Passito", Vino ottenuto da uve appassite e Vino di uve stramature, non può avvenire prima del 1° novembre dell'anno successivo a quello di produzione delle uve.

"Marche" bianco Passito

- colore: giallo dorato ;
- odore: gradevole fine e delicato ;
- sapore: dolce e caldo ;
- titolo alcolometrico volumico totale minimo: 9,5% vol.;
- acidità totale minima: 3,50 g/l;
- estratto non riduttore minimo: 13,0 g/l

"Marche" bianco Spumante di qualità

- colore: giallo paglierino tenue ;
- odore: caratteristico gradevole ;

- sapore: fresco asciutto ;
- titolo alcolometrico volumico totale minimo: 9,5% vol.;
- acidità totale minima: 3,50 g/l;
- estratto non riduttore minimo: 12,0 g/l

"Marche" bianco Spumante di qualità di tipo aromatico

- colore: giallo paglierino più o meno intenso ;
- odore: caratteristico fragrante ;
- sapore: intenso e aromatico ;
- titolo alcolometrico volumico totale minimo: 9,5% vol.;
- acidità totale minima: 3,50 g/l;
- estratto non riduttore minimo: 12,0 g/l.

"Marche" bianco Frizzante

- colore: giallo paglierino tenue ;
- odore: delicato e floreale ;
- sapore: fresco e armonico ;
- titolo alcolometrico volumico totale minimo: 9,5% Vol.;
- acidità totale minima: 3,50 g/l;
- estratto non riduttore minimo: 13,0 g/l.

"Marche" bianco Novello:

- colore: bianco più o meno intenso;
- odore: delicato e floreale;
- sapore: intenso e avvolgente ;
- titolo alcolometrico volumico totale minimo: 11% Vol.;

- acidità totale minima: 3,50 g/l;
 - estratto non riduttore minimo: 13,0 g/l.
- ✓ I vini ad indicazione geografica tipica "Marche" con la specificazione del vitigno devono assicurare i seguenti titoli alcolometrici volumici totali minimi:
- Malvasia bianca di Candia B 10.50
- ✓ Per tali vini è ammesso un titolo alcolometrico totale non superiore a 15% Vol.;
- ✓ Mosto di uve parzialmente fermentato:
- "Marche" bianco 9,50% vol;
- ✓ di cui un titolo alcolometrico effettivo minimo superiore ad 1% Vol. ed inferiore ai 3/5 del titolo alcolometrico volumico totale;
- ✓ Vino ottenuto da uve appassite:
- "Marche", bianco, rosso e rosato, non inferiore a 16,00% Vol., di cui un titolo alcolometrico effettivo non inferiore a 9% Vol.
- ✓ Vino di uve stramature:
- "Marche", bianco, rosso e rosato, superiore a 15% Vol. ed un titolo alcolometrico volumico effettivo non inferiore a 12% Vol.
- ✓ Alla indicazione geografica tipica "Marche" è vietata l'aggiunta di qualsiasi qualificazione diversa da quelle previste nel presente disciplinare di produzione, ivi compresi gli aggettivi extra, fine, scelto, selezionato, superiore e similari. È tuttavia consentito l'uso di indicazioni che facciano riferimento a nomi, ragioni sociali e marchi privati purché non abbiano significato laudativo e non siano tali da creare confusione o trarre in inganno il consumatore.
- ✓ Riferimenti alla struttura di controllo:
- Nome e indirizzo: Valoritalia società per la certificazione delle qualità e delle produzioni vitivinicole italiane S.r.l. Via Piave, 24 – 00187 Roma

3. Studi sulla fermentazione spontanea di uve Malvasia

3.1 La fermentazione spontanea dei mosti

La trasformazione del mosto in vino è principalmente un processo fermentativo condotto dai lieviti. L'attività metabolica delle diverse specie e ceppi di lievito presenti, e in grado di resistere alle condizioni di vinificazione, influenza la qualità sensoriale e le caratteristiche organolettiche del vino finale ottenuto (Raspor et al., 2006). Per questo le fermentazioni avvengono generalmente mediante inoculo di lieviti secchi attivi (LSA), per evitare picchi di fermentazione e assicurare omogeneità al prodotto finale.

Tuttavia, numerosi studi supportano l'ipotesi che i lieviti secchi attivi (LSA) riducendo la variabilità dei ceppi che compaiono nella fermentazione spontanea, verosimilmente riducano la complessità del vino risultante (Beltran et al., 2002). Per questi motivi, i viticoltori che cercano sapori originali preferiscono l'utilizzo di fermentazione spontanea con lieviti indigeni. La questione dell'origine dei lieviti indigeni è di una certa importanza perché questo potrebbe influenzare le pratiche culturali e/o enologiche dei produttori di vino. Diverse ricerche concordano sul fatto che i lieviti apiculati siano le specie predominanti sulla superficie delle bacche di uva. Infatti, le specie di apiculati *Hanseniaspora uvarum* (e la sua forma anamorfica *Kloeckera anamorpha* o *K. apiculata*) rappresentano il 50-75% della popolazione totale di lieviti isolati dall'uva, mentre altri generi di lievito sono presenti in percentuali inferiori. Inoltre, *S. cerevisiae* risulta in genere, molto raro sull' uva e nel vigneto (Martini, 1993; Pretorius, 2000; Sabate et al., 2002), anche se è stato ritrovato su bacche danneggiate (Mortimer e Polsinelli, 1999). Al contrario, questa specie può essere ritrovata a colonizzare interamente la superficie delle attrezzature di cantina (Sabate et al., 2002; Beltran et al., 2002). È stato poi dimostrato che i diversi ceppi di *S. cerevisiae* sono correlati all'area vinicola e che essi vengono incorporati nel mosto durante il trattamento meccanico dell'uva e il processo di fermentazione (Beltran et al., 2002; Sabate et al., 2002; Raspor et al., 2006). Alcuni ceppi

commerciali o indigeni sono stati ritrovati in cantina per più anni e per questo vengono definiti ceppi residenti (Beltran et al., 2002).

Le interazioni microbiche tra ceppi selezionati di lieviti *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyces* possono dare effetti positivi alla fermentazione alcolica (Wang et al., 2015). *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Starmerella bacillaris* (precedentemente classificata come *Candida zemplinina* e *Candida stellata*), *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans* (precedentemente classificata come *Kluyveromyces thermotolerans*) e *Torulaspora delbrueckii* sono i principali lieviti indigeni del vigneto.

La maggior parte delle specie di lieviti non-*Saccharomyces* provenienti da ambienti legati al vino hanno un potenziale di fermentazione limitato, come un basso potere alcoligeno e bassa velocità di fermentazione, nonché ridotta resistenza all'SO₂. Inoltre, la produzione di acido acetico, acetato di etile, acetaldeide e acetoina ad alte concentrazioni generalmente impedisce l'uso di questi ceppi come colture di partenza sia nell'industria del vino che della birra. Tuttavia, nell'ultimo decennio, molti studi hanno rivalutato il coinvolgimento dei lieviti non-*Saccharomyces* durante la fermentazione alcolica e il loro ruolo sulla complessità dell'aroma del prodotto finale.

Durante la fermentazione spontanea del succo d'uva, si verifica una successione sequenziale di lieviti. Inizialmente, le specie di *Hanseniaspora* (forma teleomorfa di *Kloeckera*), *Starmerella*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus* si trovano in mosto fresco. Di queste, le specie di lievito più comuni, presenti in più alto numero sono *H. uvarum* e *guilliermondii* e di conseguenza sono stati sviluppati numerosi studi nell'ultimo decennio volti a valutare gli effetti dei ceppi di apiculati sulla qualità del prodotto finale di fermentazione (Comi et al., 2001).

Nel mosto d'uva, *H. uvarum* e *H. guilliermondii* sono stati trovati ad alta densità cellulare, fino a 10⁶-10⁸ cellule/mL, durante i primi 4-6 giorni di fermentazione, fino a un livello di etanolo

di circa il 4% –7% v/v (Zott et al., 2008). I lieviti apiculati sono diventati oggetto di crescente interesse, poiché la loro proliferazione in competizione con *S. cerevisiae* può influire sulla qualità sensoriale del vino, anche a causa della maggiore produzione di esteri (Viana et al., 2009).

A causa della sua elevata diffusione sulle uve da vino e all'inizio della fermentazione vinaria, è stata studiata l'influenza di *H. guilliermondii* sugli aromi del vino (Moreira et al., 2005). Rojas et al. (2003), hanno mostrato che un ceppo selezionato di *H. guilliermondii* promuove l'esterificazione di una varietà di alcoli come etanolo, alcoli isoamilici, geraniolo e 2-feniletanolo. Diversi autori hanno suggerito che la presenza di lieviti apiculati durante la fermentazione abbia contribuito positivamente a un aroma più complesso del vino a causa dell'alta produzione di composti aromatici (Ciani e Maccarelli, 1998). Queste proprietà enologiche sono risultate dipendenti dal ceppo e, in particolare, diversi ceppi di *H. uvarum* di origine enologica hanno mostrato attività β -d-glucosidasi (Rodríguez et al., 2007) e β -d-xilosidasi. Entrambe queste glicosidasi sono importanti per il rilascio enzimatico di composti aromatici di origine varietale nella vinificazione.

Man mano che la fermentazione procede, le specie non-*Saccharomyces* vengono sovrastate per pressione selettiva, lasciando *Saccharomyces cerevisiae* a dominare e completare la fermentazione (Romano et al. 1997 a). Questo fatto è il risultato di una selezione naturale durante la fermentazione spontanea, in cui diversi ceppi di *S. cerevisiae* si sostituiscono a vicenda lungo il processo di fermentazione (Querol et al. 1994). La composizione e il numero di lieviti indigeni sulle bacche di uva sono influenzati da diversi fattori, come la varietà dell'uva, la fase di maturazione e il tempo di raccolta, le condizioni meteorologiche, la posizione geografica, eventuali danni fisici dell'uva e l'intensità dei trattamenti con fungicidi e pesticidi (Beltran et al., 2002).

Per la determinazione dei diversi ceppi di una specie, agenti in una stessa fermentazione, vengono utilizzate diverse tecniche di biologia molecolare, in particolare queste tecniche

hanno dimostrato di essere molto utili per identificare specie e ceppi di *Saccharomyces*, consentendo un'analisi più accurata della popolazione indigena presente nelle fermentazioni spontanee. Inoltre, queste tecniche consentono di monitorare la prevalenza dei ceppi di lievito commerciali nelle fermentazioni guidate (Fernández-Espinar et al. 2001).

L'uso di metodi di biologia molecolare consente la rapida e precisa identificazione di specie e ceppo dei lieviti. Questi metodi includono: studio del cariotipo mediante elettroforesi in campo elettrico pulsato (Povhe Jemec et al., 2001), analisi del polimorfismo di restrizione (restricted fragment length polymorphism- RFLP) sul DNA mitocondriale (Lopes et al., 2002; Beltran et al., 2002) o sui geni ribosomiali (Sabate et al., 2002). In alternativa, analisi PCR del gene che codifica per la regione ITS (Inter-spacial sequence) del rRNA di *S. cerevisiae* (Granchi et al., 1999) o sequenze δ (Lopes et al., 2002).

3.2 Ricerche sul microbiota spontaneo di mosti Malvasia

Gli studi sul microbiota spontaneo presente in mosti di Malvasia sono piuttosto rari; tra questi, lo studio effettuato da K. Povhe Jemec et al. (2001) ha esaminato l'evoluzione della popolazione di lieviti nel corso di 25 gg di fermentazione spontanea di mosto Malvasia. Le analisi sono state condotte subito dopo la chiarificazione del mosto (fase pre-fermentativa) e, successivamente, dopo distribuzione del mosto in 5 fermentatori (A1-A5) da 10 L, durante il processo di fermentazione vero e proprio, in corrispondenza del 20, 40 e 90% di consumo degli zuccheri. In base alle analisi molecolari, tra 649 isolati sono stati distinti 46 diversi cariotipi di *Saccharomyces cerevisiae*. I cariotipi più abbondanti erano L1, L4, L12, P6.

Il conteggio totale di lieviti in Malvasia nella fase pre-fermentativa era di 10^5 CFU/ml. Le specie di lievito predominanti nel mosto appena ottenuto erano: *Candida stellata*, per il 68,4%, seguita da *Hanseniaspora uvarum* e *Metschnikowia pulcherrima*, rispettivamente per il 16% e il 10%. La distribuzione di altre specie di lievito era inferiore al 3%: *Issatchenkia terricola*

(2,7%), *Candida valida* (1,5%), *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (0,8%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (0,8%).

Durante la fermentazione, i lieviti sono stati isolati e identificati in 3 fasi: fase I (fermentazione tumultuosa); fase II o fermentazione tardiva (in cui l'attività fermentativa decresceva); fase III (fine fermentazione). La quantità di lieviti non-*Saccharomyces* variava nell'ambito dei cinque fermentatori presi in esame. Nei fermentatori A1, A2, A4 e A5 i lieviti non-*Saccharomyces* erano presenti nelle fasi I e II, mentre nel fermentatore A3 i lieviti non-*Saccharomyces* si individuavano solo nella fase II. Nell'ultima fase di fermentazione (III) sono stati trovati lieviti solo della specie *S. cerevisiae*, in tutti fermentatori.

Nel fermentatore A1 i lieviti non-*Saccharomyces* sono stati identificati come *H. uvarum* (cariotipo h1, 3,8%, fase II) e *C. stellata* (cariotipo c2 2,4%, fase III). Anche nel fermentatore A2, nella fase I, erano presenti le specie *H. uvarum* (cariotipo h1, 1,9%) e *C. stellata*.

Nella fase II e III del Fermentatore A2, la quantità dei non-*Saccharomyces* erano maggiori (5,7 e 3,8% rispettivamente), rispetto al Fermentatore A1. Nella fase II, erano presenti la specie *H. uvarum* (cariotipo h1, 1,9%) e *C. stellata* (cariotipo c2, 3,8%). Questo cariotipo era l'unico rilevato nella fase III.

La dinamica di popolazione dei non-*Saccharomyces* nel fermentatore A3 è risultata differente rispetto agli altri fermentatori, dove, nella fase II sono stati individuati solo lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae*. La presenza di *C. stellata* (cariotipo c2, 8,5%) era evidenziata nella fase III, dove il cariotipo c2 di *C. stellata* risultava il ceppo più rappresentato, risultando, dopo il ceppo L1 di *S. cerevisiae*, il secondo cariotipo di lievito più abbondante. La seconda fase della fermentazione nel fermentatore A4 era caratterizzata dall'11,7% dei lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti alle specie *C. stellata* (cariotipo c2) e *H. uvarum* (cariotipo h1), rispettivamente pari a 10% e 1,6%. Nella fase III, è stato osservato il declino dei lieviti non-*Saccharomyces* (4,1%), con i ceppi di *C. stellata* (cariotipi c2 e c3, entrambi al 2,05%). I cariotipi c2 di *C. stellata* sono stati rilevati anche nella fase II (3,1%) e III (3%) nel

fermentatore A5. Nella fase III, oltre a c2, sono stati rilevati anche i cariotipi c1 di *C. stellata* (1,5%) e h1 di *H. uvarum* (1,5%).

Tra le 674 colonie isolate dalle fasi I, II e III, nelle cinque fermentazioni condotte simultaneamente e indipendentemente a partire dallo stesso lotto di mosto Malvasia, 649 colonie sono state identificate come *S. cerevisiae*. Quarantasei diversi cariotipi sono stati evidenziati fra i 649 isolati di *S.cerevisiae*, a fronte dei 4 cariotipi individuati per i 25 isolati di non-Saccharomyces. I cariotipi L1, L4 e L12 rappresentavano la maggior parte della popolazione di lieviti (67%), alla fine del processo di fermentazione, mentre i cariotipi più frequenti, individuati in quasi tutti i fermentatori erano L1, L4, L12 e c2 (Tabella 1).

	Distribuzione in %	Fase I		Fase II		Fase III	
A1	1°	L ₄	26,9%	L ₄	19%	L ₁	25%
	2°	L ₁	15,1%	L ₁	14,2%	L ₁₂	12,5%
	3°	L ₁₂	11,5%	L ₁₂	11,9%	L ₄	7,5%
	Altri	11	46,2%	11	54,8%	11	55%
	Totale	14	100%	14	100%	14	100%
A2	1°	L ₁	26,9%	L ₄	26,9%	L ₁₅	26,3%
	2°	L ₁₂	13,2%	L ₁₂	19,2%	L ₄	15,8%
	3°	L ₃	9,4%	P ₆	15,4%	L ₃ ,L ₁	15,8%
	Altri	17	50,5%	9	38,5%	12	42,1%
	Totale	20	100%	12	100%	16	100%
A3	1°	L ₄	21,4%	L ₁	27,7%	L ₁	16,7%
	2°	L ₁	19,6%	L ₄	10,6%	P ₆	11,9%
	3°	L ₁₂	14,3%	c ₂	8,5%	L ₄ ,L ₁₂	7,1%
	Altri	16	44,7%	14	53,2%	16	57,2%
	Totale	19	100%	17	100%	20	100%
A4	1°	L ₄	21,7%	L ₁	18,4%	L ₁	26,1%
	2°	L ₁	18,3%	L ₄	14,3%	L ₁₂	21,7%
	3°	c ₂	10%	L ₁₂	12,2%	L ₄ ,L ₆	13%
	Altri	17	51%	17	55,1%	5	39,2%
	Totale	20	100%	20	100%	9	100%
A5	1°	L ₁	21,9%	L ₁	25,4%	L ₁	27,8%
	2°	L ₄	17,2%	L ₄	14,9%	L ₁₂	22,2%
	3°	L ₁₂	10,9%	L ₁₂	14,9%	L ₄	16,7%
	Altri	16	50%	14	44,8%	9	33,3%
	Totale	19	100%	17	100%	12	100%

Tabella 1. Percentuali e distribuzione dei cariotipi di lievito più frequenti, nelle popolazioni di lieviti, nel corso delle cinque fermentazioni spontanee di Malvasia (provenienti dallo stesso lotto)

Questo studio su mosto di Malvasia, ha confermato quanto generalmente noto per le fermentazioni spontanee, nelle quali, nelle prime fasi della fermentazione i lieviti maggiormente rappresentati sono i non-*Saccharomyces*. Infatti, i lieviti non-*Saccharomyces* crescono bene durante le prime fasi della fermentazione, quando la concentrazione di etanolo è ancora bassa, ma in seguito vengono sostituiti da ceppi della specie *Saccharomyces cerevisiae*, che mostra un migliore adattamento alle condizioni di vinificazione essendo più tollerante all'etanolo e più competitivo per crescere in un mezzo con alta concentrazione di zuccheri, come descritto anche da Sabate et al., (2002). Come normalmente avviene nelle fermentazioni spontanee (e talvolta anche in quelle guidate, con uso di starter commerciali), all'interno della popolazione di *S.cerevisiae* è stato tuttavia riscontrato un elevato grado di biodiversità intraspecifica, con la presenza di un numero elevato di cariotipi diversi.

Una ricerca più recente, relativa alla determinazione della popolazione microbica di fermentazioni spontanee su mosti Malvasia, è quella di Berradre et al. (2012), in cui il mosto della varietà Malvasia è stato ottenuto presso il Centro de Desarrollo Vitícola Tropical, di Zulia (Venezuela).

Il mosto d'uva è stato fatto fermentare a una temperatura costante di 17 ° C per 26 giorni; campioni in triplicato sono stati raccolti ogni due giorni dall'inizio alla fine della fermentazione (per un totale di 14 campioni). La fermentazione, sebbene non inocolata, presentava una elevata popolazioni di lieviti (superiori a 10⁶/mL), all'interno della quale sono stati identificati.

H. uvarum, *H. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae*.

Dei 134 isolati, la specie *S. cerevisiae* mostrava la frequenza di isolamento più elevata, con il 75% del totale degli isolati. Le altre specie isolate, rappresentative del genere *Hanseniaspora*, sono quelle con maggiore frequenza di isolamento (con il 4% appartenente alla specie *H. uvarum* e il 20% a *H. guilliermondii*). Infine, la specie con minore frequenza di isolamento era *R. mucilaginosa* (1%), con un totale di sei isolati. Durante i primi 4 giorni di fermentazione, il mosto di Malvasia presentava la più alta diversità di lieviti non-*Saccharomyces*. Due specie di

lieviti *H. uvarum* (96%) e *R. mucilaginosa* (4%) erano presenti dal giorno zero della fermentazione, cioè nel mosto fresco. E' noto infatti che queste specie sono ben rappresentate sulla buccia dell'uva. Questi risultati concordano con le ricerche condotte sui mosti nelle fermentazioni spontanee di diverse varietà di uve da vinificazione (Fernández et al., 1999; Povhe et al., 2001; Beltran et al., 2002; Zott et al., 2008; Chavan et al., 2009, Domizio et al., 2009).

Durante il secondo giorno di fermentazione coesistevano nel mosto le specie *H. guilliermondii* (50%), *H. uvarum* (25%) e *R. mucilaginosa* (25%). Ma dopo il 4° giorno di fermentazione *H. guilliermondii* risultava predominante (73%), riducendosi per contro la presenza di *H. uvarum* (14%), ed osservandosi per la prima volta la presenza di *S. cerevisiae* (13%). Tra 6 e 12 giorni di fermentazione, si osservava una riduzione della popolazione dei lieviti della specie *H. guilliermondii* (25%) mentre la specie *S. cerevisiae* aumentava (75%). Allo stesso modo, tra i giorni 14 e 16, la specie *H. guilliermondii* si riduceva ulteriormente (15%), mentre la popolazione di *S. cerevisiae* continuava ad aumentare (85%), fino ad arrivare ad una completa dominanza, al 18° giorno, fino alla fine della fermentazione.

La cinetica di lieviti durante il processo di fermentazione spontanea (Figura 1) evidenziava la presenza di diverse specie durante i primi quattro giorni di fermentazione:

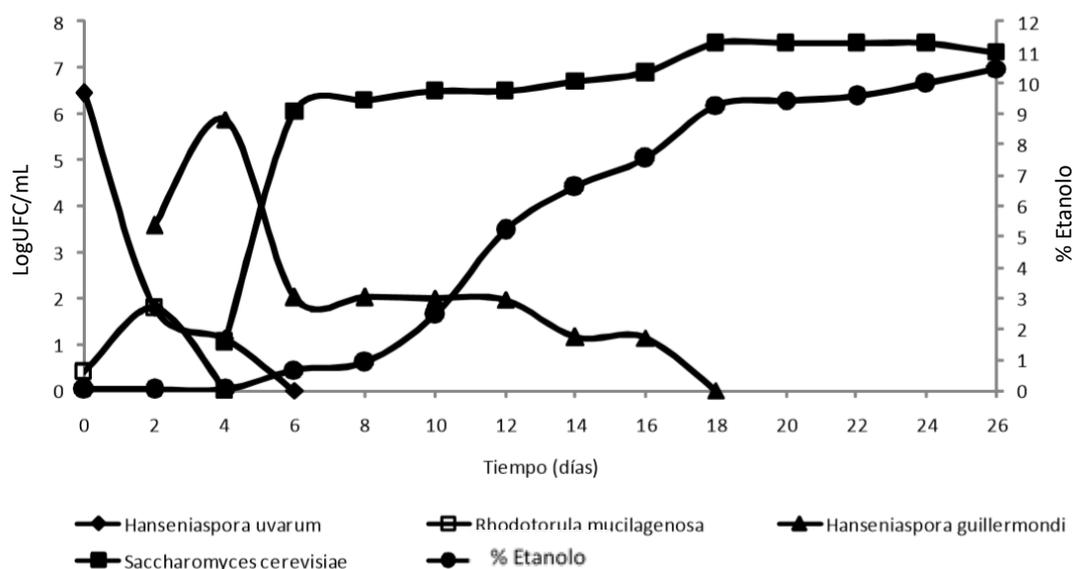


Figura 1 Biodiversità dei lieviti durante la fermentazione spontanea di mosto Malvasia

Le popolazioni di *R. mucilagenosa* che erano molto basse (intorno a 10^2 UFC/mL), vanno incontro ad una rapida scomparsa, in quanto questi lieviti sono prevalentemente ossidativi ed anche sensibili al basso pH del mosto. L'apparizione di questi lieviti durante i primi giorni di fermentazione potrebbe essere dovuta al fatto che questa specie è un abituale inquinante ambientale, ma il suo effetto in condizioni enologiche non è rilevante. L'andamento della popolazione di *Hanseniaspora* ha mostrato una rapida diminuzione, seguita dalla scomparsa della specie durante la prima settimana di fermentazione. In particolare, *Hanseniaspora guilliermondii* (una delle specie di lieviti che proliferava da 10^3 UFC/mL a 10^6 UFC/mL durante i primi 4 giorni, mostrava una forte diminuzione dopo il 6° giorno (in corrispondenza di una concentrazione di etanolo di circa 1%)

Questa specie, quindi, in grado di dominare completamente la fermentazione alcolica nelle primissime fasi, scompare poi totalmente, in accordo con quanto osservato nelle ricerche condotte da Povhe *et al.* (2001); Beltran *et al.* (2002); Zott *et al.* (2008) e Chavan *et al.* (2009).

Sebbene in generale, diversi studi e diversi ricercatori abbiano dimostrato che tra i lieviti che compaiono nelle prime fasi della fermentazione vi è sempre un'elevata presenza di *H. uvarum*, in questa ricerca è stata dimostrata un'elevata presenza di altre specie dello stesso genere, in particolare *H. guilliermondii*. Queste due specie, peraltro sono molto vicine, come appare sulla base dei risultati ottenuti sia con metodi di identificazione fisiologica, sia con metodi molecolari (Esteve-Zaroso et al., 2001).

Per quanto riguarda gli isolati di *S. cerevisiae*, nel medesimo studio (Berradre et al. 2012), è stata condotta una ulteriore indagine, riguardante il riconoscimento dei diversi ceppi di *S. cerevisiae* presenti nel corso della fermentazione. Questa indagine è stata condotta, attraverso l'analisi del DNA mitocondriale con l'enzima di restrizione *Hinf I*. L'analisi è stata applicata a tutte le colture identificate come *S. cerevisiae*, isolate nelle diverse fasi della fermentazione: all'inizio (giorno 4), nella fase centrale (giorno 16) e alla fine (giorni 22 e 24) della fermentazione.

Normalmente, nel corso di fermentazioni spontanee è stato sempre dimostrato un elevato grado di diversità all'interno della specie *S. cerevisiae*. Ad esempio, Querol et al. (1992) hanno descritto un'alta varietà di ceppi di questa specie durante tutto il processo di fermentazione spontanea, anche nelle fasi finali. Al contrario, il lavoro di Berradre e colleghi ha sorprendentemente evidenziato che lo stesso ceppo, presente all'inizio della fermentazione, è stato in grado di condurre la fermentazione, fino ad esaurimento degli zuccheri.

Un altro studio effettuato da Agnolucci et al. (2007), ha preso in esame le differenze genotipiche e fenotipiche dei lieviti autoctoni appartenenti al genere *Saccharomyces*, nel corso della fermentazione spontanea di un uvaggio composto da "Malvasia delle Lipari" (92 %) e Corinto Nero (8%), nell'isola di Salina.

Il lavoro ha prodotto 192 isolati di lievito, di cui 51 sono stati caratterizzati mediante identificazione, attraverso analisi PCR della regione 5,8S-ITS, seguita da analisi del polimorfismo di restrizione (RFLP) con HaeIII and HpaII.

La biotipizzazione (differenziazione dei ceppi all'interno della specie) è stata eseguita attraverso analisi di restrizione del DNA mitocondriale (mtDNA) con endonucleasi RsaI.

Queste analisi hanno permesso di identificare 51 isolati: 37 sono stati ascritti alla specie *S. cerevisiae* e i rimanenti 14 alla specie *S. bayanus* o *S. pastorianus* (non essendo stata possibile una ulteriore discriminazione tra queste due specie).

S. bayanus è un lievito più osmotollerante associato alla vinificazione di mosti contenenti alte concentrazioni di zuccheri, che spesso sovrastano *S. cerevisiae* entro la fine della fermentazione (Sipiczki 2003). La presenza di lievito osmotollerante in "Malvasia delle Lipari" è verosimile in questi mosti che hanno un alto contenuto di zucchero, caratteristica tipica di questo vino dolce da dessert. L'analisi di restrizione del DNA mitocondriale ha permesso di rilevare la presenza di 12 diversi ceppi (10 all'interno di *S. cerevisiae* e 2 all'interno di *S. bayanus* e *S. pastorianus*). Questi risultati evidenziavano un elevato grado di variabilità, pari al 23% (percentuale di diversi ceppi rispetto al numero di colonie analizzate). Nel loro insieme, i risultati di questo studio sono in accordo con quelli precedentemente descritti in altre regioni d'Italia (Comi et al. 2001) dove è stata trovata una biodiversità simile per le diverse aree di produzione del vino. Quindi ogni ceppo di lievito potrebbe avere caratteri distintivi di importanza tecnologica che influenzano il corso della fermentazione e caratteri di qualità che potrebbero influenzare positivamente o negativamente la composizione chimica e la qualità del vino (Zambonelli 1998). Per quanto riguarda i tratti qualitativi, i diversi biotipi hanno mostrato differente vigore fermentativo, diversa capacità di produrre idrogeno solforato e differente attitudine-killer. Nessuno dei biotipi è risultato in grado di produrre l'enzima β -glucosidasi, mentre tutti mostravano attività proteolitica. Questo risultato è in accordo con i precedenti risultati secondo cui i non-*Saccharomyces* sono alto-produttori di β -glucosidasi,

mentre la maggior parte dei *Saccharomyces* mostra attività proteolitica (Rosi et al. 1994). Con questo studio Agnolucci e colleghi (2007), hanno evidenziato che è possibile raggruppare in gruppi diversi (cluster), i biotipi indigeni di *S. cerevisiae* di "Malvasia delle Lipari" sulla base dei loro profili molecolari. La conservazione della tipicità di questo vino potrebbe trarre vantaggio da queste conoscenze che potrebbero anche contribuire a chiarire le peculiarità enologiche del biota indigeno del mosto in studio.

4. Studio delle caratteristiche aromatiche della Malvasia

4.1 Caratteristiche sensoriali dei vini e contributo dei lieviti

Aromi di fermentazione

I composti volatili responsabili delle caratteristiche aromatiche del vino sono numerosi e di diversa natura. Molti di essi, quelli quantitativamente più importanti, si originano nel corso della fermentazione alcolica e vengono pertanto generalmente definiti aromi di fermentazione. Durante la fermentazione alcolica, i lieviti non solo sono responsabili della trasformazione degli zuccheri in etanolo ed anidride carbonica, ma producono numerosi componenti volatili minori, ma importanti dal punto di vista sensoriale, che incidono fortemente sulle proprietà sensoriali del vino. È stato peraltro evidenziato che la gradazione alcolica nel vino è strettamente correlata alla percezione di sensazioni di pungenza, astringenza, amarezza, aroma fruttato e profondità in bocca (Meillon et al., 2009).

Tra i prodotti dei lieviti che incidono sulle caratteristiche sensoriali del vino, vanno considerati gli **alcoli superiori** (classificati in alifatici ed aromatici). Gli alcoli alifatici comprendono 1-propanolo, 2-metil-1-propanolo (isobutanolo), 2 e 3-metil-1-butanolo (alcoli isoamilici). Gli alcoli aromatici consistono nel 2-feniletanolo e tirosolo. Generalmente il livello di alcoli superiori è correlato negativamente alla qualità del vino; vari autori riportano che livelli di concentrazione superiori ai 300-400 ppm nel vino ne potrebbero diminuire drasticamente la qualità (Ribéreau-Gayon, 1978) apportando un odore ed un gusto pungente e/o vinoso, tuttavia livelli di concentrazione < 300 ppm, possono contribuire anche in maniera positiva all'aroma del vino con note fruttate (Swiegers e Pretorius 2005). L'isobutanolo, gli alcoli isoamilici, il tirosolo ed il 2-fenietanolo si originano, nella cellula del lievito mediante la via di Ehrlich, attraverso una deaminazione seguita da una decarbossilazione e successiva riduzione degli aminoacidi valina, leucina, isoleucina, tirosina e fenilalanina. In presenza di sostanze azotate facilmente assimilabili (sali d'ammonio, acido aspartico, acido glutammico) o di un giusto

equilibrio tra aminoacidi, la produzione di alcoli superiori non è favorita, mentre essa risulta promossa da particolari condizioni, quali elevata torbidità del mosto, elevata temperatura del mosto, aerazione del mosto e presenza di una fonte amminoacidica come principale sorgente di azoto (Flanzy, 1998).

Dal punto di vista sensoriale gli alcoli isoamilici ed il 2-metil-1-propanolo hanno un odore sgradevole definito alcolico e/o di cimice schiacciata e/o formaggio, viceversa il 2-feniletanolo è caratterizzato da un gradevole odore di rosa e può, quindi, contribuire positivamente all'aroma del vino (Ferreira et al., 2002a).

I lieviti possono formare anche **acidi grassi a media catena** mediante due diverse vie:

- ossidazione delle aldeidi;
- idrolisi dell'Acil-S-CoA, proveniente dal metabolismo dei lipidi, con formazione di acido butanoico, esanoico, ottanoico ecc.

Gli acidi grassi, anche se apportano note sgradevoli descritte come formaggio e/o rancido (Ferreira et al., 2002a), sono correlati positivamente alla qualità dei vini (Bertuccioli et al., 1983), in quanto vengono prodotti in quantità maggiori in vini di qualità, simultaneamente agli esteri etilici (la cui produzione è correlata a quella degli acidi stessi). Infatti, per esterificazione tra alcol etilico e gli acidi carbossilici presenti sotto forma di Acil-S-CoA, si formano i principali esteri del vino (butanoato, esanoato, ottanoato, decanoato di etile) caratterizzati da un aroma genericamente definito come fruttato (Etievant, 1991). Dall'esterificazione tra alcoli isoamilici (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e l'acetil-CoA ha, invece, origine l'acetato di isoamile (2-metilbutil acetato e 3-metilbutil acetato) responsabile dell'odore di banana mentre etanolo e acetil-CoA ha origine l'acetato di etile.

La presenza nel vino di tali composti è auspicabile, in quanto conferiscono al vino odori di frutta fresca e di frutta esotica, ad eccezione dell'acetato di etile che quando supera la concentrazione di 100 mg/L in vino risulta avere un odore sgradevole (Ribéreau-Gayon, 1978). Il livello di questi componenti odorosi nel vino è influenzato dalle modalità di conduzione

della fermentazione alcolica. Il ceppo di lievito, la carenza di amminoacidi, l'elevato livello di ioni ammonio, la temperatura di fermentazione, le condizioni di anaerobiosi durante la fermentazione ed il pH del mosto sono alcuni dei principali fattori che impattano sulla produzione dei prodotti secondari di fermentazione nel vino.

In particolare, è stato evidenziato che significativi aumenti delle concentrazioni di composti come etil-lattato, 2,3-butandiolo, 2-feniletanolo e 2-feniletil-acetato possono essere ottenuti quando i lieviti non-Saccharomyces partecipano al processo di fermentazione (Viana et al., 2009).

Aromi varietali

Le caratteristiche aromatiche dei vini e la loro specificità sensoriale sono spesso fortemente dipendenti da componenti volatili di altra origine, talvolta meno importanti da un punto di vista quantitativo rispetto agli aromi fermentativi, ma comunque in grado di contribuire in maniera determinante all'aroma del prodotto finito (Etievant, 1991). Molte di tali sostanze odorose derivano dall'uva e sono generalmente presenti nel vino in concentrazioni molto basse. Tuttavia, possono influenzarne in maniera considerevole le caratteristiche olfattive. Esse costituiscono la componente aromatica del vino che viene più direttamente influenzata dalla varietà di uva impiegata per la vinificazione e vengono quindi generalmente definite «varietali».

Terpenoidi, C13-norisoprenoidi, benzenoidi, alcoli alifatici, esteri, metossipirazine e composti contenenti zolfo sono le principali classi di sostanze volatili identificate nell'uva (Robinson et al., 2014). Molti di questi composti sono presenti nelle uve nelle loro forme libere e glicosilate, in proporzioni relative variabili a seconda della cultivar (González-Barreiro et al., 2015). I glicosidi sono considerati un potenziale aromatico, poiché sono in grado di rilasciare gli agliconi volatili attraverso l'idrolisi enzimatica o acida (Loscos et al., 2009).

Tra i terpeni, i monoterpenoli (linalolo, nerolo, geraniolo, α -terpineolo e citronellolo) sono i più attivi, dal punto di vista olfattivo, a causa della loro bassa soglia sensoriale.

Ad esempio, il linalolo ha una soglia sensoriale di 100 µg/L, mentre quella del nerolo e dell' α -terpineolo è da tre a quattro volte superiore (P. Ribereau-Gayon et al., 1978). Tuttavia, la maggior parte dei terpenoli presenti nell'uva si trova in forme glicosidicamente legate che sono quasi inodori. È noto da tempo che i composti terpenici contribuiscono principalmente al profilo aromatico varietale (Ribéreau-Gayon et al., 1978; Gunata et al., 1985). In effetti, le varietà di vite aromatiche e non aromatiche possono essere distinte sulla base della loro concentrazione totale di monoterpeni liberi. Una diversa classificazione delle varietà aromatiche può essere effettuata in base alla prevalenza di linalolo e suoi derivati o geraniolo e suoi derivati (Di Stefano, 2013).

La caratteristica di particolare terpeni, norisoprenoidi e composti solforati di essere presenti in larga parte sotto forma di precursori non odorosi e venir rilasciati nel corso della vinificazione e/o dell'invecchiamento del vino, comporta un aumento della complessità aromatica. Infatti, i composti varietali presenti sotto forma di precursori (in particolare terpeni e norisoprenoidi), vengono gradualmente rilasciati e possono quindi contribuire al profilo aromatico di insieme, determinando un aumento della complessità e della specificità aromatiche (Etievant, 1991).

Gli studi condotti da Rosi et al. (1995) per identificare la parte glicosidica di questi precursori di aroma, hanno dimostrato che è principalmente formata da 6-O- α -arabinofuranosil- β -D-glucopiranoside, 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranoside, 6-O- β -apiofuranosil- β -D-glucopiranoside e, in misura molto minore, β -D-glucopiranoside. La parte agliconica è costituita principalmente da monoterpenoli e alcol benzilico e 2-feniletilico. Studi precedenti hanno dimostrato che l'idrolisi dei di-glicosidi, con liberazione dei terpenoli aromatici avviene in due fasi sequenziali. Nella prima, agiscono enzimi diversi (α -L-arabinofuranosidasi, α -L-ramnopiranosidasi, β -D-apiosidasi) in grado di rompere il legame tra glucosio e zucchero terminale (ramnopiranosio, arabinofuranosio e apiofuranosio). Nel secondo passaggio, una β -glucosidasi agisce liberando l'aglicone volatile dal glucosio.

Le specie di non-*Saccharomyces* di solito mostrano una maggiore attività β -glucosidasi rispetto alle specie *Saccharomyces*.

Con il progredire dell'invecchiamento, il carattere aromatico del vino si modifica ulteriormente, passando a un aroma di natura principalmente fermentativa a uno più complesso, fortemente influenzato da componenti aromatiche varietali tipiche dell'uva di origine.

I terpeni sono i principali responsabili dell'aroma floreale del vino, particolarmente coinvolti nell'aroma dei vini Moscato, Malvasia e Gewurztraminer, del Tokay e dei vini Moscato invecchiati. I terpeni sono anche i principali responsabili del carattere floreale comune a molti vini bianchi giovani ottenuti da varietà neutre. All'interno di questa vasta classe di componenti volatili, gli alcoli monoterpenici sono quelli aventi il maggior impatto sensoriale. In particolare, linalolo e geraniolo sono caratterizzati da soglie di percezione notevolmente basse. Circa il 50 % dei monoterpeni totali si ritrova nella buccia dell'uva, tuttavia il geraniolo è associato principalmente alla buccia dell'acino d'uva mentre il linalolo è distribuito uniformemente anche nella polpa dell'acino (Wilson et al., 1986). Generalmente il contenuto in terpeni nell'uva aumenta nel corso della maturazione dell'acino fino al momento della completa maturazione per poi diminuire (Wilson et al., 1984; Gunata et al., 1985).

Generalmente i composti solforati, presenti nel vino a bassissime concentrazioni, sono responsabili di odori sgradevoli e sono dotati di soglie di percezione estremamente basse. In base alla loro struttura chimica è possibile distinguerli in cinque categorie: solfuri, polisolfuri, composti eterociclici, tioesteri e tioli. I tioli varietali sono stati scoperti da poco più di vent'anni (Darriet, 1995) e sono diventati uno degli argomenti di interesse più attuale perché, oltre alla loro presenza in forte quantità nei vini Sauvignon, possono contribuire ad alcune note aromatiche di molti altri vini.

Studi condotti sull'aroma varietale del vino Sauvignon Blanc, e successivamente in altri vini, hanno permesso di identificare molti composti solforati appartenenti alla famiglia dei

mercaptani (tioli e tioesteri). I principali composti di questo tipo, classificati tra gli aromi "varietali", in quanto già presenti sotto forma di precursori legati alla varietà delle uve, sono 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP), 3-mercaptoesanololo (3MH) e 3-mercaptoesanololo acetato (A3MH) (Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1998a; Lopez et al., 2003). L'aroma del 4-mercapto-4-metilpentanololo e del 3-mercaptoesanololo ricordano la nota di limone, pompelmo e frutto della passione; mentre l'odore del 3-mercapto-3-metilbutanololo è simile a quello del porro cotto. Il 3-mercaptoesilacetato ricorda l'aroma del frutto della passione, del bosso e della ginestra. Il 2-mercaptoetilacetato e 3-mercaptopropilacetato possono, invece, partecipare alla formazione dell'aroma tostato e grigliato spesso percepibile nel vino (Mestres et al., 2000). La percezione sensoriale del 4-mercapto-4-metilpentan-2-one è correlata alla sua concentrazione, infatti, può variare da quella di ribes nero, a basse concentrazioni, a quella di pipì di gatto, ad alte concentrazioni (Darriet et al., 1995). Questi composti solforati, anche se importanti nella definizione del carattere varietale di alcuni vini non sono ritrovati in mosto d'uva. Essi sono infatti presenti nelle uve sotto forma di precursori legati alla cisteina e/o al glutatione e la loro espressione sensoriale (ovvero la capacità di esprimere un aroma, una volta liberi) è legata all'azione del lievito (*Saccharomyces cerevisiae* o altre specie) dotate di attività β -lasiaca possedendo l'enzima capace di scindere il legame tra la molecola tiolica e la cisteina (o il glutatione) (Howell et al., 2004). Nel caso dell'acetato di 3-mercaptoesanololo il lievito è responsabile della sua produzione a partire dall'unione del 3-mercaptoesanololo con una molecola di acido acetico, come avviene per la produzione di tutti gli altri acetati durante la fermentazione alcolica. Il dimetil solfuro contribuisce, se a basse concentrazioni, all'aroma dei vini invecchiati con note di asparagi. Probabilmente la sua formazione avviene durante la maturazione del vino ad opera dei lieviti mediante la degradazione della S-metil-L-metionina ad omocisteina e dimetil solfuro. In generale tale formazione è comunque legata al metabolismo della cisteina o glutatione nei lieviti (Rauhut 1993).

4.2 Caratteristiche aromatiche varietali dei vini Malvasia

Uno degli aspetti più interessanti di molte varietà di Malvasia è l'espressione di composti aromatici. Proprio come la famiglia Moscato, le varietà Malvasia sono utilizzate in tutto il mondo per le loro peculiari caratteristiche sensoriali. In particolare, questi tipi di vini sono molto richiesti nei mercati asiatici e orientali, dove i vivai e la coltivazione della vite sono in forte sviluppo (G. Vasile Simone et al., 2017).

La Malvasia di Candia aromatica è una cultivar di vite (*Vitis vinifera* L.) (cv.) che produce uva bianca aromatica (Borsa et al., 2005), viene coltivata nelle province dell'Emilia-Romagna, tra cui Piacenza, Parma e Reggio Emilia, mentre in Lombardia è coltivato nell'area dell'Oltrepò Pavese. In letteratura ci sono studi specifici sulla Malvasia di Candia aromatica, focalizzati sulle caratteristiche del suolo (Zamboni et al., 2009) e sugli effetti della rimozione delle foglie sulla composizione della bacca (Bavaresco et al., 2008). Altri studi includono le prestazioni fenologiche e produttive della Malvasia (Giust et al., 2005), le caratteristiche morfologiche e biochimiche (Costacurta et al., 2005), i metaboliti secondari (Borsa et al., 2005) e l'inter-variabilità intra-varietale (Meneghetti et al., 2012). Uno studio sensoriale è stato condotto sui vini ottenuti dalla vendemmia tardiva della Malvasia di Candia aromatica coltivata in Toscana (Scalabrelli et al., 2008), mentre il profilo aromatico di mosto e vino Colli di Parma D.O.C. Malvasia, è stato studiato anche in relazione alla quantità di azoto assimilabile disponibile per i lieviti (Nicolini et al., 2009). In questo studio il profilo aromatico è risultato caratterizzato da una significativa presenza di linalolo libero (300 µg/L) e da una quantità importante di Ho-diolo I (1100 µg/L). I due dioli terpenici anche denominati dioli 1 e 2 (o I e II) sono il 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo e 3,7-dimetil-1,7-octadien-3,6-diolo per la prima volta individuati nelle uve Moscato (Rapp et al., 1979, 1980). L'utilità in termini sensoriali dell'Ho-diolo (I) è legata alla sua potenziale trasformazione durante l'invecchiamento in Ho-trienolo e ossido di nerolo (caratterizzati rispettivamente da un aroma tipo tiglio e resinoso-balsamico). Il geraniolo libero è attorno ai 40-60 µg/L; tra le forme legate si evidenzia la significativa

variabilità fra i diversi anni con riferimento al linalolo (mediane tra 80 e 220 $\mu\text{g/L}$), mentre l'elevatissimo contenuto di geraniolo (2000 $\mu\text{g/L}$) sembra essere più stabile tra le annate. Anche il nerolo è a livelli molto alti. Sono invece decisamente limitati i contenuti di Ho-diolo (I). In annate con vini dall'aromaticità limitata, geraniolo e nerolo legati possono costituire una interessante riserva di aroma che può essere liberata tecnologicamente mediante aggiunte mirate di enzimi ad attività β -glucosidasi (Nicolini et al., 1993).

La caratterizzazione dei composti volatili nel vino Malvasia di Candia aromatica è un primo approccio allo studio della complessità di questa cultivar aromatica e dell'evoluzione dell'aroma durante il processo di vinificazione. In generale, l'evoluzione dei composti aromatici totali segue una tendenza crescente, in accordo con l'avanzamento della fermentazione (Montevocchi et al., 2015). In particolare, in questo lavoro il profilo ricco e variegato della Malvasia di Candia è stato considerato paragonabile a quello di Muscat (Costacurta et al., 2005) in termini di intensità e bouquet. La sperimentazione è stata condotta su campioni di Malvasia di Candia aromatica, le cui uve erano state raccolte dai vigneti intorno a Reggio Emilia. Le uve sono state pigiate e diraspate e 80 mg/L di SO_2 è stata aggiunta al mosto con vinaccia e la miscela è stata divisa in 2 serbatoi diversi. È stato poi aggiunto un enzima pectolitico (EC 3.2.1.15, FCE G Vinozym®, Novozymes, Bordeaux, Francia), privo di attività glicosidasi secondaria e le masse sono state sottoposte a macerazione per circa 12 ore a 8 ° C. Quindi i mosti sono stati raccolti, drenati e le vinacce sono state pressate. I mosti ottenuti sono stati chiarificati con gelatina (0,03 g / L) e sol di silice (0,3 g / L). Dopo chiarificazione mediante centrifugazione, i mosti sono stati stoccati a 10 ° C senza ulteriori manipolazioni in modo da avviare una prima fermentazione spontanea. Durante gli 11 giorni seguenti, è stato effettuato un monitoraggio periodico e sono state misurate l'acidità totale (TA) e l'acidità volatile (VA), il volume di alcol (ABV) e il contenuto di zucchero. Quindi, i prodotti dei due serbatoi sono stati combinati e la fermentazione è continuata per circa un mese.

Successivamente, una volta raggiunto il 4% di volume di alcol (zuccheri riducenti circa 100 g/L), i lieviti sono stati rimossi mediante centrifugazione e il prodotto è stato travasato in autoclave per la seconda fermentazione (da 16 a 18 ° C). In questa fase sono stati aggiunti al prodotto: lieviti attivi selezionati (Zymaflore X5, Laffort Œnologie, Bordeaux, Francia) al fine di ottenere un vino frizzante dolce. In questo modo si evitava la fermentazione tumultuosa e, allo stesso tempo, si potevano sfruttare le buone proprietà del lievito. Inoltre, i lieviti selezionati garantiscono una fermentazione completa di tutti gli zuccheri. Una volta ottenuto circa il 7% in volume di alcol, i lieviti sono stati rimossi e dopo una chiarificazione finale, il prodotto è stato imbottigliato. Attraverso le opportune analisi gascromatografiche si è visto che la somma totale dei composti aromatici ha mostrato una tendenza crescente a seguito del processo di fermentazione. Gli alcoli superiori erano la classe di composti più abbondante e influivano notevolmente sull'andamento della somma totale. Altre classi di composti hanno mostrato un andamento meno regolare, in particolare durante la seconda fermentazione in autoclave, riflettendo quindi, la complessità dei fattori coinvolti nella formazione dell'aroma. I composti aromatici varietali (β -citronellolo, linalolo, ossidi di linalolo, nerolo e α -terpineolo) hanno mostrato una concentrazione totale compresa tra 0,88 e 1,62 mg / L. Come illustrato nel precedente paragrafo, questi monoterpeni sono già presenti nelle uve mature, ma provengono soprattutto dalla parziale idrolisi delle forme glicosilate (Gunata et al., 1986). In effetti, questi monoterpeni aumentano durante le prime fasi della prima fermentazione e diminuiscono leggermente durante la seconda fermentazione in autoclave. La frazione glicosilata (da 3 a 10 volte superiore alla frazione libera), in pratica funge da riserva di monoterpeni e altre frazioni aromatiche nel vino (D'Onofrio, 2011).

Il linalolo è un'eccezione perché la sua frazione libera è talvolta superiore a quella glicosilata nell'uva matura (Fenoll et al., 2009). Nei campioni analizzati, il nerolo aveva valori paragonabili al linalolo e le loro concentrazioni mostravano andamenti variabili. Alla fine del periodo di monitoraggio, entrambi hanno superato la soglia di percezione. È interessante

notare che per effetti additivi o sinergici, la soglia di percezione delle miscele di monoterpeni è inferiore alla soglia di ogni singolo componente (Ribéreau-Gayon et al., 1978). I terpeni possono essere sottoposti a trasformazione chimica durante la fermentazione, oppure possono essere assorbiti dalle pareti cellulari del lievito o semplicemente eliminati dallo sviluppo di CO₂ o durante processi tecnologici come la centrifugazione. Comunque, né β -citronellolo né α -terpineolo hanno superato la loro soglia di percezione alla fine del processo (Ribéreau-Gayon et al., 1978; Vilanova et al., 2010). Le concentrazioni dei singoli monoterpeni erano generalmente superiori a quelle trovate in letteratura per i vini e le uve correlate (Borsa et al., 2005), mentre le concentrazioni di linalolo e α -terpineolo erano paragonabili a quanto trovato da Muratore et al. (2007) nel vino Malvasia delle Lipari.

Gli alcoli con sei atomi di carbonio sono considerati sostanze di origine pre-fermentativa (fase di ammostamento), anche se sembra che possano anche essere coinvolti nel metabolismo dei lieviti. La loro importanza deriva dal loro profumo erbaceo. Tra questi, l'esanolo era il composto più abbondante (media 2,30 mg/L). I valori trovati per i campioni alla fine del periodo di monitoraggio erano paragonabili a quelli in letteratura (Muratore et al., 2007; Nicolini et al., 2009). Le loro concentrazioni hanno mostrato una leggera tendenza al rialzo durante la prima fermentazione, ma una tendenza opposta è stata osservata durante la seconda fermentazione. In ogni caso, nessuno di questi composti ha superato la soglia di percezione. Gli alcoli superiori prodotti dalla fermentazione erano rappresentati principalmente da alcoli isoamilici (2- e 3-metil-butanolo), che aumentavano regolarmente durante il processo di vinificazione fino a 200 mg/L, dando così un piacevole contributo al vino (Rapp & Mandery, 1986). Tra gli altri alcoli, solo il 3-metil-tio-propanolo ha superato la soglia di percezione. Il suo contributo all'aroma è espresso da un profumo di aglio bruciato o da quello di cavolo cotto. L'alcol fenil-etilico è l'alcol aromatico più importante. Ha origine sia varietale, sia fermentativa e fornisce una piacevole nota floreale di rosa. Gli acidi grassi a catena media rappresentano aromi di fermentazione che meritano un'attenzione particolare per le loro caratteristiche

sensoriali (Liberatore et al., 2010). La loro concentrazione era quasi costante durante le prime fasi della fermentazione, dopo di che il loro contenuto aumentava per raggiungere il massimo, seguito da una diminuzione. Questo declino è attribuibile ad un adsorbimento sulle pareti cellulari dei lieviti, come per i loro esteri. Inoltre, la produzione di queste sostanze è correlata alla temperatura. Una temperatura di fermentazione di circa 25°C favorisce la biosintesi degli acidi grassi a catena lunga (da C-16 a C-18). Al contrario, una temperatura di fermentazione più bassa, tende ad aumentare il tasso di insaturazione all'inizio della fermentazione e a ridurre la lunghezza della catena per ottenere acidi grassi a catena media (Molina et al., 2007; Beltran et al., 2008). Le concentrazioni di acidi esanoico, ottanoico e decanoico erano coerenti con i dati in letteratura per i vini di Malvasia aromatici (Muratore et al., 2007; Nicolini et al., 2009) e superavano significativamente le rispettive soglie di percezione. Le concentrazioni totali di acidi grassi a catena media (da 4 a 10 mg/L) danno note piacevoli e contribuiscono alla vinosità, mentre al di sopra di 20 mg/L queste sostanze forniscono odori sgradevoli. Nei campioni analizzati, questa soglia critica è stata superata solo all'inizio della seconda fermentazione, ma alla fine del periodo di monitoraggio il contenuto totale era di soli 14 mg/L. Sebbene le loro concentrazioni fossero piuttosto basse, gli esteri etilici e gli acetati sono caratterizzati da soglie di percezione abbastanza basse, e sono quindi in grado di essere apprezzati più facilmente. La maggior parte degli esteri etilici degli acidi grassi, ad eccezione dell'etil-esanoato, ha mostrato un comportamento simile a quello degli acidi grassi, con un picco di concentrazione massima degli esteri che non era generalmente coerente con il massimo sviluppo di etanolo. È stato osservato un comportamento diverso per l'etil-esanoato, la cui concentrazione media era costante durante la prima fermentazione e aumentava durante la seconda fermentazione in autoclave, raggiungendo una concentrazione massima (0,318 mg/L) in corrispondenza del più alto contenuto di etanolo. Inoltre, l'etil-esanoato è stato l'unico estere che ha superato la soglia di percezione nel campione finale, conferendo piacevoli aromi floreali e fruttati al vino.

Gli esteri dell'acido acetico erano costanti durante il processo di fermentazione in vasca, mentre aumentavano durante la seconda fermentazione in autoclave. Tendenze simili sono state riportate anche da altri autori (Miller et al., 2007). Solo l'isoamil-acetato ha superato la soglia di percezione alla fine del periodo di monitoraggio, associato al sapore di banana e mela. Tuttavia, un effetto cumulativo potrebbe influenzare l'intera percezione degli acetati.

Infine, la presenza di acetato di etile, non è stata rilevata nelle condizioni analitiche applicate. La presenza di composti come il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo era insolita. In effetti, la loro presenza è tipica dei vini rossi, mentre nei vini bianchi prevalgono i derivati (Rapp & Versini, 1996). Questi composti sono stati osservati anche da altri autori nei vini Malvasia di Candia (Nicolini et al., 2009), probabilmente a causa della contaminazione da *Brettanomyces*. Quando la somma delle loro concentrazioni supera 0,4 mg/L (Rapp & Versini, 1996) il vino ha una sgradevole nota di sudore di cavallo. Tuttavia, nei campioni esaminati questa soglia non è mai stata raggiunta, tranne nel caso del 4-etilguaiacolo in alcuni campioni intermedi.

Chiarire l'evoluzione dell'aroma durante la produzione del vino può contribuire a scoprire le fasi in cui è possibile agire per preservare, o ancora meglio, esaltare, il bouquet varietale del vino (G. Montevicchi et al., 2015).

4.3 Studio comparativo tra il profilo aromatico della Malvasia di Candia aromatica e la Malvasia odorisissima

La Malvasia odorisissima è una varietà di vite aromatica (*Vitis vinifera* L., 1753) che viene spesso confusa con la Malvasia di Candia aromatica (*Vitis vinifera* L., 1753), nonostante le informazioni genetiche ora disponibili sul pedigree e le relazioni genetiche che collegano le due varietà. La Malvasia di Candia aromatica (MC) e la Malvasia odorisissima (MO), nota anche come Malvasia aromatica di Parma, sono varietà aromatiche bianche appartenenti alla famiglia Malvasia.

La Malvasia di Candia aromatica e la Malvasia odorisissima sono particolarmente interessanti, non solo come rappresentanti del germoplasma viticolo italiano, ma anche di quello internazionale. Infatti, MC è una cultivar ben nota nel panorama vitivinicolo mondiale, mentre MO è quasi sconosciuta a livello internazionale, anche se i documenti storici e la tradizione locale attestano il suo potenziale enologico, che richiede una conferma analitica per uno sfruttamento mirato. Conosciuto almeno dal XIX secolo in Emilia, MO è attualmente sull'orlo dell'estinzione a causa della sua bassa produttività, ed è stata spesso sostituita nei vigneti da MC ad alto rendimento (Bignami et al., 2015). Un recente studio genetico (Ruffa et al., 2016) descrive una relazione di progenie genitoriale tra MO e MC, nonché tra MO e Moscato bianco. Allo stesso tempo, non è stata osservata alcuna relazione genetica tra MC e Moscato bianco. I profili aromatici delle uve MC (Borsa et al., 2005; D'Onofrio et al., 2016) e il vino MC (Montevecchi et al., 2015) sono già stati descritti. Tuttavia, non ci sono altre informazioni sul profilo aromatico di MO in letteratura, tranne una nota che riporta che il profilo sensoriale MO è simile a quello dell'uva Moscato bianco piuttosto che essere un tipico vitigno Malvasia aromatico (Fontana, 2014).

Lo scopo dello studio di G. Vasile Simone et al. (2017), è stato quello di fornire una caratterizzazione aromatica di MO e MC al fine di evidenziarne il profilo aromatico distintivo e supportare l'uso di queste varietà per la vinificazione e la differenziazione del prodotto,

salvaguardando così la biodiversità locale. Sono stati considerati anche gli effetti delle condizioni climatiche in due annate consecutive.

Sono state identificate e quantificate le forme libere di 11 alifatici, 24 terpenoidi, 14 benzenoidi e 3 norisoprenoidi C13.

È stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie considerando le varietà (MO e MC) e le annate (2012 e 2013) come fattori, nonché la loro interazione (varietà × annate). Per quanto riguarda le varietà, sono state riscontrate differenze statisticamente significative per tutti i volatili, ad eccezione di esanale, β -citronellolo, benzaldeide, acetofenone, eugenolo, vanillina e acetovanillone. ANOVA è stato applicato alle due annate. In generale, nel primo anno di vendemmia le concentrazioni medie di sostanze volatili in MC erano quasi il doppio rispetto al secondo anno per la maggior parte delle sostanze. La somma di terpenoidi era significativamente più alta per MO, mentre la somma di alifatici e benzenoidi era significativamente più alta per MC. Gli effetti di interazione erano significativi per la somma di alifatici e la somma dei terpenoidi, mentre nessuna interazione significativa è stata osservata per la somma di benzenoidi. I valori medi relativi delle due annate hanno mostrato che MO era caratterizzata (Fig. 2.1) da una prevalenza di terpenoidi totali (97,0%), seguita da benzenoidi (1,6%) e alifatici (1,4%). Il profilo aromatico relativo della MC (Fig. 2.2) evidenzia una frazione terpenoidea inferiore (70,7%), insieme a alifatici più elevati (24,2%) e benzenoidi (5,1%).

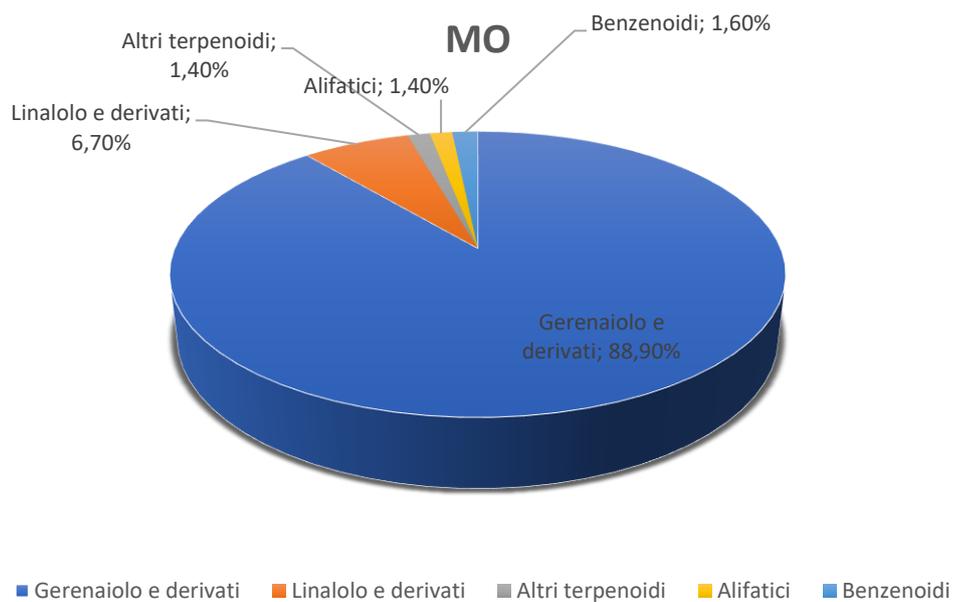


Fig 2.1 Gruppi di aromi liberi di Malvasia odorosissima (MO)

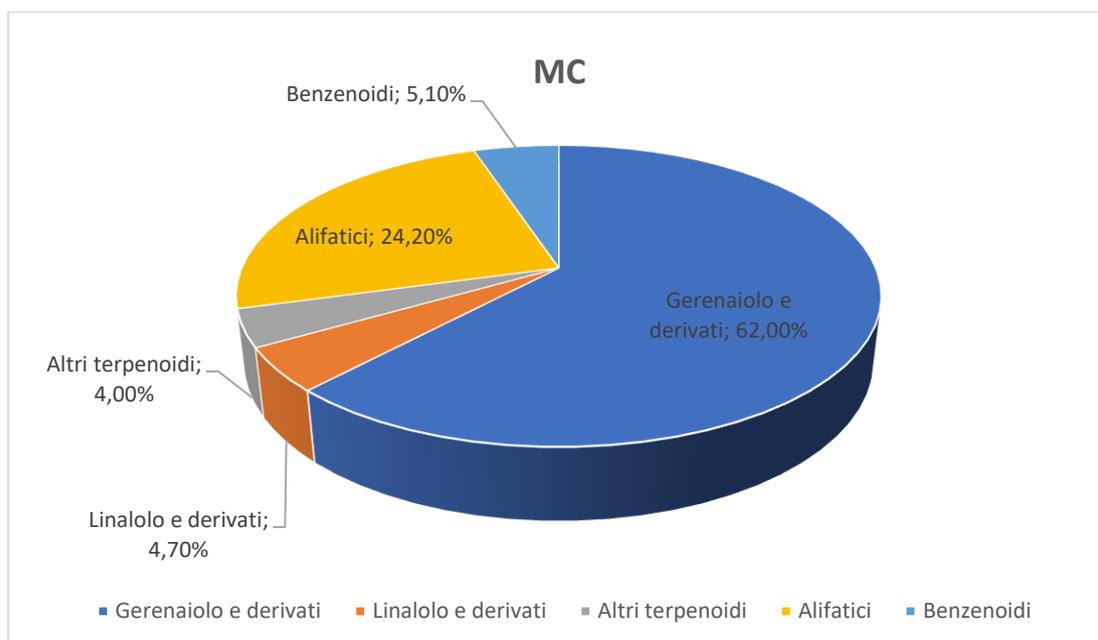


Fig 2.2 Gruppi di aromi liberi di Malvasia di Candia aromatica (MC)

Per quanto riguarda i terpenoidi, entrambe le varietà hanno mostrato una prevalenza di geraniolo e suoi derivati che era di un ordine di grandezza superiore a linalolo e suoi derivati.

Tuttavia, MO ha mostrato quantità comparabili della forma *cis* di geraniolo e nerolo giustificando in parte il suo nome, odorosissima. I due isomeri di ossido di rosa (tetraidro-4-metil-2-(2-metilpropenil)-2H-pirano, monoterpene presente nell'olio essenziale di rosa) sono due composti volatili piacevoli con una soglia di percezione molto bassa. Entrambi sono stati rilevati solo in MO, supportando così una somiglianza sensoriale (Fontana, 2014) e una genetica (Ruffa et al., 2016) tra MO e Moscato bianco.

La vinificazione cambia profondamente il profilo volatile varietale. In effetti, parte della frazione libera viene persa a causa della volatilizzazione, ma viene sostituita dall'idrolisi della frazione glicosilata (Wilson et al., 1986). In particolare, il citrale aveva una bassa soglia di percezione ed era associato a un profumo di limone. MC ha mostrato alte concentrazioni della maggior parte degli alifatici. In particolare, la concentrazione degli alcoli con sei atomi di carbonio (alcoli C6), 1-esanolo, 3-esenolo, 2-esenolo e 2 -esenolo, nonché 2-esanale, erano di gran lunga più alti in MC che in MO. L'alcol 2-feniletilico e l'alcol benzilico hanno presentato una concentrazione significativamente più alta ($p < 0,001$) in MC rispetto a MO. Entrambi sono volatili, con una piacevole nota floreale di rosa.

Per quanto riguarda le forme glicosilate sono state identificate e quantificate le forme glicosilate di 11 alifatici, 25 terpenoidi, 15 benzenoidi e 5 C13-norisoprenoidi. ANOVA (tra le varietà) ha mostrato differenze statisticamente significative per quasi tutti i composti volatili. La concentrazione della maggior parte dei volatili era significativamente più alta in MC che in MO, con alcune eccezioni. L'ANOVA applicato alle annate ha mostrato un numero maggiore di differenze significative rispetto a quanto riscontrato nei composti dell'aroma libero, principalmente a causa delle concentrazioni più basse riscontrate per MC nella seconda annata. Gli effetti dell'interazione erano significativi per la somma dei terpenoidi, la somma dei benzenoidi e la somma dei C13-norisoprenoidi, mentre non è stata osservata alcuna interazione significativa per la somma degli alifatici. Ancora una volta, le interazioni significative tra i fattori erano dovute alla minore concentrazione di gran parte dei volatili nella

seconda annata per MC. MO e MC (Fig. 3.1) erano entrambi caratterizzati dalla prevalenza di terpenoidi totali (75,8% e 87,2% rispettivamente), seguiti da benzenoidi (10,9% per entrambi), alifatici (8,9% e 1,7% rispettivamente) e C13-norisoprenoidi (rispettivamente 4,9% e 0,2%). Per entrambe le varietà, il contenuto di geraniolo e suoi derivati era di un ordine di grandezza superiore a quello di linalolo e suoi derivati, come già osservato per i composti aromatici liberi.

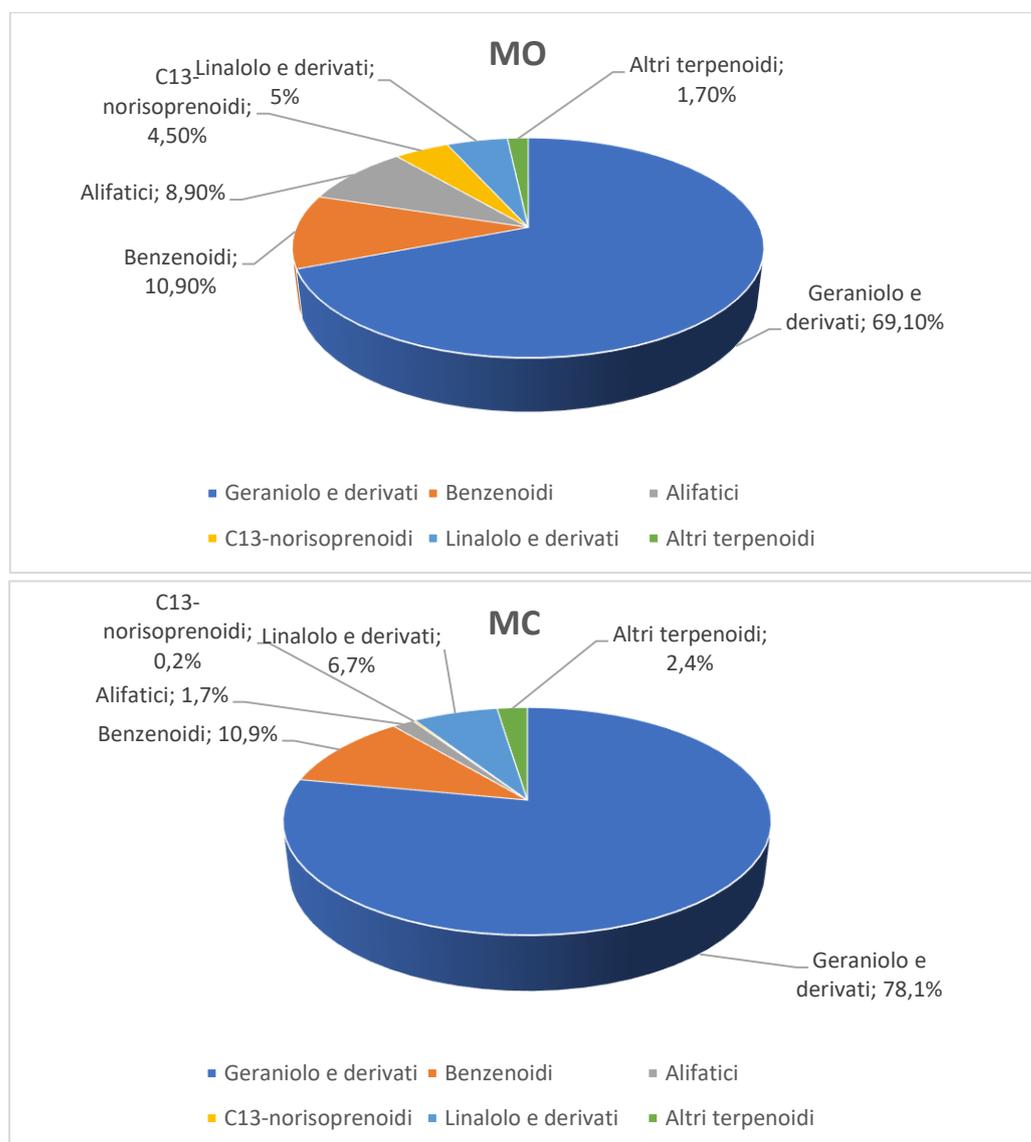


Fig. 3.1 Gruppi aromatici glicosilati di Malvasia odorosissima (MO) e Malvasia di Candia aromatica (MC)

In termini di concentrazioni assolute, MO ha mostrato un contenuto considerevolmente più basso per tutti i gruppi di composti, ad eccezione dei norisoprenoidi C13, rispetto a MC. Questo punto rappresenta un importante fattore distintivo tra le due varietà. MC ha mostrato un contenuto di terpenoidi nella forma glicosilata che era più di tre volte superiore rispetto alla forma libera e persino superiore per i benzenoidi. Per questo motivo, MC ha un elevato potenziale aromatico latente (Del Caro et al., 2014). D'altra parte, MO mostrava un contenuto di benzenoidi molto simile per le forme libere e glicosilate e un contenuto di terpenoidi glicosilati di un ordine di grandezza inferiore a quello della forma libera. Contrariamente a MC, MO ha dimostrato di esprimere il suo patrimonio aromatico quasi completamente e presenta una quantità molto piccola di sostanze volatili in forma glicosilata. La mancanza di terpenoidi glicosilati osservati in MO non era coerente con quanto riportato per altre uve aromatiche, cioè una frazione glicosilata terpenoide più abbondante di quella libera (González-Barreiro et al., 2015).

Il crescente interesse per i vini Malvasia sul mercato internazionale apre buone prospettive per riproporre la diversificazione dei prodotti enologici dalle cultivar Malvasia sottoutilizzate. La ricchezza del profilo aromatico di MO è una caratteristica importante per lo sfruttamento enologico di questa varietà, che è attualmente sull'orlo dell'estinzione e erroneamente confusa con MC, anche dai viticoltori. La particolarità del profilo volatile, con un alto contenuto di terpenoidi in forma libera, anche superiore rispetto a MC, fornisce un prerequisito per la produzione di vini aromatici. Inoltre, MO sembra essere meno suscettibile alle variazioni stagionali in termini di espressione quantitativa dei volatili, come altrimenti osservato per MC. Questa presunta stabilità è di notevole interesse e merita ulteriori approfondimenti sull'attuale situazione dei cambiamenti climatici, che sta influenzando la qualità dell'uva e del vino. Alcune prove rendono il profilo aromatico MO simile a quello del moscato bianco, dando così valore alla vicinanza già dimostrata dall'analisi genetica tra le due varietà aromatiche (G. Vasile Simone et al., 2017).

Bibliografia

- Agnolucci, M., Scarano, S., Santoro, S., Sassano, S., Toffanin, A. e Nuti, M. (2007), “Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains associated to natural fermentation of Malvasia delle Lipari”, *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, 657–662;
- Bavaresco, L., Gatti, M., Pezzutto, S., Fregoni, M. & Mattivi, F. (2008), “Effect of leaf removal on grape yield, berry composition and stilbene concentration”, *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 292-298;
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A. (2002), “Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study” *System. Appl. Microbiol.*, 25, 287-293;
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A. & Rozès, N. (2008), “Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds”, *Int. J. Food Microbiol.* 121, 169-177;
- Berradre, M., Aiello Mazzarri C., Mesa, L., Arraiz, N., Prieto, C., Ortega, J., Sulbarán, B., Ojeda de Rodríguez, G., Fernández, V., Martínez J., e Esteve-Zarzoso B. (2012), “Yeasts population dynamics during the spontaneous fermentation of white grape variety Malvasía”, *Revista de la Facultad de Agronomía*, 29, 453-474;
- Bertuccioli, M., Daddi, P. and Sensidoni, A. (1983), “Evaluating wine quality by the application of statistical methods to analytical GC data”, *Sensory quality in food and beverages: definition, measurement and control*. A. A. Williams and R. K. Atkin (Eds.) *Society of Chemical Industry, London*, 353-358;
- Bigname C., Imazio S., Antonelli A., Masino F., Matrella V., Montevecchi G., Vasile Simone G. (2015), “Malvasia odorosissima”, *Italian Vitis Database*, [Online]: <http://www.vitisdb.it/varieties/show/1474>;
- Borsa, D., Carniel, D., Asproudi, A., Monticelli, L., Crespan, M. & Costacurta, A., (2005), “Caratterizzazione di uve Malvasia attraverso lo studio dei metaboliti secondari”, *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 58 (2), 167-182;
- Chavan, P., S. Mane, G. Kulkarni, S. Shaikh, V. Ghormade, D.P. Nerkar, Y. Shouche y M.V. Deshpande. (2009), “Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India” *Food Microbiol.* vol 26, 801-808;

- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., Comitini F. (2020), “Footprint of nonconventional yeast and their contribution in alcoholic fermentation”, *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, Vol. 19, 435-465;
- Ciani, M., Maccarelli, F. (1998), “Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with winemaking”, *World J. Microbiol. Biol.*, 14, 199–203;
- Comi G., Romano P., Cocolin L. e Fiore C. (2001), “Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from Friuli region in North Italy”, *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 391-394;
- Costacurta, A., Calò, A., Carraro, R., Giust, M. & Crespan, M. (2005), “The Malvasias cultivated in Italy: Molecular, ampelographic, chemical profiles and pedigree relationships”, *Riv. Viticol. Enol.*, 58, 55-65;
- Darriet, P., Tominaga, T., Dubourdieu, D. (1995), Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4methypentan-2-one. *Flavour Fragrance Journal*, 10, 385-392;
- Del Caro, A., Piombino, P., Genovese, A., Moio, L., Fanara, C. & Piga, A. (2014), “Effect of bottle storage on colour, phenolics and volatile composition of Malvasia and Moscato white wines”, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 35, 128-138.
- Di Stefano R. (2013), “Gli aromi dei moscati con particolare riferimento a quello del Moscato giallo”, *Accademia italiana della vite e del vino*, [online]: http://aivv.it/Archivio/Atti/R053_1309_1055_DiStefano.pdf;
- Domizio, P., I. Manazzu and M. Ciani. (2009), “Impact of mother sediment on yeast growth, biodiversity, and ethanol production during fermentation of Vinsanto wine”, *Int. J. Food Microbiol* 129: 83-87;
- D’Onofrio, C., (2011), “Functional characterization of the biosynthesis of the aroma of grapes during the berry development and evaluation of aromatic quality of grapes”, *Italus Hortus*, 18, 39-61;
- D’Onofrio, C., Matarese, F. & Cuzzola, A. (2016), “Study of the terpene profile at harvest and during berry development of *Vitis vinifera* L. aromatic varieties Aleatico, Brachetto, Malvasia di Candia aromatica and Moscato bianco”, *J. Sci. Food Agric.* 97 (9), 2898-2907;
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran M.J., Ramón D. and Querol A. (2001), “Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 85-92
- Etiévant, P.X. (1991), “Wine”, *Volatile compounds of food and beverages*. Maarse, H. Ed. Marcel Dekker Inc., New York., 483-587;

- Fenoll, J., Manso, A., Hellín, P., Ruiz, L. & Flores, P. (2009), “Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening”, *Food Chem.* 114, 420-428;
- Fernández-Espinar M. T., López V., Ramón D., Bartra E., Querol A. (2001), “Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques” *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 1–10;
- Ferreira, V., López, R., and Aznar, M. (2002a), “Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wines”, *Molecular methods of plant analysis*, 21, 89-122;
- Flanzy, C. (1998), “Oenologie fondamentales scientifiques et technologiques” *Lavoisier Tec & Doc*;
- Fontana, M. (2014), “Agrobiodiversità vegetale, Regione Emilia-Romagna” [Online]: <http://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/agrobiodiversita/doc/agrobiodiversita-vegetale>;
- Giust, M., Costacurta, A., Carraro, R., Aggio, L. & Morbin, E. (2005), “Malvasias in the collection of Istituto Sperimentale per la Viticoltura. Results of twenty years of phenologic and productive observations”, *Riv. Viticol. Enol.* 58, 67-80;
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013), “*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine”, *Food Microbiol.* 33 (2), 271–281;
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B. & Simal-Gándara, J. (2015), “Wine aroma compounds in grapes: A critical review” *Crit. Rev. Food Sci.* 55, 202-218;
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A. and Vincenzini, M. (1999), “Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of rDNA ITS region”, *J. Appl. Microbiol.*, 89, 949-956;
- Gunata, Z., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985), “The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components”, *Journal Chromatography*, 331 (1), 83-90;
- Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., de Barros Lopes, M. A. (2004), “Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains”, *FEMS Microbiology Letters*, 240, 125-129;

- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., Lollier M., (2006), “Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation”, *Food Microbiology*, 23, 709–716;
- Liberatore, M.T., Pati, S., Del Nobile, M.A. & La Notte, E. (2010), “Aroma quality improvement of Chardonnay white wine by fermentation and ageing in barrique on lees”, *Food Res. Int.* 43, 996-1002;
- Loira I., Morata A., Bañuelos M. A., Suárez-Lepe J. A. (2020), “Isolation, Selection, and Identification Techniques for Non-Saccharomyces Yeasts of Oenological Interest”, *The Science of Beverages*, 19, 467-508;
- Lopez, R., Ortìn, N., Pèrez-Trujillo, J.P., Cacho, J.F. and Ferreira, V. (2003), “Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3419-3425;
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2009), “Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties”, *J. Agric. Food Chem.* 57, 2468-2480;
- Meillon, S., Urbano, C., Schlich, P., (2009), “Contribution of the temporal dominance of sensations (TDS) method to the sensory description of subtle differences in partially dealcoholized red wines”, *Food Qual. Prefer.* 20 (7), 490–499;
- Meneghetti, S., Poljuha, D., Frare, E., Costacurta, A., Morreale, G., Bavaresco, L. & Calò, A., (2012), “Inter- and intra-varietal genetic variability in Malvasia cultivars”, *Mol. Biotechnol.* 50, 189-199;
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. (2000), “Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma” *Review. Journal of Chromatography A*, 881, 569-581;
- Miller, A.C., Wolff, S.R., Bisson, L.F. & Ebeler, S.E. (2007), “Yeast strain and nitrogen supplementation: Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations”, *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 470-483;
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S. & Agosin, E. (2007), “Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675-687;
- Montevecchi, G., Masino, F., Vasile Simone, G., Cerretti, E., Antonelli A. (2015), “Aromatic Profile of White Sweet Semi-sparkling Wine from Malvasia di Candia Aromatica Grapes”, *South African Journal for Enology and Viticulture*, 36 (2), 267-276;

- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I., (2005), "Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts", *Int. J. Food Microbiol.* 103, 285–294;
- Muratore, G., Nicolosi Asmundo, C., Lanza, C.M., Caggia, C., Licciardello, F. & Restuccia, C. (2007), "Influence of *Saccharomyces uvarum* on volatile acidity, aromatic and sensory profile of Malvasia delle Lipari wine", *Food Technol. Biotechnol.* 45, 101-106;
- Nicolini G., Versini G., Dalla Serra A. (1993), "Enzimi pectolitico-glicosidasici esogeni in mosti e vini: aspetti analitici e sensoriali", *L'Enotecnico*, 29 (10), 55-68;
- Nicolini, G., Moser, S., Larcher, R., Versini G. (2009), "Caratterizzazione della Malvasia aromatica di Candia coltivata sulle colline Parmensi", *L'enologo*, 45 (11), 93-98;
- Povhe Jemec, K., Cadez, T., Zagorc, N., Bubic, V., Zupec A., Raspor P. (2001), "Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must", *Food Microbiology*, 18, 247-259;
- Querol, A., E. Barrio y D. Ramón. (1992), "A comparative study of different methods of yeast strain characterization", *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446;
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1994), "Population dynamics of natural *Saccharomyces* strain during wine fermentation", *Int. J. Food Microbiol* 21, 315-323;
- Rapp A., Knipser W. (1979) 3,7-dimethyl-okta-1,5-dien-3,7-diol eine neue terpenoide verbindung des trauben und weinaromas. *Vitis*, 18, 229-233;
- Rapp A., Mandery H., Engel L. (1980) Identifizierung von 3,7-dimethyl-okta-1,7-dien-3,6-diol im trauben und weinaroma von muskatsorten. *Vitis*, 19, 226-229;
- Rapp, A. and Mandery, H. (1986), "New progress in wine and wine research", *Experientia*, 42, 873-884;
- Rapp, A. & Versini, G. (1996), "Flüchtige phenolische Verbindungen in Wein", *Deut. Lebensm-Rundsch.* 92, 42- 48;
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Smole Moaina, S., Aoeadea, N. (2006), "Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region", *Slovenia International Journal of Food Microbiology* 109, 97-102;
- Rauhut, D. (1993) "Yeast – production of sulfur compounds", *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. G.H. Fleet (Harwood Academic Publisher: Chur, Switzerland) 183-223;
- Ribéreau-Gayon, P. (1978), "Wine aroma", *Flavour of Food and Beverages*. G. Charalambous and G. E. Inglett (Eds.), Academic, New York, 362-371;

- Robinson, A.L., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D., Heymann, H. & Ebeler, S.E., (2014), “Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical components and viticultural impacts”, *Am. J. Enol. Vitic.* 65, 124;
- Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Valles, S., Giraudo, M.R., Caballero, A., (2007), “Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts” *Enzyme Microb. Technol.* 41, 812–820;
- Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2003), “Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations” *Int. J. Food Microbiol.* 86, 181–188;
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., Faticenti, F. (1997a) “Secondary products formation as a tool for discriminating non-Saccharomyces wine strains” *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 239-242;
- Rosi, I., Domizio, P., Vinella M. e Salicone M. (1995), “Hydrolysis of grape glycosides by enological yeast p-glucosidases”, *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*, 37, 1623-1635;
- Ruffa, P., Raimondi, S., Boccacci, P., Abbà, S. & Schneider, A. (2016), “The key role of “Moscato bianco” and “Malvasia aromatica di Parma” in the parentage of traditional aromatic grape varieties”, *Tree Genet. Genomes* 12 (3), 114;
- Sabaté, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón J.M., (2002), “Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA”, *Microbiol Res* 157, 267-274;
- Scalabrelli, G., Ferroni, G., Zinnai, A., Venturi, F. & Andrich, G. (2008), “Sensorial characteristics of wines obtained from late harvest of grapevine variety Malvasia di Candia aromatica in Tuscany”, *Riv. Viticol. Enol.* 2, 409- 422;
- Sipiczki, M. (2003), “*Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines”, *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 2079–2083;
- Swiegers, J. H. and Pretorius, I. S. (2005), “Yeast modulation of wine flavour” *Advances Applied Microbiology*, 57, 131-175;
- Vasile Simone, G., Montevecchi, G., Masino, F., Imazio, S.A., Bignami, C., Antonelli A. (2018), “Aromatic Characterisation of Malvasia Odorosissima Grapevines and Comparison with Malvasia di Candia Aromatica”, *South African Journal for Enology and Viticulture*, 39 (1), 77-87;
- Viana, F., Gil, J.V., Vallés, S., Manzanares, P., (2009), “Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*”, *Int. J. Food Microbiol.* 135, 68–74;

- Vilanova, M., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. (2005), "Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on general composition and sensorial properties of white wines made from *Vitis vinifera* cv. Albariño". *Food Technology and Biotechnology*, 43, 79- 83;
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A. & Oliveira, J.M. (2010), "Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines", *Microchem. J.*, 95, 240-246;
- Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., (2015), "Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation", *Int. J. Food Microbiol.* 206, 67–74;
- Wilson, B., Strauss C. R., Willians, P. J. (1986), "The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties", *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 107-111;
- Zamboni, M., Fregoni, M. & Civardi, S. (2009), "Terroirs and wines of Malvasia di Candia aromatica", *Riv. Viticol. Enol.* 2, 25-35;
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. (2008), "Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking" *Int. J. Food Microbiol.* 125, 197–203;