



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale**  
*Biologia Molecolare e Applicata*

**Evoluzione del profilo aromatico in fermentazioni  
sequenziali con ceppi selezionati di *Torulaspota  
delbrueckii***

**Evolution of aroma profile in sequential fermentations  
with *Torulaspota delbrueckii* selected strains**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:

**Marco Bastari**

*Marco Bastari*

Relatore

Chiar.mo Prof.

**Maurizio Ciani**

*Maurizio Ciani*

Correlatore:

**Dott.ssa Laura Canonico**

*Laura Canonico*

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2019/2020

*C'è più filosofia in una bottiglia di vino che in tutti i libri del mondo*

# INDICE

<b>CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Processo di vinificazione.....</b>	<b>5</b>
1.1. Raccolta delle uve.....	5
1.2. Pigiatura e diraspatura.....	6
1.3. Fermentazione vinaria.....	7
1.4. Vinificazione in rosso.....	9
1.5. Vinificazione in bianco.....	10
2. Biochimismo della fermentazione alcolica.....	12
3. Fermentazione spontanea.....	13
4. Fermentazione inoculata.....	15
5. Lieviti non-Saccharomyces di ambito vinario.....	17
5.1. Torulaspora delbrueckii.....	18
5.2. Lachancea termotolerans.....	19
5.3. Schizosaccharomyces pompe.....	20
5.4. Metschnikowia pulcherrima.....	21
5.5. Meyerozyma guilliermondii.....	22
5.6. Pichia Kluyveri.....	23
5.7. Starmerella bacillaris.....	24
5.8. Hanseniaspora.....	24
6. Fermentazioni miste sequenziali.....	25
7. Composti prodotti durante la fermentazione alcolica.....	29
8. Produzione italiana di vino.....	40
<b>CAPITOLO 2 : SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPITOLO 3 : MATERIALI E METODI.....</b>	<b>43</b>
3.1. Allestimento microvinificazioni in coltura mista.....	43
3.2. Monitoraggio delle fermentazioni.....	46
3.3. Analisi microbiologiche.....	46
3.4. Terreni di coltura.....	48
3.5. Analisi degli alcoli superiori.....	51
3.6. Analisi dell'acidità totale.....	52
3.7. Analisi dell'acidità volatile.....	53

3.8. Determinazione dell'acido malico.....	56
3.9. Determinazione dell'etanolo.....	58
3.10. Determinazione dell'ammonio.....	58
3.11. Determinazione della solforosa.....	60
3.12. Determinazione dei volatili.....	61
<b>CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>63</b>
4.1. Evoluzione popolazione microbica.....	63
4.2. Cinetica fermentativa.....	68
4.3. Acidità totale, acidità volatile, pH, SO <sub>2</sub> e Acido Malico.....	69
4.4. Etanolo.....	70
4.5. Principali prodotti della fermentazione.....	71
4.6. Evoluzione principali composti volatili.....	76
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI .....</b>	<b>79</b>
6. Bibliografia.....	82

# **CAPITOLO 1: INTRODUZIONE**

## **1. Processo di vinificazione**

La vinificazione è un processo complesso che inizia subito dopo la vendemmia e porta dalla materia prima (l'uva) al prodotto finito (il vino). Il processo è articolato nelle fasi di preparazione del mosto, di fermentazione, di maturazione ed invecchiamento. Ciascuno di questi processi comporta il susseguirsi di fenomeni chimico-fisici e biologici che possono essere controllati con operazioni e tecniche atte a conservare i caratteri della materia prima ed a gestire la qualità dei vini che ne derivano (Lambrechts & Pretorius, 2000; Fleet, 2003).

### **1.1. Raccolta delle uve**

Per comprendere se l'uva è matura ed è arrivato il momento della vendemmia vengono presi in considerazione due parametri fondamentali: il grado zuccherino e l'acidità. L' uva ancora acerba contiene molti acidi e pochi zuccheri. Col passare del tempo avverrà il processo inverso, gli zuccheri aumenteranno e gli acidi diminuiscono costantemente. Gli zuccheri sono per lo più glucosio e fruttosio, gli acidi sono principalmente il tartarico, il malico e in misura minore il citrico.

Oltre alle analisi di zuccheri e acidi contenuti, vengono fatte valutazioni sensoriali delle uve, in particolare di quelle aromatiche. Delle uve rosse, invece, si considera anche la quantità e la composizione polifenolica.

Vengono raccolti dei campioni d'uva dai diversi vigneti dopo l'inviatura e le suddette analisi vengono effettuate in laboratori con apposite strumentazioni.

Per una corretta raccolta è importante evitare di raccogliere uva bagnata perché l'acqua potrebbe influire sulla qualità del mosto, non raccogliere nelle ore più calde

della giornata per impedire l'innalzamento della temperatura con conseguenti possibili fermentazioni indesiderate, riporre l'uva in contenitori non troppo capienti per evitare schiacciamenti e trasportare l'uva il più velocemente possibile nei locali di vinificazione per evitare macerazioni o fermentazioni indesiderate ("Influence of grape harvesting time on wine quality", 2013).

## **1.2. Pigiatura e diraspatura**

La pigiatura e la diraspatura sono le prime operazioni in cui viene sottoposta l'uva dopo la vendemmia. Tramite l'operazione della pigiatura si rompono gli acini per permettere la fuoriuscita del succo. È importante non provocare lacerazioni delle parti solide che potrebbero dare al vino un sapore acidulo.

La pigiatura viene effettuata con macchine apposite ed è molto importante che durante questa operazione si rompa unicamente l'acino con una leggera pressione preservando la rottura di vinaccioli e raspi.

La pigiatrice più utilizzata è quella a rulli, costituita da un telaio sul cui fondo sono poste una o due coppie di rulli di pressatura in gomma alimentare la cui rotazione schiaccia delicatamente gli acini.

A seguire viene condotta la separazione dei raspi dal pigiato, ossia la diraspatura.

È molto importante eliminare subito i raspi affinché questi non diano al mosto, e quindi al vino, un cattivo sapore.

Viene eseguita con appositi macchinari con un cilindro forellato all'interno del quale gira un albero diraspatore. Questo albero è munito di palette, tramite le quali, elimina i raspi, preservando polpa e bucce che riescono a passare attraverso i fori (P. Ribèreau-Gayon-B, Edagricole 2007).

### 1.3. Fermentazione vinaria

Il semplice processo biochimico di conversione del mosto d'uva in vino fu descritto da Louis Pasteur nel 1872 come un processo attraverso il quale i lieviti fermentano spontaneamente gli zuccheri dell'uva convertendoli in etanolo, anidride carbonica ed altri metaboliti.

Gli studi successivi hanno evidenziato che in realtà si tratta di un processo molto più complesso, che dipende, oltre che dalla composizione chimica del mosto, dall'intervento simultaneo di microrganismi rappresentati da lieviti, muffe e batteri (lattici e acetici).

Tra questi, i principali responsabili della fermentazione sono i lieviti.

Si stima che sulla superficie dei grappoli la popolazione microbica raggiunga valori di 10000-1000000 UFC/g. Sui grappoli immaturi predominano i generi *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida*. Sui grappoli maturi *Hanseniaspora spp.* e *Metschnikowia spp.* sono i lieviti predominanti, rappresentando il 50-75 % della popolazione microbica. Il principale agente della fermentazione, *Saccharomyces cerevisiae* è assente o presente in concentrazioni molto basse.

I fattori che influenzano la presenza e lo sviluppo dei lieviti durante la fermentazione alcolica sono numerosi. Tra questi ci sono la composizione iniziale della popolazione e la variabilità della specie presenti nel mosto d'uva, l'inoculo del mosto con colture starter selezionate, la composizione chimica del mosto, parametri correlati alla tecnologia di vinificazione e le interazioni esistenti tra i lieviti delle varie specie.

In dettaglio, i fattori che influenzano l'evoluzione dei lieviti in vinificazione possono essere così suddivisi:

-fattori di natura chimica: nutrienti, zuccheri, anidride solforosa, composti dell'azoto, ossigeno, vitamine, elementi naturali, acidi organici, metaboliti, etanolo, anidride carbonica e acidi organici.

-fattori di natura fisica: temperatura (18-25 C°) e pressione osmotica.

-fattori di natura biologica: composizione della popolazione iniziale e interazione con altri microrganismi.

Tra tutti questi parametri l'ossigeno svolge un ruolo di primaria importanza nell'evoluzione delle diverse specie di lievito. Durante la fermentazione alcolica del vino, nel mosto vengono a crearsi condizioni di bassissime concentrazioni di ossigeno. In generale, in presenza di aria, i lieviti utilizzano il glucosio respirando; in assenza di aria ne provocano la fermentazione.

Alcuni studi hanno dimostrato che *S. cerevisiae* è in grado di svilupparsi rapidamente anche in condizioni anaerobiche, mentre altre specie appartenenti al genere *Hanseniaspora*, crescono più lentamente in assenza di ossigeno. La rimozione di ossigeno dal mosto in fermentazione, dovuta al vigoroso sviluppo di *S. cerevisiae*, potrebbe contribuire alla rapida scomparsa dei lieviti non-*Saccharomyces* (Barata. A, the microbial ecology of wine grape berries 2012)



#### **1.4. Vinificazione in rosso**

Il vino rosso è ottenuto dalla fermentazione alcolica del mosto in presenza delle parti solide (bucce e vinaccioli). Le bucce lasciate in macerazione durante la fermentazione con il mosto tendono a muoversi verso l'alto per effetto dell'anidride carbonica fino a galleggiare sulla superficie, formando il cosiddetto “cappello”. Una volta giunte a contatto con l'aria le vinacce possono seccarsi oppure dar luogo ad acescenza o nei casi più gravi marcire. Pertanto, è fondamentale che le vinacce siano sempre immerse completamente nel vino.

Per questo ad intervalli regolari durante la fermentazione si procede al rimescolamento delle vinacce con il mosto, operazione nota come follatura.

In alternativa, si può ricorrere al rimontaggio, prelevare del mosto dalla massa in fermentazione e riversarlo nell'eventuale “cappello” che si è venuto a formare.

Queste operazioni assicurano una migliore estrazione delle sostanze coloranti, polifenoli delle bucce e favorendo l'ossigenazione della massa.

La macerazione nella vinificazione in rosso può durare fino a 7 o 12 giorni a seconda della tipologia di uve e del vino che si vuole produrre.

Per alcuni vini di grande pregio la fase di macerazione può avere tempi molto lunghi. Durante questa fase bisognerà controllare l'intensità del colore del mosto e la quantità di polifenoli estratti.

Completata questa fase avviene la svinatura, ossia la separazione delle sostanze solide dal “vino fiore”. Di solito viene compiuta travasando la frazione liquida in un altro recipiente con pompe enologiche. Infine, la massa liquida viene travasata in botti, barrique, contenitori in acciaio inossidabile per la fase di affinamento e maturazione.

Dopo la svinatura, le condizioni ambientali portano alla fermentazione malolattica, ossia la trasformazione dell'acido malico proveniente dalle vinacce in acido lattico e anidride carbonica.

La fermentazione malolattica è condotta da microrganismi chiamati batteri lattici anaerobi. Opportuno è l'inoculo di batteri lattici selezionati, per ovviare a problemi relativi alla partenza e alla continuazione della fermentazione. A seconda della tipologia del vino che si vuole ottenere, si opta per metodi di affinamento diversi. In genere, per prodotti di pronto consumo, si utilizzano contenitori di affinamento in acciaio inox; per prodotti più evoluti, si possono utilizzare contenitori in legno.

Il legno durante l'affinamento cede al vino sostanze e aromi che ne modificano le caratteristiche organolettiche.

Infine, i vini rossi necessitano di trattamenti stabilizzanti che servono a mantenere intatte le caratteristiche fino al consumo. In generale, trattamenti a bassa temperatura evitano precipitazioni tartariche; contro precipitazioni proteiche si utilizzano coadiuvanti quali la bentonite; la microfiltrazione con filtri a membrana permette di avere una stabilità chimico-fisica e al tempo stesso microbiologica, utilizzando un'idonea porosità delle membrane (Gerbi V; 2020)

### **1.5. Vinificazione in bianco**

I vini bianchi derivano dalla fermentazione del solo succo d'uva. L'estrazione e la chiarificazione dei mosti dei vini bianchi precedono sempre la fermentazione alcolica, il colore del vino non deriva perciò dal colore delle uve, ma dall'assenza di macerazione delle uve ammostate durante la fase alcolica.

La prima operazione, come tutti i tipi di vinificazione, è la pigiatura delle uve, seguita dalla diraspatura, ossia la separazione degli acini dai raspi. Le due operazioni possono avvenire contemporaneamente utilizzando delle macchine enologiche dette pigiadiraspatrici. A questa fase segue la sgrondatura, ossia la separazione delle bucce dalla frazione liquida del mosto limitando il più possibile il tempo di contatto. La frazione solida viene destinata immediatamente alla pressatura per il recupero di tutti i liquidi e non viene a contatto con il mosto.

I mosti vengono poi successivamente decantati, filtrati o centrifugati per ottenere la giusta limpidezza e finezza. Molto importante è la protezione del mosto dall'ossidazione evitando perdite di aromi. Si possono utilizzare varie tecniche per prevenire l'ossidazione tra cui: la solfitazione (dose inferiore a 50 mg/l), l'utilizzo di acido ascorbico, il raffreddamento delle uve e del mosto (riduzione velocità delle reazioni ossidative) e pratiche che evitano il contatto con l'aria come l'uso di gas inerti nelle fasi prefermentative.

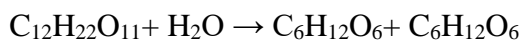
Si passa successivamente alla fase fermentativa. Generalmente, le temperature sono comprese tra i 18 e i 22°C.

A fermentazione conclusa, il vino viene travasato nei vasi vinari destinati al suo affinamento. La chiarifica del vino viene effettuata tramite tecniche fisiche, quali centrifugazione e filtrazione; altrimenti si può optare per un affinamento sulle fecce di fermentazione, costituite da lieviti, mescolati a sali dell'acido tartarico, batteri e residui di grappolo.

Terminata la fase di affinamento il vino viene sottoposto a trattamenti stabilizzanti, privilegiando metodiche di tipo fisico (P.Ribèreau-Gayon-B, Edagricole 2007).

## 2. Biochimismo della fermentazione alcolica

I lieviti fermentanti producono energia convertendo gli zuccheri in anidride carbonica ed etanolo. La fermentazione è un processo che avviene nella maggior parte dei casi in condizioni di anaerobiosi, ovvero in assenza di ossigeno. La cellula non può quindi ottenere le molecole di ATP che sarebbe stata in grado di produrre attraverso il ciclo di Krebs e l'ATP sintasi. Di conseguenza le uniche molecole di ATP che la cellula è in grado di utilizzare sono le due ottenute tramite la glicolisi. La fermentazione alcolica nello specifico si svolge in due fasi distinte; nella prima fase si ha la scissione degli zuccheri complessi (es. saccarosio) tramite l'enzima invertasi. Con questa operazione si ottengono zuccheri semplici come il fruttosio ed il glucosio.



Nella seconda fase del processo si verifica la glicolisi (processo di scissione del glucosio in piruvato per la liberazione di ATP = energia) con il glucosio.



L'acido piruvico ( $CH_3COCOOH$ ) viene privato di una molecola di anidride carbonica liberata nell'ambiente extracellulare e spezzando il gruppo  $-COOH$  per formare come prodotto intermedio l'aldeide acetica. Infine, grazie all'azione dell'enzima Alcool Deidrogenasi, l'aldeide acetica viene ridotta ad etanolo e il NADH viene ossidato a  $NAD^+$  (Figura 1).

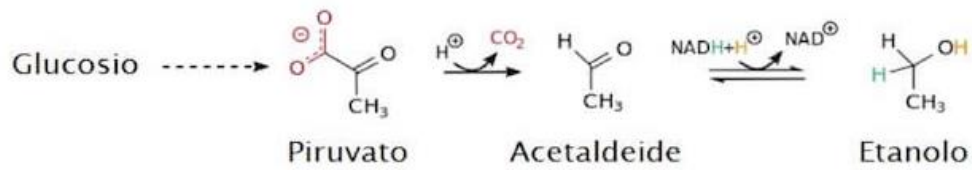


Figura 1: schema illustrativo biochimismo fermentazione alcolica

Attualmente due sono i tipi di fermentazione in uso per la produzione di vino: la fermentazione naturale spontanea e quella inoculata (Viticoltura ed Enologia biologica, Edagricole 2004)

### 3. Fermentazione spontanea

Un tempo il vino derivava esclusivamente dalla fermentazione spontanea del microbiota naturale. Diverse specie di lievito trovate sulla superficie dei grappoli d'uva e microrganismi indigeni associati con le superfici della cantina partecipavano a questa fermentazione spontanea. È certo che i lieviti apiculati e altri lieviti non-*Saccharomyces* erano sempre presenti, assicurando così l'avvio della fermentazione alcolica; ciò che poteva avere un andamento poco regolare era, invece, la seconda fase della fermentazione, quella condotta da *S. cerevisiae*. Al termine della prima fase della fermentazione condotta da lieviti apiculati si potevano avere diverse situazioni:

- per la presenza di ceppi di *S. cerevisiae* enologicamente validi capaci di portare a completamento la fermentazione alcolica;
- fermentazioni interrotte a causa della bassa temperatura o per la mancanza di ceppi di lievito di elevato potere fermentativo;

-fermentazioni incontrollate con lo sviluppo di lieviti appartenenti ai generi *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* capaci di produrre sostanze aromatiche non desiderate.

La vinificazione spontanea, malgrado l'evidente imprevedibilità del suo esito finale e il rischio dell'insorgenza di problemi di natura microbiologica, è ancora oggi assai diffusa, specialmente in Italia e in particolare nella produzione di alcuni vini di pregio. I sostenitori della vinificazione spontanea attribuiscono ai prodotti ottenuti per tale via una forte distinzione stilistica, frutto di una maggiore complessità di aroma, gusto e struttura, rispetto ai prodotti ottenuti mediante inoculo di ceppi selezionati, che viceversa, sarebbero responsabili di un "effetto appiattimento" delle differenze. Nelle prime fasi della fermentazione alcolica spontanea predominano lieviti caratterizzati da una limitata attività fermentativa, appartenenti ai generi *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. Come atteso con il procedere della fermentazione si assiste alla diminuzione dei lieviti non-*Saccharomyces*, con la predominanza di *S. cerevisiae* al termine del processo. I lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono in maniera significativa alla fermentazione, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a  $10^6$ - $10^7$  cellule/ml. Si pensa che queste alte popolazioni influenzino la composizione del vino così come lo sviluppo di *S. cerevisiae*, dal momento che i cambiamenti chimici del vino prodotti dai lieviti non-*Saccharomyces* influenzano sia la cinetica di crescita che il metabolismo di *S. cerevisiae*. Con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces* consentendo in tal modo a *S. cerevisiae*, dotato di un maggiore potere alcoligeno, di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo. I lieviti più alcoligeni sono quelli

sporigeni e fra questi, in particolare, i ceppi vinari della specie *S. cerevisiae*, che per la maggior parte esibiscono potere fermentativo superiore al 14% di etanolo. Oltre a *S. cerevisiae*, poche altre specie hanno la possibilità di intervenire nelle ultime fasi della fermentazione e in quelle centrali, in quanto dotate di un discreto potere alcoligeno; si tratta di *Torulaspota delbrueckii* e *Zygosaccharomyces bailii* e varie specie appartenenti al genere *Schizosaccharomyces* (G. Suzzi, microbiologia enologica 2018)

#### **4. Fermentazione inoculata**

La pratica di inoculare i mosti con colture pure di lievito ha avuto inizio nel 1890 con Muller-Thurgau, che ha introdotto il concetto di fermentazioni condotte con colture selezionate di lievito. Nei paesi tradizionalmente produttori di vino, le colture selezionate venivano invece utilizzate prevalentemente per correggere i difetti fermentativi e/o per attivare operazioni di rifermentazione in genere, e di spumantizzazione, in particolare. Per suscitare l'interesse dell'industria di starter microbici, fu però necessario attendere la seconda metà del XX secolo, quando, sotto la spinta dell'industria panaria, iniziò la produzione di lieviti per la vinificazione sotto forma di lievito compresso. Aveva però l'inconveniente di essere facilmente deperibile a causa dell'elevato contenuto in umidità (70 %), che ne riduceva la diffusione commerciale. Per ovviare a ciò nel 1965 furono proposti e commercializzati i primi due starter vinari sotto forma di lieviti secchi attivi (LSA).

I lieviti LSA, grazie a una elevata vitalità (50%), alla lunga conservabilità dovuta al ridotto contenuto in umidità (4-8%) e al sistema di confezionamento sottovuoto, hanno permesso un'ampia diffusione degli starter enologici. In Italia la rapida diffusione dell'impiego dei lieviti selezionati è iniziata nel 1978 dopo l'entrata in

vigore della legge che ne autorizzava l'uso (D.M. 10 Ottobre 1977). Tuttavia, fra tutte le colture commercializzate sotto forma secca attiva, soltanto una decina sono quelle più utilizzate al mondo. L'uso di poche colture selezionate potrebbe condurre ad una standardizzazione dell'agente microbico con il risultato di ottenere la riduzione della biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina e la conseguente minore variabilità dei vini dovuta alla loro attività. La selezione dei lieviti starter per enologia si attua essenzialmente all'interno del genere *Saccharomyces* e in particolare tra le colture appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. La selezione di lieviti vinari ha lo scopo di ottenere, attraverso un programma ben definito, colture di lievito capaci di condurre il processo fermentativo verso risultati predeterminati. La prima fase di un programma di selezione prevede il reperimento di un vasto numero di colture mediante isolamento da vari ambienti. L'individuazione delle caratteristiche da prendere in considerazione per gli starter vinari è sicuramente una fase importante del processo di selezione. Infatti, i caratteri desiderabili per una coltura starter per enologia sono diversi anche in funzione delle diverse tecnologie di vinificazione da adottare e delle differenti tipologie di prodotto che si vogliono ottenere. Il lievito *S. cerevisiae* è senza dubbio il lievito più vigoroso, più adattabile alle varie condizioni di vinificazione, con un alto grado di variabilità per numerosi caratteri, più alcoligeno e, infine, dotato di un'ottima purezza fermentativa. Il termine purezza fermentativa esprime il rapporto tra acidità volatile formata e alcol etilico prodotto. Varia da ceppo a ceppo e tanto più il valore del rapporto è vicino a zero, migliore è la purezza fermentativa. Il termine alcoligeno invece si riferisce al potere fermentativo ossia la capacità di produzione massima di etanolo che il ceppo può formare durante la fermentazione in presenza di un eccesso di zuccheri. *S. cerevisiae* possiede inoltre un'ottima velocità di



fermentazione ossia la capacità di dare origine a pronte e rapide fermentazioni. Questo carattere viene valutato in condizioni standardizzate di temperatura e caratteristiche dei mosti. La seconda fase della fermentazione inoculata è l'aggiunta della solforosa come agente antimicrobico e inibitore verso lieviti non-*Saccharomyces* (Patrizia Romano, *Yeasts in the production of wine* 2019).

### **5. Lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario**

La presenza di lieviti non-*Saccharomyces* in passato era spesso associata ad arresti di fermentazione o profili analitici dei vini anomali. Recentemente, il loro ruolo nelle fermentazioni vinarie è stato rivalutato, poiché, seppure caratterizzati da scarso potere fermentativo, posseggono attività metaboliche particolari, diverse da quelle espresse da *S. cerevisiae*, che possono contribuire all'ottenimento di un prodotto con maggiore complessità aromatica, che richiede l'originalità delle fermentazioni spontanee. Inoltre, negli ultimi decenni, l'attenzione è stata puntata sulla individuazione di ceppi di lievito non-convenzionali, da impiegare in fermentazioni miste con *S. cerevisiae* per l'ottenimento di un vino a ridotto contenuto alcolico, ma con caratteristiche aromatiche peculiari (Ciani M. Use of non-*Saccharomyces* yeasts in red winemaking). Principio base di questo approccio è la capacità dei lieviti non-*Saccharomyces* di metabolizzare gli zuccheri del mosto d'uva mediante vie alternative alla fermentazione alcolica, deviando i percorsi metabolici verso la produzione di composti secondari (glicerolo, composti volatili, mannoproteine) diversi dall'etanolo, che influenzano positivamente le caratteristiche organolettiche del vino (M. Vincenzini, *Microbiologia del vino* 2009).

### 5.1. *Torulaspora delbrueckii*

Tra i ceppi non-*Saccharomyces* il più studiato e commercializzato è *T. delbrueckii*. *T. delbrueckii* (Figura 2) rispetto alle altre specie di lievito non-*Saccharomyces* è caratterizzata da un potere fermentativo relativamente elevato fino al 9-10% (v/v), mentre diverse specie non-*Saccharomyces*, come *Metschnikowia pulcherimma*, *Pichia guillermondii*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora vineae* non tollerano concentrazioni di etanolo superiori al 4%. *T. delbrueckii* è caratterizzata per una bassa produzione dell'acidità volatile nei vini. Diversi studi hanno riportato riduzioni della concentrazione finale di acido acetico di circa 0,14 a 0,28 g/l rispetto a *S. cerevisiae*. L'utilizzo di ceppi di *T. delbrueckii* può diminuire la concentrazione finale di etanolo nei vini fino all'1% (v/v), aumentando la concentrazione di glicerolo da 0,2 a 0,8 g/l. Inoltre, può migliorare l'intensità e la qualità dell'aroma del vino aumentando i caratteri varietali e fruttati. *T. delbrueckii* è in grado di diminuire la concentrazione di alcoli superiori quando viene utilizzata nelle fermentazioni sequenziali con *S. cerevisiae*. Diversi studi hanno evidenziato la produzione di maggiori concentrazioni finali di esteri fruttati e altri studi l'effetto opposto. Queste differenze nella formazione di alcoli superiori ed esteri sono state spiegate dall'elevata variabilità dei ceppi. Inoltre, una corretta selezione del ceppo di *T. delbrueckii* permette il rilascio di concentrazioni più elevate di tioli, che aumentano il carattere varietale in tipologie di vino come il Sauvignon blanc (Angel Benito, the influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters 2019).

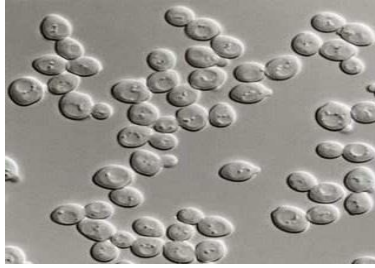


Figura 2: *Torulaspora delbrueckii*

## 5.2. *Lachancea thermotolerans*

*Lachancea thermotolerans* (Figura 3) è la più raccomandata tra le specie di lieviti non-*Saccharomyces* per acidificare i succhi d'uva che “soffrono” di mancanza di acidità. Questa capacità è molto utile in zone viticole nel sud dell'Europa o in qualsiasi altra regione calda di viticoltura. *L. thermotolerans* può acidificare i vini grazie alla sua capacità unica tra i lieviti di produrre acido lattico durante la fermentazione. La produzione di acido lattico può variare da poche decine di g/l fino a quasi 10 g/l a seconda del ceppo utilizzato e della temperatura di fermentazione. La produzione di acido lattico senza degradare minimamente l'acido malico influenza direttamente il parametro dell'acidità titolabile. Alcuni studi hanno riportato una riduzione del pH da circa 4 a 3,5 nel succo d'uva a bassa acidità, che sarebbe considerato un vino acido nella maggior parte delle regioni viticole calde. La riduzione del pH influenza positivamente anche il colore del vino rosso a causa dell'aumento dell'intensità di colore degli antociani come lo ione flavilio. *L. thermotolerans* è in grado di produrre concentrazioni di acido acetico inferiori a quelle di *S. cerevisiae*, circa 0,24 g/l. Altri studi hanno dimostrato concentrazioni finali di glicerolo inferiori a quelle di *S. cerevisiae* pari a circa 1,5 g/l, mentre nelle fermentazioni sequenziali si raggiungono livelli più elevati di glicerolo fino a 1 g/l. Questi risultati, combinati con quelli relativi alla produzione di etanolo, indicano che, *L. thermotolerans* produce meno etanolo per quantità di zucchero utilizzato con

quantità di prodotti derivanti dalla via glicero-piruvica superiore al *S.cerevisiae*. Tuttavia, la produzione di glicerolo da parte di *L. termotolerans* dipende anche da altri fattori, come la temperatura, in quanto produce concentrazioni più elevate a 20° C rispetto a 30° C (Angel Benito, the influence of non-Saccharomyces species on wine fermentation quality parameters 2019).

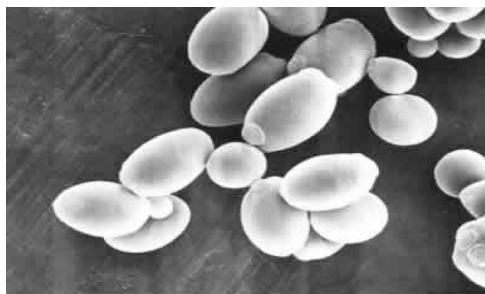


Figura 3: *Lachancea termotolerans*

### **5.3. *Schizosaccharomyces pompe***

*Schizosaccharomyces pompe* (Figura 4) invece è la specie più raccomandata tra le specie non-*Saccharomyces* per disacidificare vini eccessivamente acidi provenienti da zone fresche, come quelli del Nord Europa. Recentemente questa specie viene utilizzata per stabilizzare i vini dal punto di vista microbiologico, ad esempio, nei vini rossi provenienti da zone viticole calde, dove l'esecuzione di un corretto processo di fermentazione malolattica risulta complicato a causa dei bassi livelli di acido malico e dell'alto pH. *S. pompe* è in grado di metabolizzare l'acido malico in etanolo e anidride carbonica, riducendo di conseguenza l'acidità totale del vino. Nei vini con acido malico superiore a 5 g/l, considerati molto acidi dai consumatori, *S. pompe* può rimuovere completamente l'acido malico presente, diminuendo l'acidità totale di circa 4 g/l e il pH di circa 0,4 unità. Specifici ceppi sono in grado di rimuovere l'acido gluconico dal vino durante la fermentazione alcolica, con una

percentuale di rimozione fino al 91%. L'acido gluconico infatti può influenzare negativamente la qualità del vino, generando instabilità microbica, in quanto può essere utilizzato dai batteri lattici per aumentare l'acidità volatile, riducendo l'effetto protettivo dell'anidride solforosa. Uno dei problemi principali legati all'utilizzo di *S. pompe* è che tende a generare alti livelli di acido acetico, il quale produce un carattere dannoso per la qualità. Questo effetto indesiderato è stato risolto con l'uso combinato con ceppi *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* o l'uso di magnesio. Queste alternative consentono la produzione di vini con un contenuto di acido acetico inferiore a quelli prodotti da *S. cerevisiae*. Un altro effetto indesiderato è quello dell'aumento della concentrazione di etanolo, in quanto la degradazione di 2,33 g/l di acido malico produce circa lo 0,1% di etanolo aggiuntivo (Angel Benito, the influence of non-Saccharomyces species on wine fermentation quality parameters 2019).

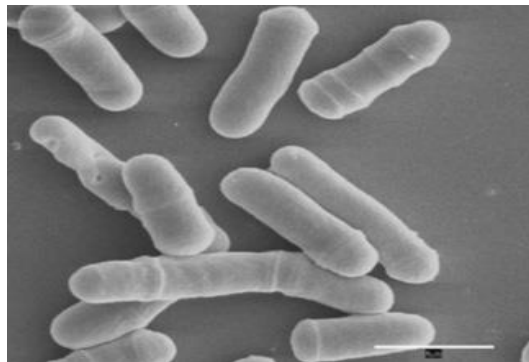


Figura 4: *Schizosaccharomyces pompe*

#### 5.4. *Metschnikowia pulcherrima*

*Metschnikowia pulcherrima* (Figura 5) può aumentare la concentrazione di glicerolo di pochi decimali nelle fermentazioni combinate rispetto alla singola fermentazione con *S. cerevisiae*. È anche in grado di ridurre il contenuto di acido malico di circa il 10% e la concentrazione di circa 10 mg/l. *M. pulcherrima* è utilizzata anche per ridurre le concentrazioni di etanolo fino all'1% (v/v). Diversi studi hanno dimostrato che è in grado di produrre concentrazioni elevate di esteri fruttati. L'influenza più rilevante sulla qualità dei vini legata all'uso di *M. pulcherrima* è la capacità dell'attività della cistationina- $\beta$ -liasi di causare il rilascio di tioli varietali come il 4-metil-4-sulfanilpentan-2-one in concentrazioni fino a sei volte superiori a *S. cerevisiae*. Questo composto è il più importante indicatore di qualità nella varietà di vino come Sauvignon blanc (Angel Benito, the influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters 2019).

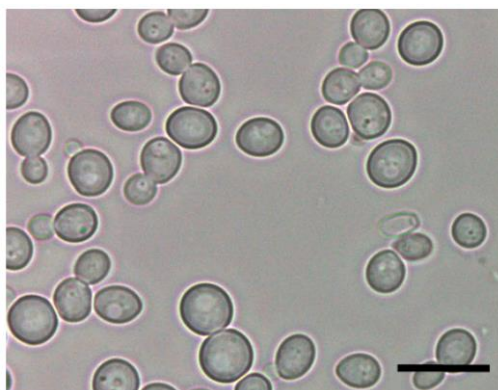


Figura 5: *Metschnikowia pulcherrima*

### 5.5. *Meyerozyma guilliermondii*

*Meyerozyma guilliermondii* (Figura 6) viene utilizzato per miglioramenti del colore del vino. Questo lievito ha un'elevata attività enzimatica dell'idrossimicinnamato decarbossilasi. Questa attività enzimatica permette la produzione di piranoantocianina, che si condensa con gli antociani dell'uva per produrre composti colorati altamente stabili che rimangono per un periodo di tempo più lungo rispetto agli altri antociani (Angel Benito, the influence of non-Saccharomyces species on wine fermentation quality parameters 2019).

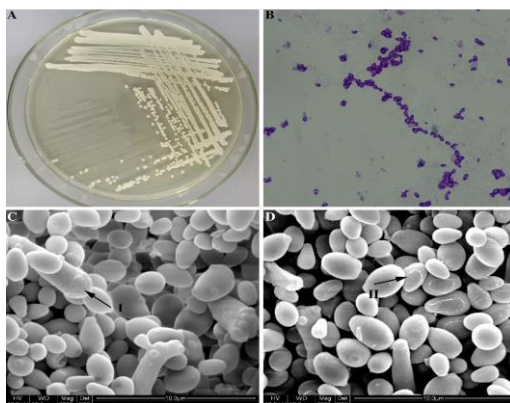


Figura 6: *Meyerozyma guilliermondii*

### 5.6. *Pichia kluyveri*

L'uso di *Pichia kluyveri* (Figura 7) nelle fermentazioni sequenziali produce livelli più elevati di esteri rispetto a *S.cerevisiae*, come l'acetato di 2-feniletile, di circa il 20%, o l'ottanoato di etile, di circa il 10%. Anche la concentrazione totale dei terpeni è aumentata di circa il 20%; questo fatto ha contribuito ad aumentare la tipicità dei vini (Angel Benito, the influence of non-Saccharomyces species on wine fermentation quality parameters 2019).

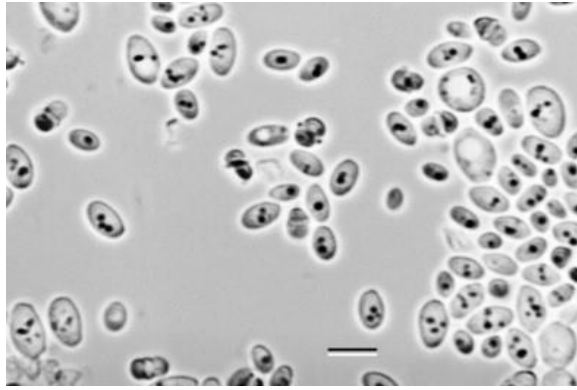


Figura 7: *Pichia kluyveri*

### 5.7. *Starmerella bacillaris*

*Starmerella bacillaris* (Figura 8), ex *Candida stellata*, produce la più alta concentrazione di glicerolo (fino a 14 g/l) dei lieviti non-*Saccharomyces* durante la fermentazione alcolica; mentre la maggior parte dei ceppi di *S. cerevisiae* hanno dimostrato di produrre concentrazioni finali che variano da 5 a 8 g/l. Un'altra proprietà interessante è il suo carattere fruttosofilo, in contrasto con il carattere glucosofilo di *S.cerevisiae* (Angel Benito, the influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters 2019).

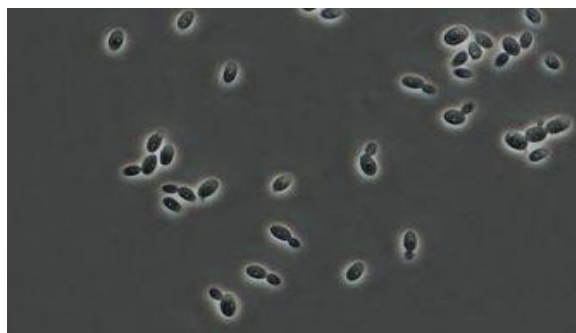


Figura 8: *Starmerella bacillaris*



## 5.8. *Hanseniaspora*

Le specie del genere *Hanseniaspora* hanno una caratteristica forma apiculata. La maggior parte dei lieviti presenti all'inizio della fermentazione spontanea appartengono a questo genere. Nelle fermentazioni tradizionali influenza notevolmente le fermentazioni alcoliche durante la prima fase fino al raggiungimento di livelli alcolici di circa il 4%. A questi livelli, la maggior parte dei ceppi di *Hanseniaspora* non possono sopravvivere a causa della loro bassa tolleranza all'etanolo. Il genere *Hanseniaspora* ha un'interessante fonte di enzimi; l'attività enzimatica più notevole è data dalla B-glucosidasi, glicolitica e la proteasi. Dal punto di vista sensoriale, i miglioramenti si basano su una maggiore intensità del gusto e complessità aromatica del vino. Le specie più utilizzate a questo scopo sono: *Hanseniaspora guillermondii*, *Hanseniaspora uvarum* (Figura 9) e *Hanseniaspora vlnae*. Le specie più appropriate per migliorare invece il colore e la composizione polifenolica dei vini rossi sono: *Hanseniaspora clermontiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora vlnae*. Tutte queste specie migliorano i parametri di qualità come l'intensità del colore e gli antociani totali. Questi miglioramenti del colore si basano sulla capacità delle specie di *Hanseniaspora* di produrre vitisina A, vitisina B e malvidina-3-O-glucoside-4-vinilguaiacolo (Angel Benito, the influence of non-Saccharomyces species on wine fermentation quality parameters 2019).



Figura 9: *Hanseniaspora uvarum*

## 6 Fermentazioni miste multistarter o sequenziali

Le fermentazioni vinarie condotte con colture starter di lieviti selezionati rappresenta una strategia per un processo controllato e sicuro. Tale pratica ha però portato ad un appiattimento sensoriale dei vini e una standardizzazione dei prodotti. Per tale motivo una pratica attualmente diffusa in campo enologico è l'impiego di fermentazioni miste e/ sequenziali con lieviti non-*Saccharomyces* e ceppi di *S. cerevisiae*. Già da tempo, infatti, è stato suggerito l'impiego come colture starter di alcune specie di lievito non-*Saccharomyces* per le loro specifiche caratteristiche metaboliche. È quindi possibile promuovere l'attività dei lieviti non-*Saccharomyces* nella vinificazione, limitando o ritardando l'inoculo di colture starter selezionate di *S. cerevisiae*. Molti studi sono stati rivolti alla comprensione di come specie di lieviti non-*Saccharomyces* interagiscano con *S. cerevisiae* durante la crescita e confrontati con il comportamento delle monoculture degli stessi lieviti. Questi studi hanno confermato che i lieviti non-*Saccharomyces* crescono seguendo cinetiche simili a quelle osservate nelle fermentazioni spontanee, ma determinate condizioni come la temperatura, l'aggiunta di  $\text{SO}_2$ , i livelli e i tempi di inoculo, possono essere modulate per aumentare la loro permanenza e quindi il loro contributo nel corso del processo fermentativo. Le colture miste (Figura 10) incidono sulla performance metabolica dei

singoli ceppi e delle diverse specie all'interno della miscela. I vini risultanti da fermentazioni con colture miste di lieviti presentano una composizione di metaboliti aromatici volatili peculiare. Ad esempio l'impatto dei lieviti non-*Sacharomyces* sulle fermentazioni in coltura mista con *S. cerevisiae* può essere definito quando si ricercano determinati caratteri enologici, come la disacidificazione biologica del mosto e/o vino attraverso la diminuzione della concentrazione di acido malico o per prevenire l'eccesso di acidità volatile. È stata valutata, inoltre, la disacidificazione dei vini in condizioni industriali di vinificazione, utilizzando un mutante di *Schizosaccharomyces malidevorans*. Un processo di disacidificazione biologica più controllato è stato ottenuto utilizzando *S. cerevisiae* e le cellule immobilizzate di *S. pompe*. In questo processo, *S. cerevisiae* ha condotto la fermentazione utilizzando quasi tutti gli zuccheri disponibili, mentre le cellule immobilizzate di *S. pompe* hanno consumato l'acido malico. Recentemente è stata valutata anche l'influenza delle colture miste e sequenziali di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* nella fermentazione al fine di migliorare la qualità dei vini e ridurre il contenuto di acido acetico. Queste colture miste hanno determinato una riduzione del 53% dell'acidità volatile e del 60% dell'acetaldeide. L'uso di un processo di fermentazione multistarter è stato proposto anche per simulare una fermentazione naturale, al fine di conferire maggiore complessità al vino. È stata analizzata l'influenza di colture pure, miste e sequenziali di *K. apiculata*, *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* sulla componente volatile dei risultanti vini, mostrando evidenti differenze nel metabolismo di *S. cerevisiae* in coltura pura e mista. Altri studi sono stati condotti per studiare l'influenza di *H. uvarum* e *H. guillermondii* nella produzione di composti solforati, di alcoli superiori e di esteri durante le fermentazioni miste con *S. cerevisiae*, evidenziando un miglioramento nella produzione dei composti desiderabili. In particolare, nella

fermentazione mista *H. uvarum* ha determinato l'aumento di acetato di isoamile contenuto nel vino, mentre *H. guillermondii* ha causato un incremento di 2-fenilettil-acetato.

Le fermentazioni miste sono state proposte anche per migliorare la produzione di specifici composti volatili che determinano l'aroma del vino. Per esempio la co-fermentazione con *S. cerevisiae* e *Pichia kluyveri* determina un aumento della concentrazione dei tioli varietali nel Sauvignon Blanc. Di particolare interesse è il risultato chemio-sensoriale in un vino Chardonnay prodotto dalla fermentazione con coltura mista di *C. stellata* e *S. cerevisiae*. L'impatto sensoriale a seguito della produzione di alti livelli di glicerolo da parte di *C. stellata* era evidente solo quando il lievito veniva utilizzato in un inoculo sequenziale (inoculo 15 giorni prima *C. stellata* e poi *S. cerevisiae*) rispetto a quando le due specie venivano inoculate entrambe al tempo zero. Un' altro studio è stato condotto per verificare l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* nell'invecchiamento dei vini rossi sulle feccie. Pertanto, i lieviti vinari non-*Saccharomyces* presentano alcune specifiche caratteristiche enologiche che non si trovano nelle specie *S.cerevisiae* e che possono avere effetti positivi sui vini. L'uso controllato di colture miste di lieviti vinari *S.cerevisiae* e non-*Saccharomyces* può migliorare i parametri analitici ed il profilo aromatico attraverso le interazioni metaboliche tra le diverse specie di lievito. In questo contesto, l'uso della tecnica di immobilizzazione delle cellule nelle colture miste permette il controllo accurato del processo multistarter. Tuttavia sono ancora necessari studi più approfonditi per capire i meccanismi biologici di come i lieviti interagiscano ecologicamente e metabolicamente quando si sviluppano in colture miste, sia inoculate che sequenziali,durante un processo di vinificazione (Giovanna S. Edagricole 2018).



Figura 10: prodotti fermentazioni starter misto vs *S.cerevisiae*

## 7. Composti prodotti durante la fermentazione alcolica

Durante la fermentazione alcolica gli zuccheri contenuti nel mosto vengono convertiti dai lieviti in alcol etilico e anidride carbonica. I lieviti utilizzano gli zuccheri presenti nel mosto per crescere e moltiplicarsi. Nelle fasi iniziali di questo processo che si sviluppa in oltre trenta reazioni successive i lieviti svolgono una respirazione aerobica, si servono cioè dell'ossigeno presente nel mosto per trasformare gli zuccheri in acqua e anidride carbonica. Presto il poco ossigeno presente nel mosto si esaurisce ed è a questo punto, in condizioni anaerobiche, che inizia la fermentazione vera e propria. In questa fase i lieviti provocano l'ossidazione degli zuccheri e la loro trasformazione. A seconda del lievito utilizzato circa il 50% dello zucchero si trasforma in alcol, il 45% in anidride carbonica, il 3% in glicerolo e il 2% in altre sostanze di diversa natura che svolgono un ruolo essenziale nel determinare le qualità aromatiche e gustative del vino. I sottoprodotti più importanti

che meritano una menzione sono l'acetaldeide, l'acido acetico, l'acetato di etile, il glicerolo e altri tipi di alcoli polivalenti che determinano la morbidezza del gusto del vino. La quantità e la qualità dei prodotti di fermentazione dipendono ovviamente anche da come il processo viene condotto, molto importante è che il mosto non abbia subito fenomeni ossidativi prima della partenza della fermentazione. Essendo il mosto particolarmente zuccherino è infatti sensibile agli attacchi di batteri ma anche ad alterazioni microbiche e ossidative. La fase pre-fermentativa deve essere il più possibile di breve durata e il mosto può essere ulteriormente protetto aggiungendo anidride solforosa, che permette di svolgere le operazioni di decantazione e chiarificazione senza rischiare l'alterazione del mosto. I lieviti vengono aggiunti al mosto prima dell'inizio della fermentazione.

#### **-alcol etilico**

L'alcol etilico nel vino è prodotto dalla fermentazione alcolica degli zuccheri contenuti nei mosti. Quindi più dolce è l'uva al momento della vendemmia, più zuccheri vi saranno nei mosti e più alcolico risulterà il vino. L'alcol nel vino ha un contenuto variabile tra il 4% (es. spumanti dolci) al 20% o più (nei vini liquorosi). Tracce di altri alcoli monovalenti (metilico, propilico, butilico) vengono generate come sottoprodotti della fermentazione alcolica, ma la loro presenza in quantità significativa è di regola indesiderabile e dannosa dal punto di vista organolettico e della salute. L'alcol ha come primo effetto una sensazione pseudo-calorica e contribuisce a rinforzare la sensazione di corpo e morbidezza del vino, attenuando l'effetto dell'acidità fissa, dei sali minerali e dei tannini. Inoltre nei vini l'alcol ha effetto stabilizzante svolgendo un'azione antisettica e favorisce le precipitazioni tartariche. I vini con alcolicità fino al 10% vengono in genere definiti leggeri, mentre

vengono definiti più o meno caldi i vini con gradazione alcolica crescente. In base alle leggi vigenti, l'Europa vitivinicola è stata suddivisa, a seconda del clima, in varie regioni. Per quanto riguarda l'Italia, si prevede che i vini messi in commercio debbano avere almeno il 9% di alcool, ovvero i mosti dovranno contenere una percentuale di zucchero di circa 15%. Nei vari disciplinari dei vini Doc e Docg, sono poi indicate le percentuali di zucchero necessarie per assicurare il grado minimo alcolico previsto per ogni tipologia. Indicativamente la scala di valutazione dell'alcolicità del vino è:

**<10% alc.vol= leggero, 11-12% alc.vol.= abbastanza caldo, 13-14% alc.vol. = caldo, 14-16% alc.vol.= calore alcolico marcato, >16% alc.vol.= decisamente alcolico**

#### **-glicerolo**

Il glicerolo, dopo l'etanolo e l'anidride carbonica, è il composto prodotto in maggiore quantità durante la fermentazione alcolica e influenza notevolmente il cosiddetto "corpo del vino". Questo prodotto secondario della fermentazione alcolica contribuisce significativamente a impartire ai vini i caratteri di "dolcezza" (soglia di percezione 5,2 g/l) di "corposità" e di "pienezza". I lieviti *Saccharomyces* della vinificazione possono produrre dai 2 ai 10 g/l in funzione della specie e del ceppo di lievito. In particolare ceppi criotolleranti appartenenti alla specie *S. uvarum* producono quantità di glicerolo superiori alla media. Inoltre il glicerolo può servire come fonte di carbonio per la crescita di diversi microrganismi, ad esempio, i lieviti flor nella produzione dello Jerez. Inoltre certi batteri, responsabili di alterazioni, lo degradano mediante una doppia disidratazione che porta alla formazione di acroleina

la quale, per interazione con i tannini, accentua la sensazione di amaro, da cui prende il nome la corrispondente alterazione.

### **-acido acetico**

Tra gli acidi di neoformazione il più importante dal punto di vista merceologico è l'acido acetico il quale è il costituente pressoché esclusivo dell'acidità volatile. Questa acidità è in relazione alle specie e varietà del lievito, al tenore glucidico del mosto ed alla tecnica di vinificazione che, quando condotta correttamente, determina valori di acidità volatile non superiore a 0,6 g/l. Il tenore in acido acetico e la conseguente acidità volatile di un vino tendono ad aumentare nel corso del tempo soprattutto se il vino contiene un certo quantitativo di zucchero indecomposto. Se l'acidità volatile supera valori di 0,8-0,9 g/l, il vino è da considerarsi in fase di alterazione. La fermentazione alcolica di un mosto conduce normalmente alla formazione di 0,24-0,37 g/l di acidità volatile, espressa in acido acetico. La sintesi di questo acido, favorita dalla presenza di ossigeno, inizia con l'avvio della fermentazione alcolica operata dai lieviti che, dopo aver esaurito gli zuccheri, metabolizzano altre forme di idrati del carbonio.

### **-composti solforati**

Generalmente i composti solforati, presenti nel vino a bassissime concentrazioni, sono responsabili di odori sgradevoli. In base alla loro struttura chimica, è possibile distinguerli in cinque categorie: sulfidi, polisolfidi, composti eterociclici, tioesteri e tioli. Genericamente i composti solforati sono associati a seri difetti di odore, questo non è il caso di mercaptani che al contrario apportano note positive all'aroma del vino. L'odore del 4-mercapto-4-metilpentanone e del 3-mercaptoesanololo ricordano l'aroma del limone, del pompelmo e del frutto della passione; mentre l'odore del 3-



mercapto-3-metilbutanolo è simile a quello del porro cotto. Il 3-mercaptoesilacetato ricorda l'aroma del bosso e della ginestra. Il rilascio di questi composti è più o meno importante a seconda del ceppo di lievito che conduce la fermentazione. Un altro meccanismo di formazione dei polisolfidi è l'ossidazione dei mercaptani. I lieviti sono in grado di ridurre i solfidi in mercaptani. La concentrazione dei polisolfidi che generalmente è riscontrata nel vino varia da 0,09 a 53 ug/l.

### **-alcoli superiori**

Gli alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio sono chiamati alcoli superiori. Essi originano dagli amminoacidi del mosto, nel corso della fermentazione e della proteolisi dei lieviti per un processo di deaminazione. I principali alcoli superiori sono l'alcol isobutilico e gli alcoli amilici. Sono presenti nei vini in dosi variabili da 150 a 550 mg/l. A basse concentrazioni partecipano alla complessità aromatica del vino; in dosi più elevate, mascherano la finezza aromatica e conferiscono un odore ed un gusto pungente. La formazione di alcoli superiori può essere incrementata da pH e temperature elevate nonché dall'arieggiamento. Inoltre nel mosto, una carenza di amminoacidi ed ammonio porta ad un incremento del contenuto in alcoli superiori.

### **-acetaldeide**

L'acetaldeide è il composto carbonilico più importante che si forma durante la fermentazione e rappresenta il 90% del contenuto totale di aldeidi nel vino. È un precursore dell'acetato, dell'acetoino e dell'etanolo. Inoltre, gioca un ruolo chiave nella biosintesi di due alcoli superiori, isobutanolo e alcol amilico attivo, in quanto insieme al piruvato l'acetaldeide è un precursore nella sintesi di valina e leucina, da cui derivano i due alcoli. Il contenuto di acetaldeide nel vino può variare da 10 mg/l a oltre 300 mg/l e la valutazione del suo contenuto è usata come indicatore del grado di

ossidazione di un vino. Generalmente un alto livello di acetaldeide è indesiderabile e vini contenenti 500 mg/l sono considerati non commerciabili. Presente nel vino a livelli bassi conferisce un gradevole aroma di frutta, ma a concentrazioni già di 100-125 mg/l libera un odore pungente e irritante. Il fattore principale che determina la maggior variabilità di contenuto di acetaldeide è la specie di lievito. I principali produttori sono i ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, considerati produttori relativamente alti di acetaldeide, mentre altre specie quali *H. uvarum*, *C. stellata*, *H. anomala*, *C. pulcherrima*, ne producono quantità notevolmente più basse. Inoltre la produzione di acetaldeide da parte dei lieviti dipende da molti fattori, come la fase di fermentazione, la composizione del mezzo, le condizioni di anaerobiosi, la temperatura di fermentazione e dai materiali usati per la chiarificazione.

#### **-acetoino**

L'acetoino è un costituente naturale del vino, prodotto dall'attività microbica e presente nel vino di norma in quantità da 2 a 32 mg/l. Esso svolge un ruolo importante per la sua potenzialità aromatica, come composto chiave nella produzione di diacetile e di 2,3-butandiolo, che in quantità elevate influenzano fortemente l'aroma delle bevande alcoliche. I lieviti producono acetoino attraverso diverse vie biosintetiche, tra le quali la prevalente condensazione dell'acetaldeide attiva con acetaldeide libera e formazione di acetoino. L'acetoino è poi ridotto a 2,3-butandiolo e i due composti sono strettamente legati. I lieviti non-*Saccharomyces* sono alti produttori di acetoino nella prima parte della fermentazione alcolica. Questo prodotto viene poi utilizzato dal lievito principale della fermentazione, *S. cerevisiae*, per la formazione di 2,3-butandiolo e di altri composti secondari o per aumentare il grado alcolico. La produzione di acetoino dipende da vari fattori, tra cui il pH, la

temperatura di fermentazione, le condizioni di aerazione, il substrato, l'ossigeno ma soprattutto la specie di lievito che ha dominato la fermentazione.

### **-esteri**

Oltre agli alcoli, nei vini, sono presenti numerosi acidi. In seguito ad una reazione reversibile tra la funzione alcolica e quella acida, con eliminazione di acqua si ha la formazione di un elevato numero di esteri. L'estere più importante nel vino è l'acetato di etile. È responsabile delle caratteristiche olfattive dei vini affetti da acescenza. L'acetato di etile interviene anche nel gusto a dosi relativamente elevate (120 mg/l). Inoltre, durante il processo fermentativo, alcuni lieviti sintetizzano esteri etilici degli acidi grassi caratterizzati da odori piacevoli di miele che contribuiscono positivamente alla finezza aromatica dei vini bianchi.

### **-polisaccaridi**

Il vino è caratterizzato da un insieme di sostanze complesse ed eterogenee, i polisaccaridi. Essi conferiscono morbidezza, pienezza e rotondità al vino. I polisaccaridi che derivano dall'uva sono il risultato dell'idrolisi e della solubilizzazione di una parte di sostanze pectiche contenute nelle pareti cellulari della buccia e della polpa. La seconda fonte di polisaccaridi del vino è rappresentata dai lieviti. I polisaccaridi esocellulari ceduti dal vino, nel corso della fermentazione e dell'affinamento si possono classificare in due grandi frazioni:

-un gruppo di mannoproteine principali, contenente il 90% di mannosio e 10% di proteine.

-un complesso di tipo glucomannoproteina, contenente 25% di glucosio, 25% di mannosio e 50% di proteine.

La presenza di mannoproteine del lievito migliora le proprietà schiumogene nei vini spumanti, aumenta la stabilità tartarica, intensifica il colore, stimola la crescita dei batteri lattici del vino ed esercita una azione stabilizzante nei confronti delle precipitazioni proteiche.

### **-sostanze minerali**

Il vino contiene da 2 a 4 g/l di sostanze minerali. Questi presentano un gusto acido e nel contempo salato e partecipano alla formazione del sapore del vino, conferendogli la caratteristica freschezza. Il contenuto in sostanze minerali è inferiore a quello dei mosti d'origine, principalmente a causa della precipitazione del bitartrato di potassio e del tartrato di calcio durante la vinificazione e la conservazione del vino. A queste si aggiunge la sottrazione dei minerali da parte dei lieviti che utilizzano particolari elementi indispensabili al loro metabolismo. Inoltre, dato che le vinacce sono più ricche in minerali, i vini ottenuti con vinificazione in rosso presentano un contenuto in minerali maggiore di quelli ottenuti con la tradizionale tecnica di vinificazione in bianco. Il potassio è il catione dominante nei vini, il suo contenuto varia da 0,5 a 2 g/l. I vini, ottenuti da uve appassite, ne sono i più ricchi. I tenori in calcio dei vini sono dell'ordine di qualche decina di milligrammi per litro, un po' più elevati nei vini bianchi rispetto ai rossi. Il rame e il ferro, presenti nell'uva, diminuiscono nel corso della fermentazione del mosto sia a causa della vinificazione, specie in quella in rosso, che determina la precipitazione per ossidoriduzione del rame e del ferro, sia per il metabolismo dei lieviti alcolici che utilizzano, anche se in piccole quantità, questi elementi. Il rame e il ferro causano instabilità nei vini in quanto responsabili della casse rameica e della casse ferrica.

## **-proteine**

Le proteine solubili presenti nei vini possono essere suddivise principalmente in tre gruppi in base alla loro origine:

-proteine derivanti dal mosto d'uva

-proteine estratte dalle bucce e dai vinaccioli

-proteine sintetizzate durante l'autolisi dei lieviti

Le proteine possono essere precipitate dai tannini, per questo i vini rossi ne sono privi. I vini bianchi e rosati, al contrario, presentano tenori di queste sostanze che possono raggiungere valori di qualche centinaio di mg/l che provengono essenzialmente dall'uva. Per i vini bianchi, le proteine sono una causa di instabilità della limpidezza causando intorpidimenti.

## **-composti fenolici**

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, comprendente un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, tutte caratterizzate dalla presenza di un nucleo aromatico, l'anello benzenico, legato ad uno o più gruppi funzionali ossidrilici. I polifenoli giocano un ruolo primario in enologia, esplicando un ruolo essenziale nel definire le caratteristiche organolettiche dei vini ed intervengono nel corso della vinificazione e dell'invecchiamento. I composti fenolici, sono considerati i principali composti responsabili dell'imbrunimento dei vini bianchi durante la conservazione in bottiglia diventando substrato di una serie di reazioni enzimatiche e non enzimatiche. Contribuiscono, inoltre, alla formazione di alcune delle più importanti proprietà sensoriali del vino, colore aroma e astringenza. I composti fenolici del vino si possono classificare in due grandi classi: flavonoidi e

non flavonoidi. Al primo gruppo appartengono composti differenti per il grado di ossidazione, distinti in antociani, flavonoli e flavanoli. Gli antociani e flavanoli sono responsabili, rispettivamente, del colore, del gusto e dell'astringenza del vino. Alla classe dei composti fenolici non flavonoidi appartengono principalmente gli acidi fenolici che sono i costituenti della lignina e dei tessuti delle piante. Nelle varietà di uve bianche, rispetto a quelle rosse, la concentrazione degli acidi fenolici è inferiore sia nella polpa che nel mosto, dove gli acidi benzoici e cinnammici sono i predominanti.

### **-aromi varietali**

L'insieme delle caratteristiche odorose e aromatiche del vino rappresenta l'aspetto sensoriale di maggiore rilevanza tra quelli riconducibili alla tipicità varietale di vini ottenuti da varietà di uve differenti. I composti volatili responsabili delle caratteristiche aromatiche del vino sono numerosi e di diversa natura. Molti di essi si originano durante la fermentazione alcolica e sono, pertanto, definiti aromi di fermentazione. A questi si aggiungono le sostanze odorose derivanti dall'uva. Esse costituiscono la componente aromatica del vino che viene più direttamente influenzata dalla varietà di uva impiegata per la vinificazione e vengono quindi definite "varietali". Tra queste sono presenti alcuni composti di notevole interesse enologico, quali terpeni, norisoprenoidi e pirazine in grado di influenzare in maniera determinante le caratteristiche aromatiche del vino. Un'interessante peculiarità di alcuni composti volatili derivanti dall'uva, in particolare terpeni e norisoprenoidi è che essi sono presenti in larga parte sotto forma di precursori non odorosi ma quando rilasciati nel corso della vinificazione e/o invecchiamento del vino contribuiscono ad aumentare la complessità aromatica dei vini. D'altra parte durante la maturazione e/o

affinamento del vino in seguito a processi ossido-riduttivi, di acetilazione, di esterificazione e di ossidazione di alcoli, tannini, acidi e numerose altre sostanze, il vino acquisisce profumi più maturi ed evoluti, con sentori speziati, tostati ed eterei che si fondono spesso in un bouquet d'invecchiamento particolare. Una migliore aromatizzazione del vino bianco secco, con conseguente aumento della complessità aromatica, può derivare dall'elaborazione in fusti. Fra le numerose sostanze volatili cedute al vino dal legno, i fenoli volatili e le aldeidi fenoliche sono principalmente responsabili dell'odore boisè dei vini affinati in fusti di rovere. I *terpeni* volatili possono essere distinti in due gruppi correlati biosinteticamente: i monoterpeni e i sesquiterpeni. I terpeni sono i principali responsabili dell'aroma floreale del vino. Circa il 50% dei monoterpeni totali si trova nella buccia dell'uva mentre durante l'invecchiamento del vino subiscono diverse trasformazioni chimiche che determinano la loro trasformazione. I *norisoprenoidi* sono molecole di natura terpenica molto diffuse in natura e presenti in foglie, fiori e frutti. Sono caratterizzati da un potente aroma floreale e fruttato grazie alla bassa soglia di percezione. I principali composti appartenenti a questa classe sono  $\alpha$  e  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -damascenone, vitispirano e TDN. Questi ultimi due composti, assenti nei vini giovani, si formano nel corso dell'invecchiamento per idrolisi acido-catalizzate e si ritrovano, pertanto, ad elevate concentrazioni nella frazione volatile dei vini invecchiati. Il livello di TDN e vitispirano sembra non essere determinante per l'aroma dei vini non invecchiati. Le *pirazine* sono dei composti di natura aromatica la cui molecola è costituita da un nucleo di sei atomi contenenti due atomi di azoto. Nei vini questi composti costituiscono un ristretto gruppo di odoranti estremamente potenti in quanto sono caratterizzati da una bassa soglia di percezione. I *fenoli volatili* sono prodotti dai lieviti durante il processo di fermentazione alcolica. I fenoli volatili ed i derivati

fenolici quali etilfenoli, vinilfenoli, eugenolo, isoeugenolo, metossieugenolo, guaicol, cresolo e vanillina sono altri componenti volatili che incidono sull'aroma del vino. Non tutti i composti volatili esercitano una influenza positiva sull'aroma del vino. Generalmente, nei vini rossi la concentrazione degli etilfenoli è più elevata rispetto a quella dei vinilfenoli, mentre questi ultimi sono presenti in concentrazioni più elevata nei vini bianchi a cui conferiscono note speziate. Oltre all'attività metabolica dei lieviti, altri fattori, quale ad esempio l'affinamento in legno, possono determinare un incremento dei fenoli volatili (Vincenzini M. Microbiologia del vino, 2009).

## **8. Produzione italiana di vino**

L'Italia è riconosciuta come una delle nazioni con il più alto numero di vitigni coltivabili. Molti di questi sono autoctoni, cioè hanno origine italiana o meglio di una specifica regione. Gli altri sono definiti alloctoni cioè internazionali. Al nord la coltivazione della vite è diffusa in quasi tutte le regioni. L'Emilia Romagna è la regione del nord in cui vengono coltivate il maggior numero di varietà a bacca bianca come la Malvasia, il Pignoletto e il Trebbiano romagnolo. Al centro, nella zona compresa tra la Toscana e il Molise, gli ettari vitati ammontano a circa 137 mila. Nelle Marche in particolare si allevano il Biancame, il Verdicchio, il Trebbiano, la Passerina e il Pecorino. Nel sud dell'Italia, la Campania è una regione dalle antichissime tradizioni vitivinicole, che in tempi recenti ha saputo dare vita a vini di altissimo livello, sia a partire da vitigni a bacca bianca che da vitigni a bacca rossa. Per quanto riguarda la prima tipologia, sono coltivate l'Asprinio, la Biancolella, la Coda di volpe e la Falanghina. Infine, il territorio viticolo siciliano risulta il più esteso tra le isole italiane ed è quello in cui vengono coltivati il maggior numero di



vitigni autoctoni a bacca bianca come il Grillo, il Catarratto, il Grecanico, lo Zibibbo e l'Inzolia. Per il nostro paese il vino costituisce il secondo comparto agroalimentare in ordine di fatturato ed è il primo nell'esportazione a livello mondiale. Dopo un lungo periodo di stasi, un incremento significativo della produzione nazionale di vino e mosto è stato registrato nel 1998. (Acme M.; 2012) La vendemmia si era attestata intorno a 56,9 milioni di ettolitri facendo registrare, su base annua, una crescita del 13% circa. Negli anni tra il 2005 e il 2011, la produzione totale di vino in Italia è diminuita del 15,5%, passando da 48 a 40,6 milioni di ettolitri. Con i suoi 42 milioni di ettolitri di produzione di vino l'Italia, nel 2011, a parità di merito con la Francia si è confermata il maggior produttore di vino europeo. Attualmente la produzione complessiva di vino e mosto è pari a 46,6 milioni di ettolitri (Figura 11). La geografia della raccolta (Figura 12), segnala la concentrazione maggiore per le regioni del centro e sud Italia, a partire dalla Toscana fino alla Sicilia, all'Umbria e al Lazio (Istat, 2020).

Produzione italiana di vino e mosto (migliaia di ettolitri)			
	2019	2020*	Var. % 2020*/2019
Piemonte	2.603	2.681	3%
Valle d'Aosta	17	19	10%
Lombardia	1.301	1.431	10%
Trentino Alto Adige	1.312	1.378	5%
Veneto	10.950	11.059	1%
Friuli Venezia Giulia	1.785	1.624	-9%
Liguria	40	44	10%
Emilia Romagna	7.250	7.975	10%
Toscana	2.625	2.074	-21%
Umbria	426	383	-10%
Marche	816	857	5%
Lazio	800	720	-10%
Abruzzo	3.184	3.375	6%
Molise	227	233	2%
Campania	778	778	0%
Puglia	8.947	8.231	-8%
Basilicata	87	83	-5%
Calabria	110	110	0%
Sicilia	3.911	3.129	-20%
Sardegna	363	436	20%
<b>TOTALE</b>	<b>47.533</b>	<b>46.620</b>	<b>-2%</b>

Figura 11: geografia produzione regionale vini 2020

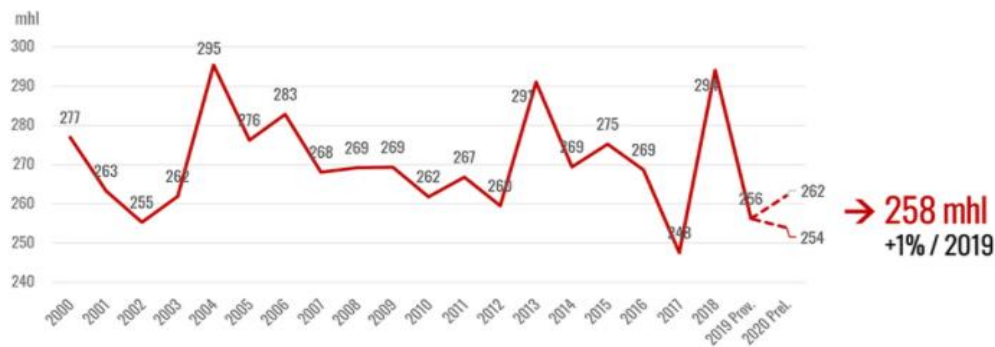


Figura 12: produzione complessiva di vini/mosti in Italia annata 2020

## CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

Nella moderna enologia, l'impiego di ceppi commerciali di *S. cerevisiae* per indurre la fermentazione alcolica è una pratica diffusa in quanto ritenuta efficace per il controllo della durata del processo fermentativo e per garantire la qualità organolettica del vino. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni numerose indagini hanno evidenziato che l'uso di queste colture starter (numericamente limitate) concorra ad uniformare l'aroma e il gusto del vino compromettendo la possibilità di diversificare il prodotto finito sul mercato.

Per questo motivo negli ultimi anni, l'attenzione del mondo enologico si è rivolta verso l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* per ottenere un incremento della complessità aromatica contribuendo così positivamente alla composizione sensoriale e analitica del vino.

Alla luce di questo, in questo lavoro di ricerca si è valutata l'influenza di ceppi selezionati di *T. delbrueckii* in fermentazioni sequenziali con un nuovo ceppo nativo

di *S. cerevisiae* isolato dalle uve Verdicchio e migliorato mediante induzione alla sporificazione e successivamente selezione.

A tale scopo sono state condotte delle prove di mesofinificazioni in cantina valutando l'andamento fermentativo, i principali caratteri enologici, i più importanti metaboliti secondari e l'evoluzione dei principali composti volatili con l'obiettivo di individuare il contributo di *T. delbrueckii* e le interazioni con il ceppo di *S. cerevisiae*.

## CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

### 3.1. Allestimento microvinificazioni in duplicato a temperatura controllata

I ceppi di *T. delbrueckii* lievito impiegati in questo studio per le prove di vinificazione in bianco provengono dalla collezione del nostro dipartimento DiSVA e dalla Soc.Cop.Agr. Terre Cortesi Moncaro mentre i ceppi di controllo sono starter del commercio (tabella 1).

Specie	Ceppo
<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	<i>OKAI</i>
<i>S. cerevisiae</i> (controllo)	<i>Ibrido I4</i>
<i>T. delbrueckii</i>	<i>DiSVA 130</i>
<i>T. delbrueckii</i>	<i>DiSVA 254</i>
<i>T. delbrueckii</i>	<i>DiSVA 419</i>
<i>T. delbrueckii</i>	<i>Commerciale Terre Cortesi Moncaro</i>

Tabella 1: elenco dei ceppi di lievito utilizzati nelle prove di mesorovinificazione

L'azienda vitivinicola Terre Cortesi Moncaro ha messo a disposizione per l'allestimento delle prove di mesorovinificazioni in duplicato a temperatura controllata, contenitori in acciaio di 40 litri con mosto Pecorino (figura 13).



Figura 13: contenitore in acciaio di 40 litri contenente mosto di Pecorino

Nel mosto sono stati inoculati i seguenti lieviti:

Tesi 1 → controllo starter commercio *OKAI* ( $10^6$  cell/ml)

Tesi 2 → controllo ibrido *I4* ( $10^6$  cell/ml)

Tesi 3 → sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 130 ( $10^6$  cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo *I4* ( $10^6$  cell/ml)

Tesi 4 → sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 254 ( $10^6$  cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo *I4* ( $10^6$  cell/ml)

Tesi 5 → sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 419 ( $10^6$  cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo *I4* ( $10^6$  cell/ml)

Tesi 6 → sequenziale *T. delbrueckii* Commerciale fornita da Moncaro ( $10^6$  cell/ml)  
seguita dopo 72h da inoculo I4 ( $10^6$  cell/ml)

Per preparare la biomassa si è utilizzato per tutti i ceppi di lievito YPD liquido modificato:

-0,5 % yeast extract

-0,1 % peptone

-2 % glucosio

Le precolture sono state poi mantenute in agitazione in frangiflutti a 150 rpm e al termine la biomassa è stata raccolta tramite centrifugazione. L'inoculo del mosto è stato eseguito calcolando la concentrazione cellulare delle precolture mediante conta microbica totale con camera conta globuli di Thoma, da cui si è potuto stimare il volume dell'inoculo alla concentrazione desiderata ( $10^6$  cell/ml).

Il substrato utilizzato per la microvinificazione era mosto di Pecorino avente le seguenti caratteristiche:

- Baumè = 12,6 / 18° C (inserimento cartina acetato piombo)

- Brix = 22

- Babo = 18,95

- Azoto prontamente assimilabile = 69 ppm (portare APA a 150 ppm con aggiunta di 12g a tesi di DAP)

- Acidità totale = 6,16

- Ph = 3,28

- Acido malico = 2,8

### **3.2. Monitoraggio delle fermentazioni**

L'evoluzione delle fermentazioni, è stata seguita attraverso l'analisi periodica degli zuccheri residui con aerometro Baumè.

Per tutta la durata delle fermentazioni è stata fatta la valutazione dell'evoluzione della microflora fermentante mediante conte vitali su piastra con terreni generici e selettivi, eseguite al tempo 0 (momento dell'inoculo) e ad intervalli di diversi giorni per avere una stima precisa del numero di UFC/ml dei lieviti inoculati.

### **3.3. Analisi microbiologiche**

Per valutare la crescita dei lieviti in coltura mista durante la fermentazione, è stata effettuata per ciascuna prova la conta vitale su due differenti terreni: WL nutrient agar (per la determinazione dei lieviti *S. cerevisiae* e per la conta totale dei lieviti) e Agar lisina (per la determinazione dei lieviti non-*Saccharomyces*). Da ciascun bidone sono stati quindi effettuati i prelievi immediatamente dopo l'inoculo e dopo i vari giorni di fermentazione. Prima di effettuare le conte vitali sono state effettuate le diluizioni seriali (T0 -3/-4; T3 -4/-5; T6 -4/-5; T8 -4/-5). La medesima metodica di valutazione della microflora fermentante è stata la stessa per tutte le prove di fermentazione (figura 15).

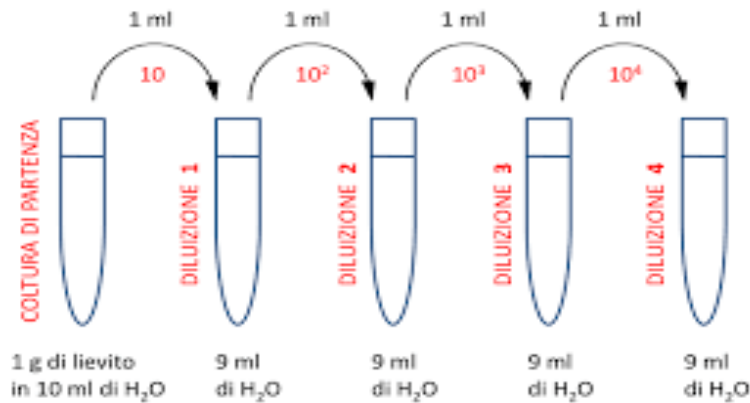


Figura 15: metodica diluizioni seriali

É stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo così una diluizione 1:10 ( $10^{-1}$ ). Dopo aver miscelato il contenuto della provetta con agitatore magnetico, si è prelevato da questa 1 ml di liquido e posto in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione desiderata. Successivamente sono stati trasferiti 100  $\mu$ l di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno adatto. Si prende poi una bacchetta di vetro ad "L"; la si immerge in alcool, si passa alla fiamma per asciugarla e la si fa raffreddare sul bordo della piastra e si procede allo spatolamento per diffusione cellulare (figura 16). Le piastre sono messe poi ad incubare a temperatura ambiente per due o tre giorni. Dopo il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute.



Figura 16: spatolamento per diffusione cellulare

### 3.4. Terreni di coltura

I terreni utilizzati per gli isolamenti e le conte sono:

#### 1) **WL Nutrient Agar**

Il terreno di coltura WL Nutrient Agar è un terreno molto ricco di nutrienti che consente di ottenere un numero maggiore di informazioni rispetto ad altri terreni di coltura utilizzati in microbiologia e permette la crescita delle principali specie di lievito presenti nelle successive fasi della vinificazione. Le colonie di lievito quando crescono su questo terreno assumono colorazione e/o morfologia diverse per cui sono facilmente riconoscibili. Nella maggior parte dei casi, il WL Nutrient Agar permette di definire il genere dei lieviti caratterizzanti il mosto analizzato, ma non permette una distinzione della specie. Il WL è uno strumento utile per monitorare la diversità nella popolazione dei lieviti durante la fermentazione e per individuare suoi eventuali cambiamenti quando vengono applicate particolari condizioni di processo. Il terreno è disponibile come miscela già pronta in polvere, che può essere facilmente pesata,



disciolta in acqua, sterilizzata in autoclave a 121 °C e distribuita nelle capsule Petri.

Il terreno è così composto:

- glucosio anidro 50g
- peptone da caseina 5g
- estratto di lievito 4g
- potassio fosfato monobasico 0,55g
- potassio cloruro 0,425g
- calcio cloruro 0,125g
- magnesio solfato 0,125g
- cloruro ferrico 0,0025g
- manganese solfato 0,0025g
- verde di bromocresolo 0,022g
- agar 12g
- acqua distillata q.b. a 1000 ml

## 2) **Agar Lisina**

Il terreno di coltura Agar Lisina è un terreno selettivo che inibisce la crescita del *S. cerevisiae* e consente la crescita di altri lieviti; infatti la lisina non è una fonte di azoto assimilabile dal *S. cerevisiae*, che quindi viene inibito nello sviluppo, mentre può essere metabolizzata da quasi tutte le altre specie di lievito della vinificazione. Per preparare il terreno occorre versare i grammi di terreno Lysine Medium in una bottiglia contenente acqua autoclavata. Dopo aver agitato bene aggiungere per ogni 100 ml di terreno, 1 ml di potassio lattato 50%. Agitare nuovamente per distribuire

uniformemente il potassio lattato. Scaldare al microonde e agitare bene per eliminare la torbidità. Lasciare raffreddare la bottiglia con il terreno in un bagno termostatico fino a 50°C ed aggiungere, per ogni 100 ml di terreno, 0,1 ml di acido lattico 10%. Agitare bene e piastrare sulle Petri. Il terreno Agar Lisina è così composto:

-destrosio= 44,5 g

-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1,78 g

-MgSO<sub>4</sub> = 0,89 g

-CaCl<sub>2</sub> = 0,178 g

-NaCl = 0,089 g

-adenina = 1,78 mg

-DL-Metionina = 0,891 g

-L-Istidina = 0,891 g

-DL-Triptofano = 0,891 g

-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 8,9 µl

-ZnSO<sub>4</sub> = 35,5 µl

-MoNH<sub>4</sub> = 17,8 µl

-FeSO<sub>4</sub> = 222,5 µl

-lisina = 1g

-inositolo = 0,02g

-calcio pantotenato = 0,002 g

-aneurina = 0,4 mg

-piridossina = 0,4 mg  
-riboflavina = 0,2 mg  
-p-aminobenzoico = 0,2 mg  
-acido nicotinico = 0,4 mg  
-biotina = 2  $\mu$ l  
-acido folico = 1  $\mu$ l  
-potassio lattato 50% = 10 ml  
-acido lattico 10% = 1 ml  
-agar = 17,8 g  
-acqua q.b a 1000 ml

### **3.5. Analisi degli alcoli superiori**

La preparazione del campione prevede la filtrazione di 10 ml di vino con filtro cut-off 0,2  $\mu$ l a cui si aggiunge 2  $\mu$ l di standard (1-pentanololo). A questo punto si procede all'analisi mediante gas-cromatografia (Figura 17). La calibrazione del sistema analitico è stata effettuata mediante una curva di taratura ottenuta dall'iniezione di soluzioni standard contenente i composti volatili da analizzare a differente concentrazione. La determinazione gascromatografica degli alcoli superiori è stata quindi eseguita iniettando direttamente i campioni di vino precedentemente preparati in una colonna Zebron ZB-WAS Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150 °C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole

- iniettore: siringa hamilton iniettato 1 µl di campione;
- temperatura: 40 °C per 5 minuti fino a 150 °C, poi 5 °C per 5 minuti fino a 220 °C, infine 20 °C per due minuti
- gas vettore: Azoto.

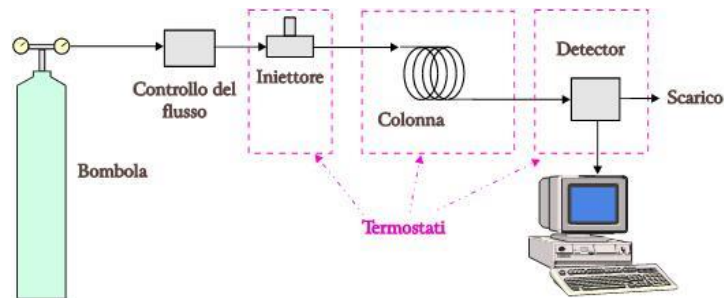


Figura 17: schema flusso analisi gascromatografica

### 3.6. Analisi dell'acidità totale

L'acidità totale viene espressa in g/l di acido tartarico (M.E. = 75). Viene misurata mediante titolazione con soluzione standard di una base e rilevazione del punto finale mediante pH-metro. Si inizia prelevando 25 ml da ogni campione; si mette in un beker e si immerge l'elettrodo nel vino, la cui temperatura deve essere il più possibile vicino a 20° C e si titola con NaOH. Si fa cadere l'idrossido di sodio goccia a goccia da una buretta (Figura 18) fino a raggiungere un pH stabile intorno a 7. A questo punto si prende nota della quantità di NaOH utilizzato nella titolazione. Poi applicando la formula seguente, si calcola il valore dell'acidità totale di ogni campione analizzato: Acidità totale (acido tartarico g/l) = ml NaOH x 0,75, dove:

ml NaOH= ml di titolante

0,75=fattore di correzione



Figura 18: buretta titolazione acidità totale vino

### 3.7. Analisi dell'acidità volatile

Si definisce acidità volatile di un vino la quantità di acido acetico presente nel vino, espressa in g/l di acido acetico. È importante determinare l'acidità volatile del vino perché la quantità di acido acetico presente è indice dello stato di sanità delle uve, di come procede la fermentazione e poi, in generale, dello stato di conservazione del vino. Infatti, l'acido acetico, si forma naturalmente in piccole quantità come prodotto secondario della fermentazione alcolica e della fermentazione malolattica; ma la sua quantità aumenta se le uve non sono sane, se non si usano lieviti selezionati, se il vino è soggetto alla malattia dello spunto acetico, di cui è il prodotto principale, o ad altre alterazioni microbiologiche causate da batteri eterolattici, di cui è il prodotto secondario, se si ha un'ossidazione dell'etanolo, dunque se il vino è eccessivamente a contatto con l'aria. L'acidità volatile viene determinata su un distillato del vino ottenuto per distillazione in corrente di vapore. È necessario distillare in corrente di vapore in quanto l'acido acetico ha un punto di ebollizione di  $118^{\circ}\text{C}$  ed è indispensabile l'effetto trascinante del vapore acqueo, in cui l'acido acetico è solubile,

per separarlo quantitativamente dal vino, senza surriscaldare e decomporre quest'ultimo. Non devono far parte dell'acidità volatile altri acidi volatili presenti nel vino come l'acido carbonico, altri acidi volatili presenti (acido formico, acido propionico, acido lattico) e la solforosa libera e combinata. L'interferenza dell'acido carbonico viene eliminata per agitazione del vino sottovuoto a freddo prima dell'analisi; l'interferenza degli altri acidi volatili viene eliminata da apposite bolle di rettifica presenti negli acidimetri che, rettificando i vapori, fanno ricondensare i vapori degli acidi interferenti, anche se non si elimina del tutto l'interferenza dell'acido lattico; la solforosa viene determinata successivamente per titolazione iodometrica sul distillato e detratta. Per determinare l'acidità volatile secondo la metodica di analisi ufficiale si utilizzano l'acidimetro ufficiale italiano. Fra gli acidimetri esistenti in commercio l'acidimetro Juffman (Figura 19) è uno dei più utilizzati perchè permette di fare misure veloci, ma comunque precise. L'acidimetro Juffman è un apparecchio che funziona elettricamente e che opera su 5 ml di vino; è composto dalle seguenti parti:

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

-mantello scaldante o piastra elettrica per scaldare il palloncino da distillazione in corrente di vapore;

-refrigerante

-beuta di raccolta del distillato

Si inizia mettendo acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo per metà o poco più del suo volume e innestare la corrente elettrica alla piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Attivare il refrigerante e mettergli sotto il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di vapore esce all'esterno del tubo di sicurezza, mettere nel palloncino da distillazione in corrente di vapore 5 ml di vino prelevati in modo esatto con una pipetta precedentemente avvinata. Chiudere con l'apposito tappo il palloncino e accendere il mantello scaldante per scaldare il vino. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, ruotare la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa il vino in ebollizione. Distillare 40 ml di vino, facendo attenzione che il livello del vino all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, abbassare il mantello scaldante o addirittura spegnerlo momentaneamente. Terminata la distillazione, spegnere il mantello scaldante il palloncino e riportare la valvola nella posizione di partenza in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; aspirare il vino esausto e le acque di lavaggio del palloncino nel recipiente di raccolta degli scarti. Alla fine si fa la determinazione dell'acidità volatile attraverso una titolazione acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0,02 N) in una buretta e 3 gocce di fenolftaleina come indicatore aggiunto nel beker del campione in modo tale da effettuare il viraggio del campione in un colore rosa vivo.



Figura 19: acidimetro di Juffman

### 3.8. Determinazione dell'acido malico

Il rilevamento dell'acido malico richiede due reazioni enzimatiche. Nella prima reazione catalizzata dalla L-malato deidrogenasi (L-MDH), l'acido malico è ossidato a ossalacetato dalla nicotinamide-adenina dinucleotide. Tuttavia, poiché l'equilibrio della reazione è saldamente a favore dell'acido malico e del  $\text{NAD}^+$ , è necessaria un'ulteriore reazione per “intrappolare” il prodotto NADH, e questo si ottiene con la conversione dell'ossalacetato in L-aspartato e 2-ossoglutarato, in presenza di un grande eccesso di L-glutammato, da parte della transaminasi glutammato-ossalacetato. La quantità di NADH formata nella reazione accoppiata è stechiometrica con la quantità di acido malico. Il NADH viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm. Determinare la differenza di assorbanza ( $A_2 - A_1$ ) sia per il bianco che per il campione. Sottrarre la differenza di assorbanza del bianco dalla differenza di assorbanza del campione, ottenendo così  $\Delta A_{\text{L-acido malico}}$ . Il valore di  $\Delta A_{\text{L-acido malico}}$  dovrebbe di regola essere di almeno 0,100 unità di assorbanza per ottenere risultati sufficientemente accurati. La concentrazione di acido L-malico può essere così calcolata=



$$C = (V \times MW / \epsilon \times d \times v) \times \Delta A_{L\text{-malico}} \text{ (g/l)}$$

dove:

V= volume finale (ml)

MW= peso molecolare dell'acido malico (g/mol)

$\epsilon$ = coefficiente di estinzione del NADH a 340 nm (6300)

d= corsa della luce (cm)

v= volume del campione (ml)

### **3.9. Determinazione dell'etanolo**

La preparazione del campione prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2  $\mu\text{m}$ , a cui si aggiunge uno standard interno, il 3-metil-2-butanolo ad una concentrazione di 10 ml/l. A questo punto si procede all'analisi mediante gas-cromatografia (GC) impiegando lo stesso apparecchio degli alcoli superiori. La calibrazione del sistema analitico è stata effettuata mediante una curva di taratura ottenuta dall'iniezione di soluzioni standard contenenti etanolo a differente concentrazione e lo standard interno.

Relativamente alla determinazione gascromatografica dell'etanolo, perciò, i campioni di vino filtrati (filtro cut-off 0.2  $\mu\text{m}$ ) sono stati iniettati direttamente utilizzando la colonna Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150 °C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ );
- iniettore: split 10:2; iniettato 1  $\mu\text{l}$  di campione;

- temperatura: 40 °C per 5 minuti fino a 150 °C, poi 5 °C per 5 minuti fino a 220 °C, infine 20 °C per due minuti
- gas vettore: Azoto.

### 3.10. Determinazione dell'ammonio

Per la determinazione dello ione ammonio ho utilizzato un kit enzimatico della ditta Roche. La confezione del kit conteneva:

- un flacone con all'interno 50 tavolette di NADH (circa 0,4 mg di NADH per ogni tavoletta);
- un flacone con 60 ml di buffer e  $\alpha$ -chetogluatarato (pH 8.0);
- un flacone contenente una soluzione di glutammato deidrogenasi (1,2 ml) ;
- un flacone con una soluzione di controllo.

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



### *Modalità di esecuzione*

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

	<b>BIANCO</b>	<b>CAMPIONE</b>	<b>CONTROLLO</b>
<b>Miscela di reazione</b>	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
<b>Campione</b>	-	100 µl	-
<b>Acqua</b>	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml
<b>Soluzione di controllo</b>	-	-	100 µl

Le cuvette sono state poi ricoperte con parafilm ed agitate, dopodiché sono state fatte riposare per 5 minuti ad una temperatura di circa 20-25 °C ed è stata letta l'assorbanza a 340 nm. Successivamente ad ogni cuvetta sono stati aggiunti 20 µl di soluzione contenente la glutammato deidrogenasi; dopo averle agitate, capovolgendole dolcemente, sono stati attesi circa 20 minuti affinché la reazione fosse completata ed è stata letta ed annotata l'assorbanza finale a 340 nm.

### Calcoli

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

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

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

### 3.11. Determinazione della solforosa

La quantità di SO<sub>2</sub> presente in un campione può essere determinata nel modo seguente:

si versano, in una beuta da 1000 ml, 50 ml di vino, si aggiungono 3 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% e 5 ml di Salda d'amido al'1%;

si titola con Iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione blu (si indica con a il volume in ml di Iodio aggiunto);

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

si aggiungono 8 ml di NaOH 4N, si attendono 5 minuti a beuta chiusa e si aggiungono 10 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%;

si titola con Iodio N/20 (0,005 N) fino a colorazione blu (si indica con a<sup>1</sup> il volume in ml di Iodio aggiunto);

si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b<sup>1</sup> il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto);

si aggiungono 20 ml di NaOH 4N (si attendono 5 minuti a beuta chiusa) circa 200 ml di acqua fredda e 30 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%;

si titola con Iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione azzurra (si indica con a<sup>2</sup> il volume in ml di Iodio aggiunto);

si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b<sup>2</sup> il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto).

Con le seguenti formule è possibile calcolare la solforosa presente nel campione (in mg/l):  $SO_2 \text{ libera} = a - (0,1 \times b) \times 32$

$$SO_2 \text{ combinata} = a^1 - (0,1 \times b^1) \times 32 + a^2 - (0,1 \times b^2) \times 32$$

$$SO_2 \text{ totale} = SO_2 \text{ libera} + SO_2 \text{ combinata}$$

### 3.12. Determinazione dei volatili

La valutazione della componente volatile è stata determinata mediante la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). La SPME è una tecnica che può essere eseguita secondo due tipologie: ad immersione diretta SPME (DI-SPME) o in spazio di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita secondo la tipologia della tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME) utilizzando la fibra a tripla fase *divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)* (Figura 20).



Figura 20: fibra a tripla fase divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano

Una piccola aliquota di campione (5 ml) viene degassato per mezzo di un agitatore meccanico, successivamente il campione viene posto in una vial con tappo di teflon, dove viene aggiunto 1,5 g di NaCl e posta in termostato a 50°C per 10 minuti. Dopo

questa sosta si aggiunge lo standard interno, che per la rilevazione della componente volatile è il 3-ottanolo, viene poi inserita la siringa attraverso il tappo e spinta la fibra. L'intero sistema viene posto in termostato a 50°C per 30 minuti. Con la fibra pronta si è passati all'analisi mediante gas-cromatografia (GC). L'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo sempre con la fibra retratta; è stato premuto lo stantuffo, esponendo la fibra nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna; il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è stato di circa 5 minuti, per far in modo che tutti gli analiti avessero il tempo di essere desorbiti. Infine la fibra è stata retratta in ago e l'ago rimosso.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

- temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;
- colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);
- iniettore: splitless 60 sec.;
- temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

## CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

Al fine di valutare l'effettivo contributo di *T. delbrueckii* sul prodotto finale sono stati valutati i seguenti parametri: evoluzione popolazione microbica, andamento fermentativo, pH, acidità volatile e totale, etanolo, zuccheri residui, acido malico, alcoli superiori e componente volatile

### 4.1. Evoluzione popolazione microbica

La cinetica di crescita dei ceppi starter *S. cerevisiae* (*Okay* e *Ibrido I4*) (Figura 21 e Figura 22) mostra il massimo dello sviluppo microbico al terzo giorno di fermentazione raggiungendo una concentrazione cellulare di circa  $10^8$  cell/ml (*Okay*) e  $10^7$  cell/ml (*Ibrido I4*) per poi mostrare una costante riduzione della produzione in biomassa fino al termine della fermentazione.

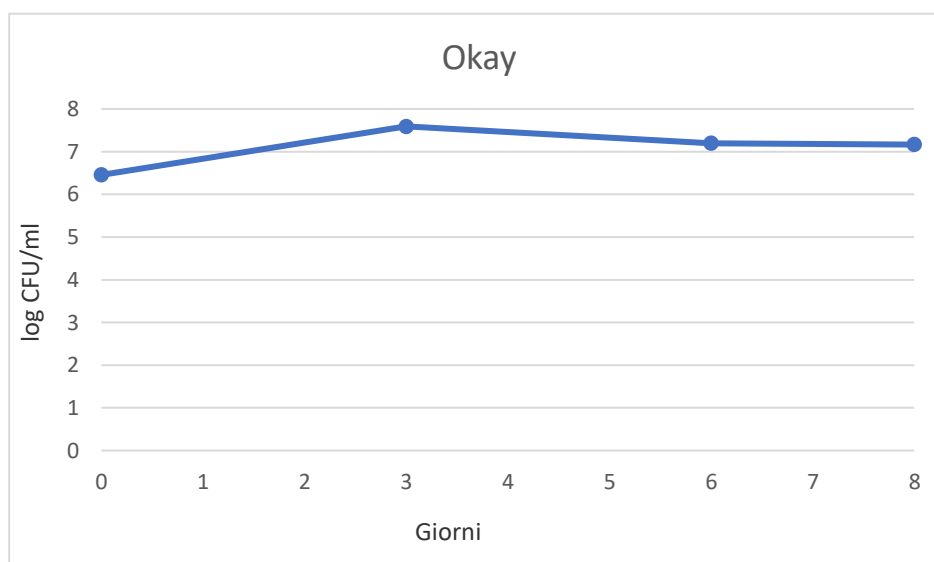


Figura 21: Cinetica di crescita *S. cerevisiae* Okay

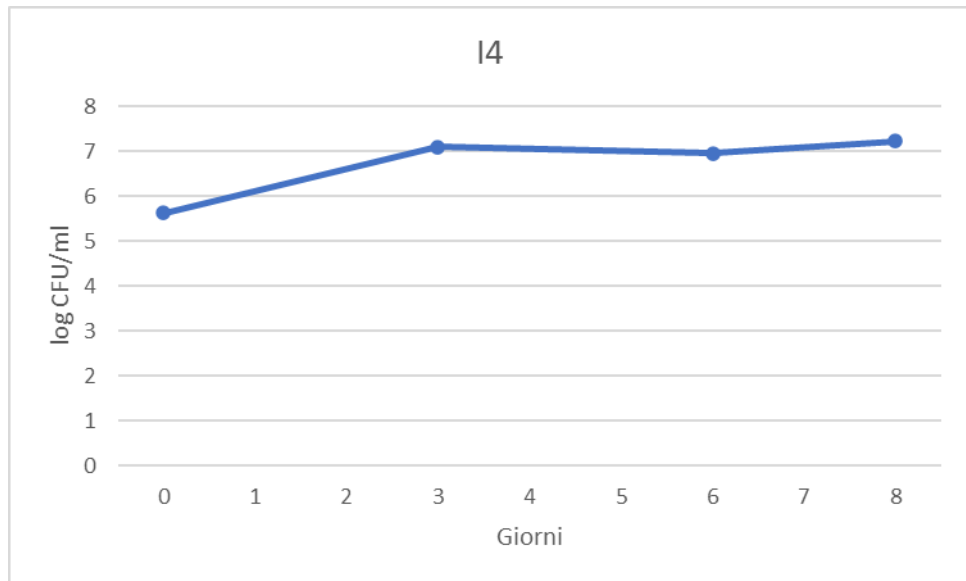


Figura 22: Cinetica di crescita *S. cerevisiae* Ibrido I4

Le prove condotte con il ceppo *T. delbrueckii* Disva 130 (Figura 23) hanno mostrato una cinetica di crescita con un picco di sviluppo microbico al terzo giorno per poi mostrare una costante riduzione della sua crescita fino al termine della fermentazione. *S. cerevisiae* I4, inoculato al terzo giorno di fermentazione, ha mostrato un andamento di crescita costante fino a fine fermentazione, andando a sottolineare una competizione con *T. delbrueckii*. La fermentazione sequenziale è stata poi portata a termine da *S. cerevisiae* intorno al 56esimo giorno.



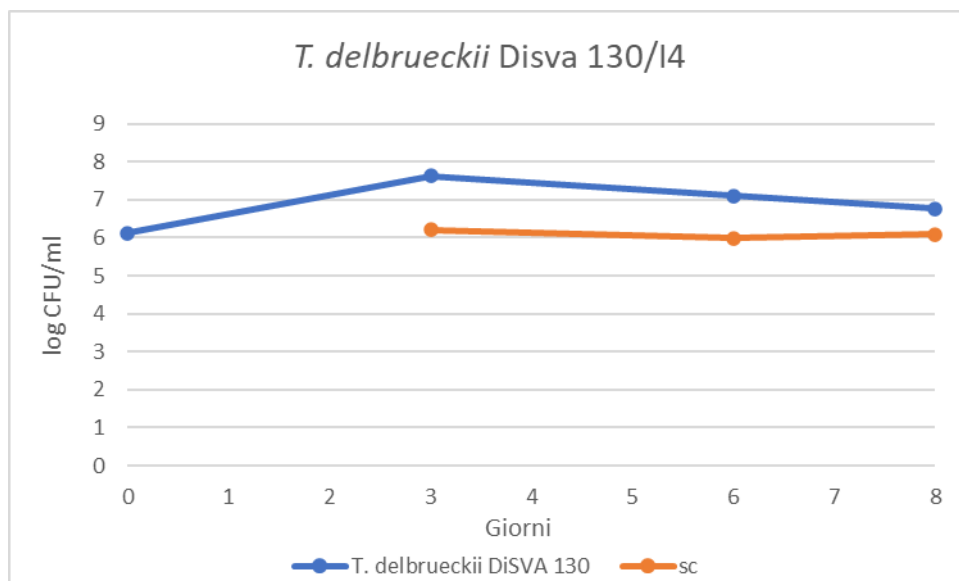


Figura 23: Cinetica di crescita della fermentazione sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 130/14

La prova condotta con *T. delbrueckii* Disva 254 (Figura 24) ha mostrato invece, un incremento della sua crescita più limitato rispetto a *T. delbrueckii* Disva 130 in quanto il valore massimo raggiunto al terzo giorno è stato di  $10^7$  cell/ml rispetto a *T. delbrueckii* Disva 130 che al medesimo tempo di fermentazione ha raggiunto  $10^8$  cell/ml della fermentazione. *S. cerevisiae* inoculato al terzo giorno ha esibito un andamento costante. La fermentazione sequenziale è stata poi portata a termine da *S. cerevisiae* intorno al 56esimo giorno.

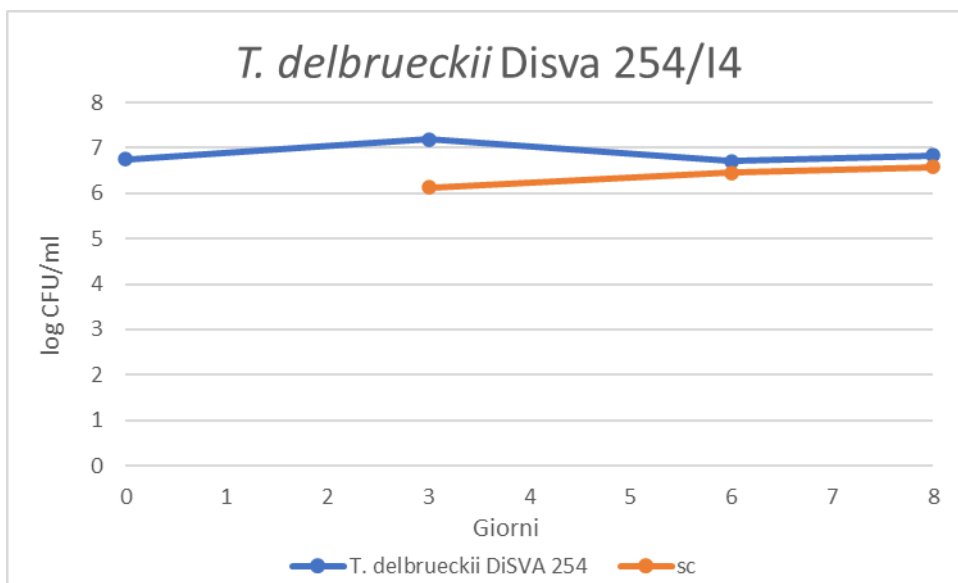


Figura 24: Cinetica di crescita della fermentazione sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 254/I4

L'evoluzione della popolazione microbica della fermentazione condotta con *T. delbrueckii* Disva 419 (Figura 25) ha mostrato un andamento costante per tutto il corso della fermentazione. La fermentazione sequenziale è stata poi portata a termine da *S. cerevisiae* intorno al 56esimo giorno.

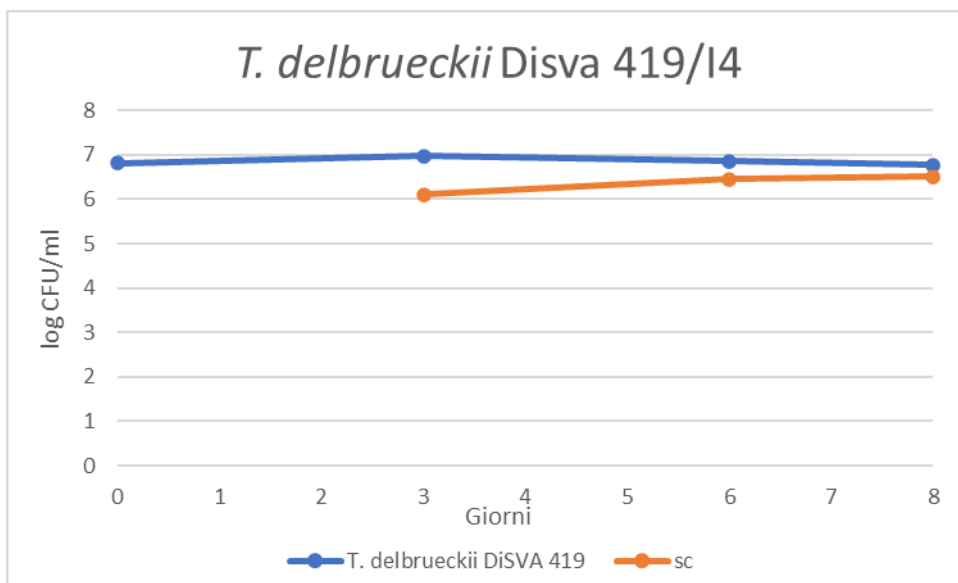


Figura 25: Cinetica di crescita della fermentazione sequenziale *T. delbrueckii* DiSVA 419/I4

La prova condotta con il ceppo *T. delbrueckii* (Figura 26) fornita da Terre Cortesi Moncaro ha mostrato un incremento costante del suo sviluppo fino al terzo giorno per poi ridursi progressivamente verso la fine della fermentazione. La fermentazione sequenziale è stata poi portata a termine da *S. cerevisiae* intorno al 56esimo giorno.

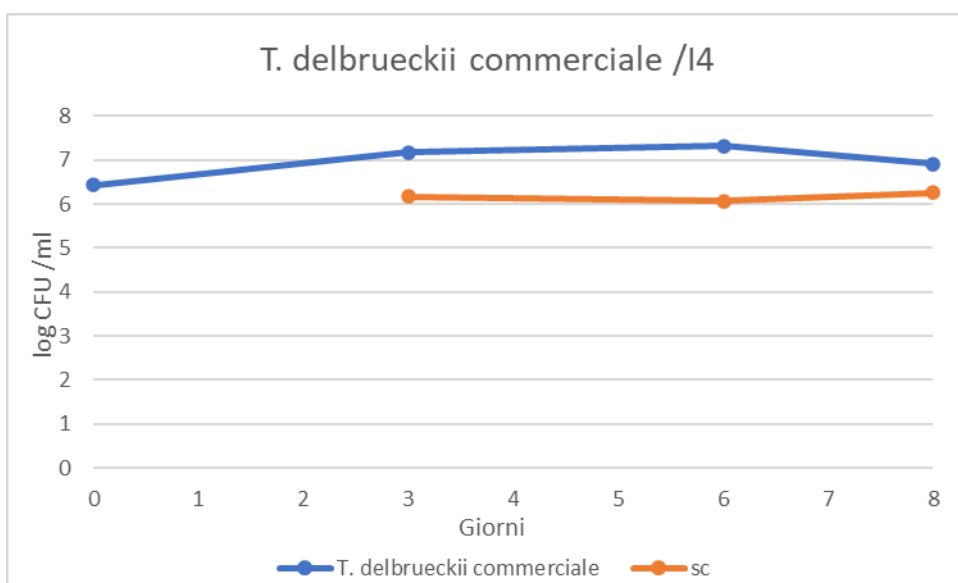


Figura 26: Cinetica di crescita della fermentazione sequenziale *T. delbrueckii* commerciale /I4

Tutte le fermentazioni sequenziali condotte con *T. delbrueckii* hanno evidenziato evoluzione della popolazione microbica di *S. cerevisiae* Ibrido I4 più contenuta ed in alcuni casi limitata, andando a sottolineare che in fermentazione mista sembrerebbe subire l'effetto del lievito non-*Saccharomyces*. Infatti, in fermentazione pura, *S. cerevisiae* I4 ha mostrato una evoluzione di biomassa paragonabile a quella del ceppo starter *S. cerevisiae* Okay.

### **4.3. Cinetica fermentativa**

La cinetica fermentativa, ottenuta dal consumo degli zuccheri nel corso della fermentazione, mostra che *S. cerevisiae* Okay ha esibito una cinetica fermentativa più veloce rispetto le altre fermentazioni. Infatti, tale ceppo dopo 12 giorni di fermentazione aveva consumato tutto lo zucchero presente nel substrato. Cinetica simile è stata esibita da *S. cerevisiae* I4. I ceppi *T. delbrueckii* Disva 130 e *T. delbrueckii* commerciale hanno mostrato un minor vigore fermentativo rispetto ai ceppi *S. cerevisiae* arrivando a 6 g/l di zuccheri residui dopo 56 giorni di fermentazione. La tesi condotta con *T. delbrueckii* DiSVA 419, ha mostrato dopo 56 giorni di fermentazione un contenuto in zuccheri pari a 22,8 g/l. Infine, *T. delbrueckii* DiSVA 254 è quello caratterizzato da minor vigore fermentativo, in quanto la tesi inoculata dal medesimo ceppo mostrava al termine dei 56 giorni di fermentazione un contenuto in zuccheri pari a 22,8 g/l. Dal grafico si evince che *T. delbrueckii* DiSVA 254 e DiSVA 419, entrambe isolate da matrici ambientali del Camerun, hanno mostrato un medesimo andamento fermentativo.

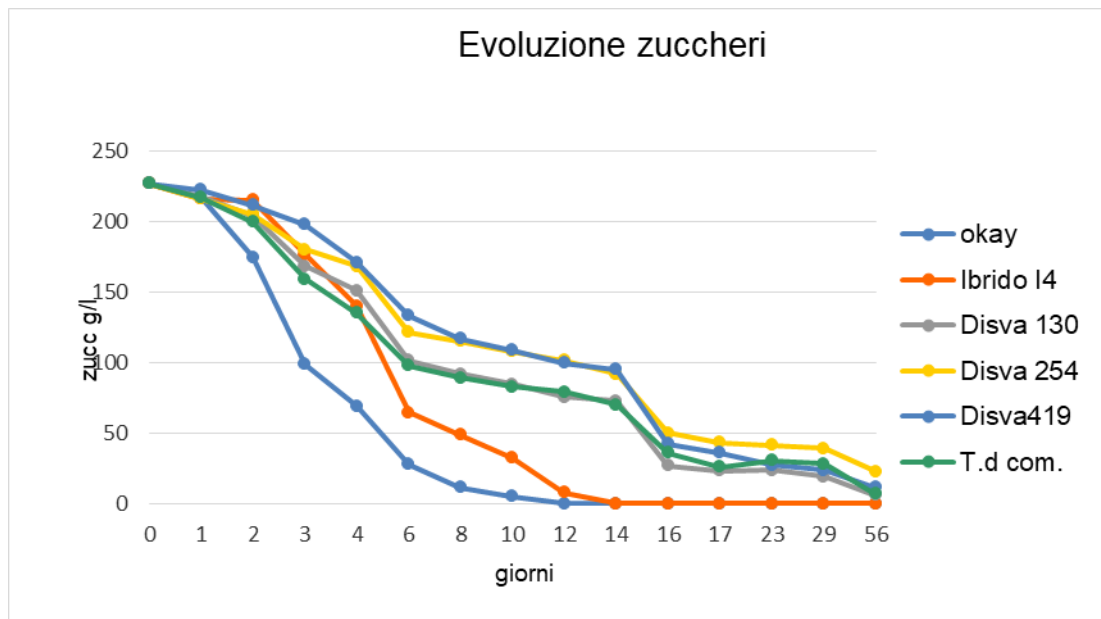


Figura 27: Evoluzione degli zuccheri durante la fermentazione

#### 4.3. Acidità totale, acidità volatile, pH, SO<sub>2</sub> e Acido Malico

Il pH e l'acidità volatile (Tabella 2) sembrano non essere influenzati dalla presenza dei ceppi di lievito non-*Saccharomyces*. Al contrario, il valore di acidità totale dei vini ottenuti con *T. delbrueckii* DiSVA 254 e *T. delbrueckii* DiSVA 419 ha mostrato un incremento di circa 2-3 g/l rispetto alle altre tesi. Per quanto riguarda il contenuto di acido malico non si notano particolari differenze ad eccezione della diminuzione rispetto agli altri ceppi nella tesi inoculata con ceppo *T. delbrueckii* Disva 130 (0,1 g/l di acido malico), dovuto al fatto che è l'unica tesi ad aver svolto la fermentazione malolattica.

	Acidità totale g/l espressa in acido tartarico	Acidità volatile g/l acido acetico	pH	SO <sub>2</sub> g/l	Acido malico g/l
<b>Okay</b>	6,5±0,09	0,29±0,02	3,22±0,04	70±28,2	1,85±0,07
<b>Ibrido I4</b>	5,72±0,29	0,27±0	3,32±0,03	184±1,41	1,85±0,07
<b><i>T. delbrueckii</i> Disva 130/I4</b>	5,28±0,02	0,27±0,02	3,32±0,01	52±2,82	0,1±0,00
<b><i>T. delbrueckii</i> Disva 254/I4</b>	8,25±0,01	0,24±0	3,09±0	48,5±0,70	2,5±0,00
<b><i>T. delbrueckii</i> Disva 419/I4</b>	8,13±0,05	0,27±0	3,14±0	64±5,3	2,3±0,00
<b><i>T. delbrueckii</i> commerciale/I4</b>	6,7±0,04	0,25±0	3,24±0,01	55,5±0,70	1,25±0,21

Tabella 2: Acidità totale, acidità volatile, pH, SO<sub>2</sub> e acido malico di vini ottenuti dalle varie fermentazioni

#### 4.4. Etanolo

Per quanto riguarda il contenuto in etanolo le fermentazioni condotte con *T. delbrueckii* commerciale e *Ibrido I4* sono quelli che hanno esibito un maggiore contenuto di etanolo (13,03 % v/v e 12,9 % v/v di etanolo). I ceppi Okay, *T. delbrueckii* DiSVA 130 hanno sostanzialmente sviluppato il medesimo contenuto di etanolo mentre il ceppo *T. delbrueckii* DiSVA 254 e DiSVA 419 sono stati quelle con la minor produzione di etanolo dovuto al fatto che al rilevamento dei dati le fermentazioni non risultavano ancora concluse (Figura 28).

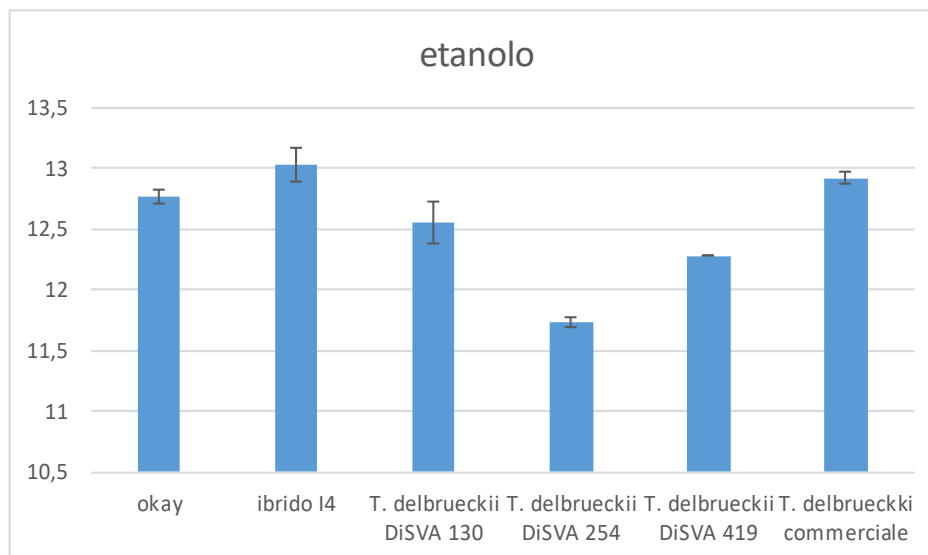


Figura 28: Contenuto di etanolo nei vini ottenuti dalle varie fermentazioni

#### 4.5. Evoluzione dei principali prodotti di fermentazione

Andando a valutare l'evoluzione dei principali prodotti di fermentazione, *S. cerevisiae* Okay mostra un aumento della produzione di acetaldeide (Figura 29) nel corso della fermentazione per poi ridursi al 56esimo giorno. *S. cerevisiae* Ibrido I4 ha mostrato un incremento della produzione di acetaldeide fino al giorno 8 per poi ridursi sul finire della fermentazione. *T. delbrueckii* DiSVA 130 registra un picco di acetaldeide al giorno 6 per poi diminuire sensibilmente al giorno 56. *T. delbrueckii* DiSVA 254 mostra un incremento di acetaldeide fino al terzo giorno per poi ridursi progressivamente. *T. delbrueckii* DiSVA 419 mostra un comportamento simile agli altri ceppi di *T. delbrueckii*. Il picco di acetaldeide viene raggiunto al terzo giorno di fermentazione per poi ridursi al giorno 56. *T. delbrueckii* ceppo commerciale ha mostrato un contenuto di acetaldeide più basso fin dal terzo giorno di fermentazione, rispetto a tutte le altre fermentazioni sequenziali, anche se a fine fermentazione il

contenuto di acetaldeide è paragonabile in tutte le fermentazioni sequenziali. L'unica fermentazione che ha evidenziato un contenuto di acetaldeide più elevato, è stata la fermentazione condotta con *S. cerevisiae* I4 anche se, a fine fermentazione, risultava comunque bassa (inf. Ai 25 mg/l).

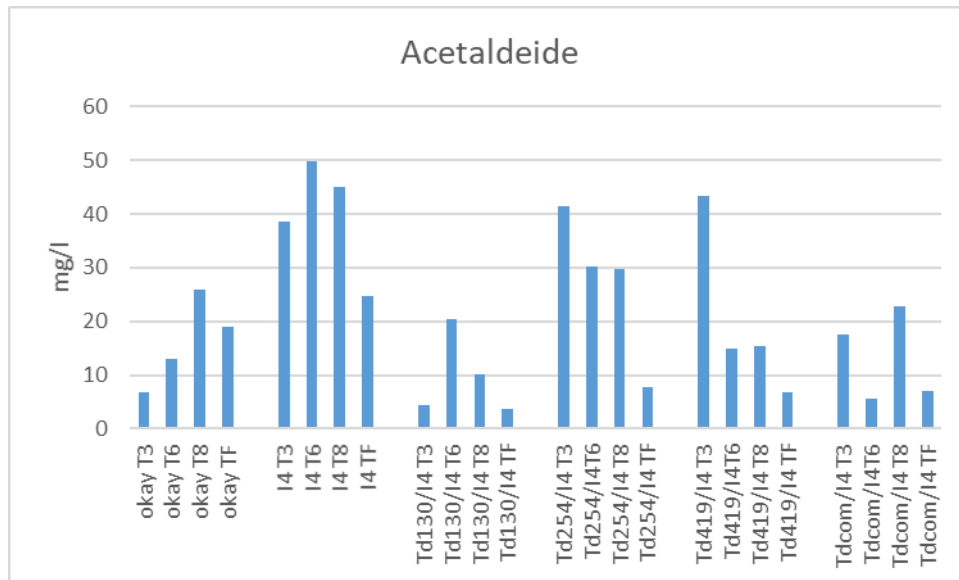


Figura 29: evoluzione dell'acetaldeide durante la fermentazione.

La produzione di etilacetato (Figura 30) da parte di *S. cerevisiae* Okay ha mostrato un andamento pressoché costante durante tutta la fermentazione, per poi ridursi a fine fermentazione. Nella fermentazione con *S. cerevisiae* I4, la concentrazione di etil acetato è andata crescendo fino a fine fermentazione.

Per quanto riguarda le fermentazioni sequenziali, si può notare dalla figura 30 una differente tendenza. Infatti, *T. delbrueckii* DiSVA 130 ha mostrato un aumento del contenuto di etilacetato fino al giorno 6 per poi diminuire sul finire della fermentazione. Il contenuto di etilacetato nella tesi inoculata con *T. delbrueckii* DiSVA 254 ha mostrato un andamento costante fino al giorno 56. Per quanto riguarda la fermentazione condotta con *T. delbrueckii* 419 e *T. delbrueckii*



commerciale, entrambe le fermentazioni hanno mostrato un incremento di tale composto lungo tutta la fermentazione.

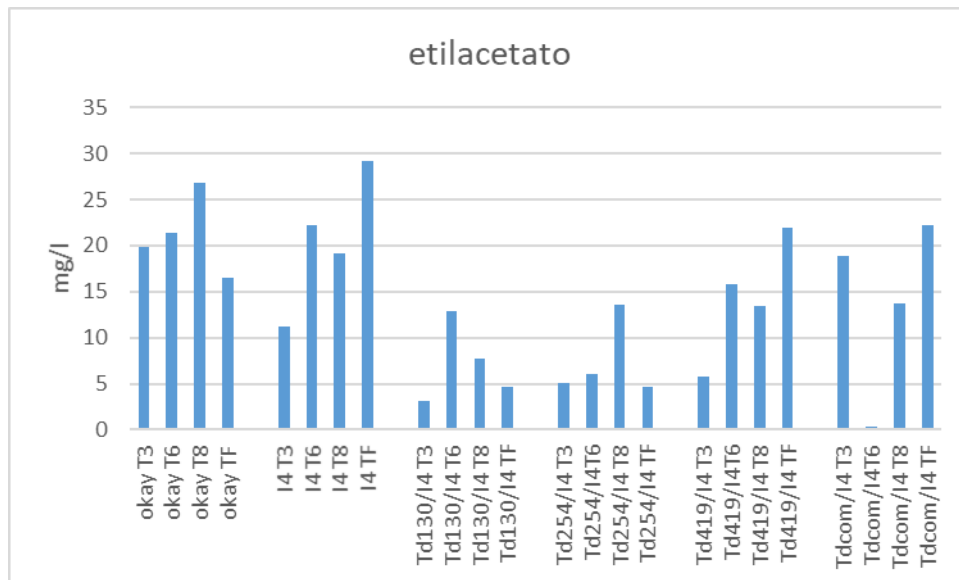


Figura 30: evoluzione dell'etilacetato durante la fermentazione.

Il contenuto di propanolo (Figura 31) in *S. cerevisiae* Okay è pressoché costante nel corso della fermentazione, come anche per le fermentazioni condotte con *T. delbrueckii* 254, 419 e il ceppo commerciale. Nella tesi condotta da *S. cerevisiae* I4 il propanolo aumenta fino al giorno 6 di fermentazione per poi diminuire fino all'ottavo giorno e riprendere ad aumentare fino al 56 giorno. Tra le fermentazioni analizzate è *S. cerevisiae* I4 è l'unico ceppo che ha evidenziato il contenuto di propanolo più elevato, tra tutte le fermentazioni analizzate.

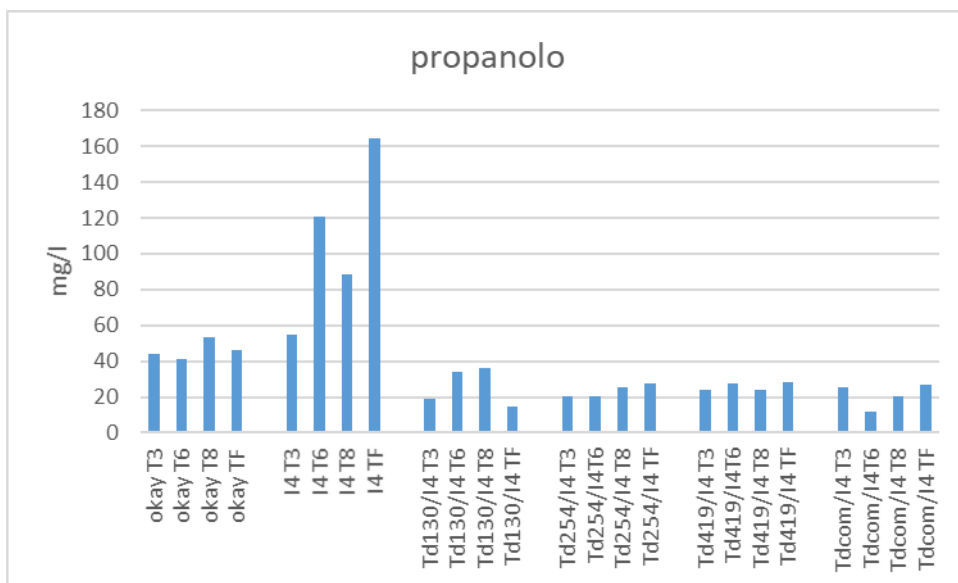


Figura 31: evoluzione del propanolo durante la fermentazione.

Il contenuto di isobutanolo (Figura 32) mostra un contenuto di tale composto paragonabile in tutte le fermentazioni e con un incremento durante tutto il corso della fermentazione.

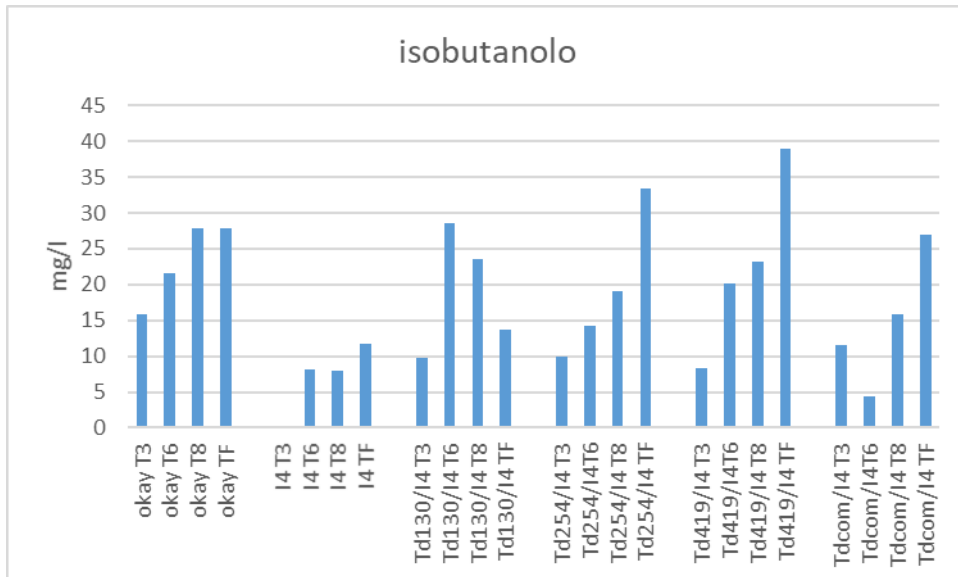


Figura 32: evoluzione dell'isobutanolo durante la fermentazione.

Il contenuto di amilicoattivo (Figura 33) in *S. cerevisiae* Okay è costante nel corso della fermentazione. Nella tesi condotta da *S. cerevisiae* I4 il contenuto di isoamilico invece, aumenta dall'inizio alla fine della fermentazione mantenendo comunque una concentrazione inferiore rispetto a tutte le tesi analizzate. *T. delbrueckii* DiSVA 130 ha mostrato un picco di tale composto al sesto giorno per poi diminuire nel corso della fermentazione. Nelle tesi condotte da *T. delbrueckii* DiSVA 254, *T. delbrueckii* DiSVA 419 e *T. delbrueckii* commerciale la concentrazione di tale composto è andata via via crescendo durante la fermentazione indicando la progressiva e crescente attività metabolica della coltura di *S. cerevisiae* inoculata in successione.

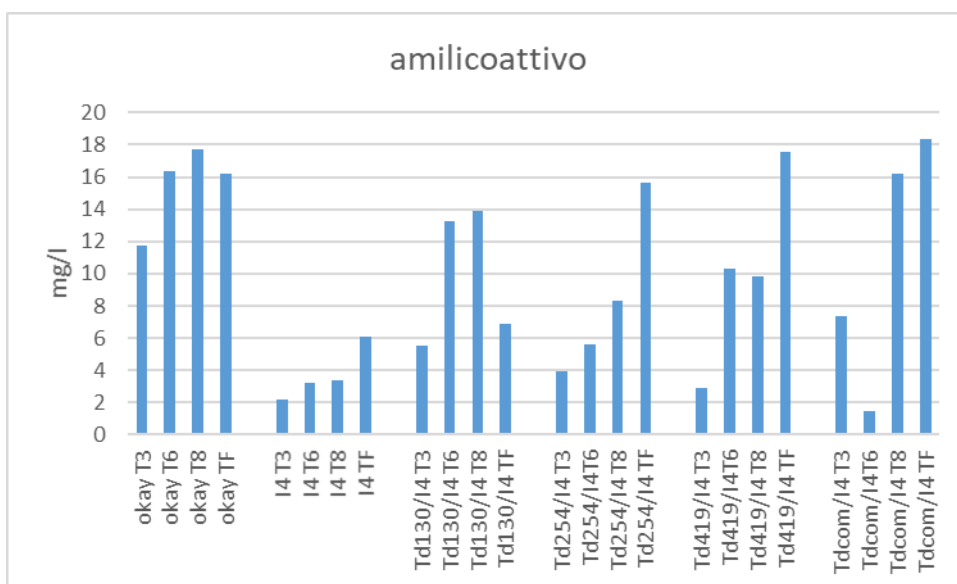


Figura 33: evoluzione dell'amilicoattivo durante la fermentazione.

Il contenuto di alcol isoamilico (Figura 34) ha ricalcato l'andamento dell'amilico attivo in tutte le prove.

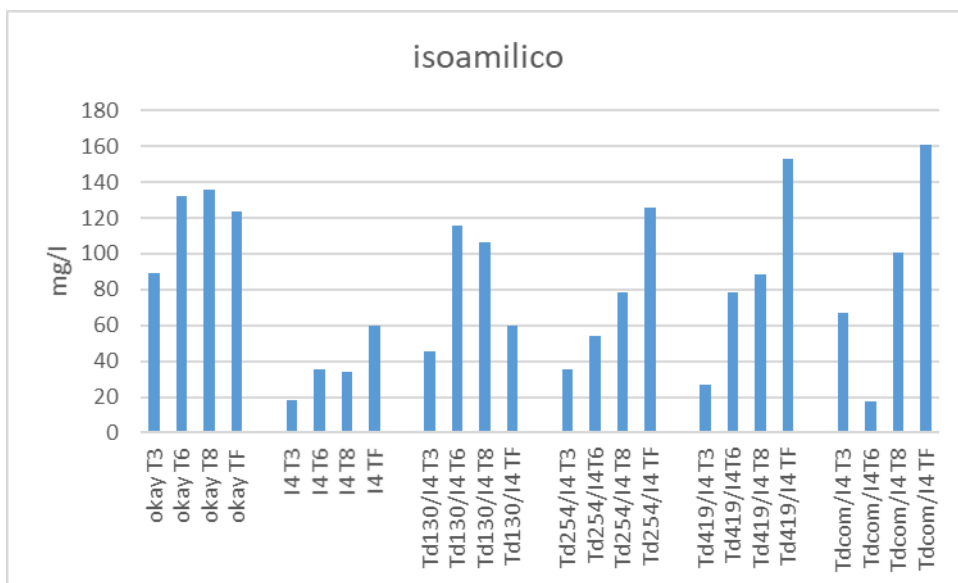


Figura 34: evoluzione dell'isoamilico durante la fermentazione.

#### 4.6. Evoluzione dei principali composti volatili

I principali composti volatili (tabella 3), responsabili del bouquet aromatico del vino sono stati analizzati al terzo giorno di fermentazione, prima dell'inoculo di *S. cerevisiae* nelle fermentazioni sequenziali per valutare l'apporto dei diversi ceppi di *T. delbrueckii*, e nelle colture pure di *S. cerevisiae*.

TESI	ETILBUTIRRATO MG/L	DI ACETATO ISOAMILE MG/L	DIETILSUCCINATO MG/L	NEROLO MG/L	2-FENILETANOLO MG/L	ACIDO DECANOICO MG/L
<i>S. CEREVISIAE</i> OKAY 3G	0,082	0,041	0,670	0,049	10,94	0
<i>S. CEREVISIAE</i> OKAY F.	0,106	0,322	0,912	0,042	20,00	0,258
<i>S. CEREVISIAE</i> IBRIDO I4 3G	0,249	1,175	0	0,124	3,51	0

<b>S. CEREVISIAE IBRIDO I4 F.</b>	0,301	2,541	2,243	0,166	26,1	0,080
<b>T. DELBRUECKII DISVA 130/I4 3G</b>	0,168	0,115	0	0	10,95	0,027
<b>T. DELBRUECKII DISVA 130/I4 F.</b>	0,175	0,119	0	0	25,74	0,042
<b>TESI</b>	<b>Etilbutirrato mg/l</b>	<b>di Acetato isoamile mg/l</b>	<b>Diethylsuccinato mg/l</b>	<b>Nerolo mg/l</b>	<b>2-feniletanolo mg/l</b>	<b>Acido decanoico mg/l</b>
<b>T. DELBRUECKII DISVA 254/I4 3G</b>	0,041	0,232	0	0,109	5,04	0,015
<b>T. DELBRUECKII DISVA 254/I4 F.</b>	0,093	1,662	0	0	17,73	0,022
<b>T. DELBRUECKII DISVA 419/I4 3G</b>	0,14	0,2	0	0	1,4	0,005
<b>T. DELBRUECKII DISVA 419/I4 F.</b>	0,40	1,01	0	0	19,3	0,003
<b>T. DELBRUECKII COMMERCIALE/I4 3G</b>	0,022	0,082	0	0	10,69	0,1
<b>T. DELBRUECKII COMMERCIALE/I4 F.</b>	0,012	1,014	0	0	24,32	0,065
<b>MOSTO</b>	0,185	0	0	1,456	10,37	0,020

Tabella 3: evoluzione dei principali composti volatili

Per quanto riguarda la produzione di etilbutirrato (responsabile della nota fruttata di ananas) i ceppi *S. cerevisiae* hanno prodotto rispettivamente a fine fermentazione: *S. cerevisiae* Okay 0,106 mg/l e *S. cerevisiae* I4 0,301 mg/l. Tale ceppo ha mostrato un incremento nella produzione di tale composto già al terzo giorno di fermentazione rispetto al ceppo starter Okay.

Per quanto riguarda le fermentazioni condotte con i diversi ceppi di *T. delbrueckii*, *T. delbrueckii* 419 è stato il ceppo mostrato la maggiore produzione di etilbutirrato a fine fermentazione (0,40 mg/l). In tutte le tesi si è registrato comunque un aumento della concentrazione di etilbutirrato nel corso della fermentazione. La fermentazione condotta con *T. delbrueckii* 130 ha mostrato sì un aumento di tale composto a fine fermentazione ma già al terzo giorno aveva esibito il contenuto più alto di questo composto rispetto a tutte le altre tesi.

Per quanto riguarda la produzione di acetato di isoamile (aroma di banana), le tesi condotte con i ceppi *S. cerevisiae* Okay, *S. cerevisiae* I4 hanno mostrato un netto incremento di tale composto nelle fermentazioni condotte con *S. cerevisiae* I4. Per quanto riguarda le sequenziali, si nota come la fermentazione condotta con *T. delbrueckii* Disva 254 abbia mostrato il più alto contenuto di tale composto a fine fermentazione.

Il dietil succinato responsabile del caratteristico aroma di fruttato è stato prodotto soltanto dalle tesi condotte da *S. cerevisiae* Okay (0,912 mg/l) e *S. cerevisiae* I4 (2,243 mg/l). In entrambi i casi si è registrato un aumento della produzione nel corso del processo fermentativo. La produzione di nerolo è stata registrata solo nelle tesi condotte con *S. cerevisiae* Okay e *S. cerevisiae* I4 (0,166 mg/l). Il nerolo è un terpene che contribuisce al classico aroma floreale. Per quanto riguarda la produzione di 2-

feniletanolo (aroma di rosa), in tutte le tesi si è registrato un aumento costante nel corso della fermentazione con la maggior produzione da parte di *T. delbrueckii* Disva 130 (25,74 mg/l) e *S. cerevisiae* Okay (20 mg/l).

Infine, la concentrazione di acido decanoico risulta essere costante in tutte le tesi. Tra i composti volatili è quello presente in minore quantità e contribuisce ad una spiccata attività antagonista dei processi di fermentazione.

## **CAPITOLO 5: CONCLUSIONI**

L'ampio uso di un numero limitato di ceppi di *S. cerevisiae* come colture starter di fermentazione potrebbe standardizzare il profilo aromatico e analitico del vino. Per superare questo problema, l'uso di ceppi nativi selezionati di *S. cerevisiae* come colture starter di fermentazione potrebbe essere una strategia adatta. Un'altra strategia per migliorare la complessità dell'aroma del vino è l'uso di lieviti non-*Saccharomyces* nelle fermentazioni sequenziali. Infatti, diversi studi sottolineano l'uso di lieviti non-*Saccharomyces* nella vinificazione per le loro attitudini a produrre composti aromatici (come esteri, terpeni, tioli) e a modificare alcuni composti strutturali come polisaccaridi, acidità volatile e contenuto di etanolo. In questo lavoro di ricerca è stato valutato l'influenza di ceppi selezionati di *T. delbrueckii* in fermentazioni sequenziali con un nuovo ceppo nativo *S. cerevisiae* isolato dalle uve Verdicchio e migliorato mediante induzione alla sporificazione e successiva selezione per caratteri desiderati. A tale scopo sono state condotte delle prove di microvinificazioni in cantina valutando l'andamento fermentativo, i principali

caratteri enologici, i più importanti metaboliti secondari e l'evoluzione dei principali composti volatili con l'obiettivo di individuare il contributo di *T. delbrueckii* e le interazioni con il ceppo di *S. cerevisiae*. Dalle analisi delle cinetiche di crescita durante la fermentazione è emerso che si instaura una competizione tra i vari ceppi di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*. Durante la fermentazione mista *S. cerevisiae* è fortemente rallentato dalla presenza dei vari ceppi di *T. delbrueckii*, provocando così un rallentamento del processo fermentativo. Tale aspetto è stato confermato dalla prova della cinetica fermentativa dimostrando come i ceppi *S. cerevisiae* starter hanno consumato tutto lo zucchero presente nel mosto al termine del 12° giorno. Mentre gli altri ceppi di *T. delbrueckii* presentavano al termine del 56° giorno contenuti ancora elevati di zuccheri residui (es. *T. delbrueckii* DiSVA 254 mostrava 22,8 g/l di zuccheri). In un'altra prova di ricerca (Agarbati A. 2020) basata sempre sulle fermentazioni sequenziali in mosto di Verdicchio è stato rilevato un andamento diverso dei ceppi durante la fermentazione. In particolare *T. delbrueckii* Disva 130 ha raggiunto il picco al 2° giorno di fermentazione ( $10^6$  cell/ml) per poi ridursi progressivamente nel corso della fermentazione. *S. cerevisiae* Okay invece, non sembra essere stato influenzato dalla presenza di *T. delbrueckii*; ha raggiunto il picco di produzione di biomassa al 2° giorno di fermentazione per poi mantenere un andamento costante fino al termine della fermentazione. Il pH e l'acidità volatile sembrano non essere influenzati dalla presenza dei ceppi di lievito non-*Saccharomyces*. Al contrario, il valore di acidità totale dei vini ottenuti con *T. delbrueckii* DiSVA 254 e *T. delbrueckii* DiSVA 419 ha mostrato un incremento di circa 2-3 g/l rispetto alle altre tesi. Per quanto riguarda il contenuto di acido malico non si notano particolari differenze tra i vari ceppi. Per quanto riguarda la produzione di etanolo i ceppi *T. delbrueckii* commerciale e *Ibrido I4* sono quelli che hanno dato



vita a maggior produzione (13,03 g/l e 12,9 g/l di etanolo). Riguardo i principali composti secondari, si è visto che i ceppi *S. cerevisiae* starter hanno prodotto quantità maggiori di acetaldeide nel corso della fermentazione mentre per quanto riguarda gli altri prodotti secondari di fermentazione e alcoli superiori (acetaldeide, etilacetato, propanolo, isobutanolo, amilicoattivo, isoamilico) la loro produzione è stata inferiore durante tutto il processo fermentativo. I vari ceppi di *T. delbrueckii* al contrario, hanno prodotto una minor quantità di acetaldeide, registrando però in tutte le fermentazioni sequenziali un aumento costante della loro produzione degli altri alcoli superiori durante la seconda parte del processo di fermentazione. Per quanto riguarda i principali composti volatili invece, si è visto una spiccata produzione di acetato di isoamile e 2-feniletanolo in tutte le tesi. I ceppi che hanno dato vita ad una maggiore produzione sono stati rispettivamente *S. cerevisiae* Ibrido I4 (2,541mg/l di acetato di isoamile) e *T. delbrueckii* Disva 130 (25,74 mg/l di 2-feniletanolo). In tutte le tesi si sono comunque registrati dei buoni apporti di etilbutirrato, dietilsuccinato, nerolo e acido decanoico contribuendo al bouquet aromatico del vino finale.

Nel complesso i vini ottenuti dalle fermentazioni sequenziali hanno mostrato un profilo analitico e aromatico differente dai vini ottenuti con i ceppi *S. cerevisiae*, sottolineando l'apporto di tale lievito nel prodotto finito.

Ulteriori indagini saranno necessarie per capire l'interazione di diversi ceppi di *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* sia per quanto riguarda l'evoluzione della popolazione microbica sia nel comprendere i meccanismi regolatori alla base della produzione dei principali composti di fermentazione.

## 6. Bibliografia

- **Acmè M.** (2012). La nuova geografia del vino. In alto i calici: le temperature medie aumentano e spostano i vigneti in montagna e verso Nord. Arrivando fino in Svezia, n°11 di ITALIC, Aprile/Maggio, 25.
- **Agarbati, A., Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M.** (2020). Improved *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Pure and Sequential Fermentation with *Torulaspota delbrueckii* for the Production of Verdicchio Wine with Reduced Sulfites. *Applied Sciences*, 10(19), 6722.
- **Amerine, M. A.** (1954). Composition of wines. I. Organic constituents. *Advances in food research*, 5, 353-510.
- **Antonelli, A., Arfelli, G., Masino, F., & Sartini, E.** (2010). Comparison of traditional and reductive winemaking: influence on some fixed components and sensorial characteristics. *European Food Research and Technology*, 231(1), 85-91.
- **Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V.** (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.
- **Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S.** (2019). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation*, 5(3), 54.
- **Casini, L., Sottini, V. A., Dominici, A., Fabbrizzi, S., Gerini, F., & Romano, C.** (2020). Il mercato del vino nella Grande Distribuzione Organizzata in Italia.
- **Ciani, M., & Comitini, F.** (2011). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of microbiology*, 61(1), 25-32.

- **Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P.** (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.
- **Ciani, M., & Comitini, F.** (2019). Use of non-*Saccharomyces* yeasts in red winemaking. In *Red Wine Technology* (pp. 51-68). Academic Press.
- **Giovanna S, Rosanna T** (2018) *Microbiologia Enologica*. Edagricole, 2, 101-116.
- **Jolly, N. P., Augustyn, O. P. R., & Pretorius, I. S.** (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.
- **Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S.** (2000). Yeast and its importance to wine aroma-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97-129.
- **Lattanzio, V., & Ruggiero, P.** (2003). *Biochimica Agraria. Patron Editore, Bologna*, 631.
- **LAO, C., LÓPEZ-TAMAMES, E. L. V. I. R. A., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., BUXADERAS, S., & DE LA TORRE-BORONAT, M. D. C.** (1997). Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines. *Journal of food Science*, 62(6), 1142-1149.
- **Lorenzo, M. N., Taboada, J. J., Lorenzo, J. F., & Ramos, A. M.** (2013). Influence of climate on grape production and wine quality in the Rías Baixas, north-western Spain. *Regional Environmental Change*, 13(4), 887-896.
- **Martini, A.** (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine research*, 4(3), 165-176.

- **Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., & Suárez-Lepe, J. A.** (2020). Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine freshness. A review. *Biomolecules*, *10*(1), 34.
- **Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M., & Medina, M.** (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology*, *7*(3), 181-189.
- **Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A.** (2004). Trattato di Enologia I, Microbiologia del vino. *Vinificazioni. Edagricole, Bologna, Italy*.
- **Romano, P., Ciani, M., & Fleet, G. H. (Eds.)**. (2019). *Yeasts in the Production of Wine* (p. 515). New York, NY, USA:: Springer.
- **Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A.** (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International journal of food microbiology*, *86*(1-2), 169-180.
- **Romano, P.** (2005). Proprietà tecnologiche e di qualità delle specie di lieviti vinari. *Microbiologia del Vino. Casa Editrice Ambrosiana, Milan, Italy*, 101-131.
- **Tofalo, R., Schirone, M., Telera, G. C., Manetta, A. C., Corsetti, A., & Suzzi, G.** (2011). Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Annals of microbiology*, *61*(1), 57-66.
- **Romano, P., Fiore, C., & Capece, A.** (2005). Metodi per la caratterizzazione fenotipica di lieviti vinari In: *Microbiologia del vino. Eds. Vincenzini M., Romano P., Farris GA Casa Editrice Ambrosiana-Milano, Italia*, 435-450.

- **Zambonelli, C., Benevelli, M., Tini, V., & Coloretti, F.** (2004). Lieviti indigeni e fermentazioni scalari. *Vignevini: Rivista italiana di viticoltura e di enologia*, 31(11), 107-109.