ISIS PAOLINO D'AQUILEIA
DI CIVIDALE DEL FRIULI

Istituto Tecnico - Settore Tecnologico

Indirizzo "Agraria, agroalimentare e agroindustria" – Articolazione "Viticoltura ed Enologia"

TESI DEL CORSO DI SPECIALIZZAZIONE PER ENOTECNICO

Lieviti non convenzionali: uso nelle fermentazioni miste come strumento per migliorare la qualità dei vini

CANDIDATO
Marco Zuiani

Anno Scolastico 2022/2023

Sommario

1.0 INTRODUZIONE 1

2.0 IL PROCESSO DI FERMENTAZIONE 4

2.1 LA FERMENTAZIONE ALCOLICA 4
2.2 LA FERMENTAZIONE SPONTANEA 6
2.3 LE FERMENTAZIONI CONTROLLATE 8

3.0 LE FERMENTAZIONI MISTE 9

3.1 L'AUMENTO DELLE SOSTANZE AROMATICHE 10
3.2 LA RIDUZIONE DELL'ETANOLO 11
3.3 LA DISACIDIFICAZIONE NATURALE 13
3.4 IL BIOCONTROLLO E L'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA 14

4.0 INTERAZIONI TRA S. CEREVISIAE E LIEVITI NON- SACCHAROMYCES 16

4.1 GEN. *TORULOPSIS* 17
4.2 GEN. METSCHNIKOWIA 18
4.3 GEN. *LACHANCEA* 19
4.4 GEN. *HANSENIASPORA* 21
4.5 GEN. *SCHIZOSACCHAROMYCES* 22

5.0 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI 23

6.0 BIBLIOGRAFIA 26

1.0 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, le fermentazioni miste che avvengono in seguito all'inoculo sequenziale o il co-inoculo di lieviti selezionati non convenzionali, cioè appartenenti a generi non-*Saccharomyces*, con lieviti del genere *Saccharomyces*, stanno attirando sempre più l'attenzione di tecnici e ricercatori in ambito enologico. Questa nuova modalità di inoculo è risultata molto utile al fine di migliorare il profilo organolettico e tecnologico dei vini (Romano *et al*., 2022).

Uno dei vantaggi di questo tipo di fermentazioni è l'utilizzo sempre minore di additivi e coadiuvanti, permettendo all'operatore di simulare una fermentazione spontanea che avverrebbe ad opera di lieviti indigeni ma con ceppi di lieviti selezionati e inoculati. (Romano *et al*., 2022)

Tuttavia, i lieviti non-*Saccharomyces* possono produrre metaboliti che apportano un contributo sia positivo che negativo al vino, ad esempio:

- Positivi:
  - Glicerolo: composto non volatile che conferisce al vino sensazioni di morbidezza senza possedere proprietà aromatiche. (Assoenologi, https://www.assoenologi.it/enologonlinerubriche/glicerolo/);
  - Acidi Organici: fondamentali per la composizione, per la stabilità microbiologica, per la stabilità chimico-fisica e per le qualità sensoriali conferite (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017);
  - Polisaccaridi: inibiscono la precipitazione delle proteine e dei tartrati, garantiscono quindi un minore quantitativo di bentonite necessaria alla stabilizzazione (Gawel *et al.*, 2016). Tra i più rilevanti troviamo le mannoproteine, polisaccaridi derivanti dalla parete cellulare dei lieviti (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017).
- Negativi:
  - Acido acetico: componente principale dell'acidità volatile del vino, in quantità eccessive, conferisce sensazioni aromatiche. I limiti legali in Italia di questo acido sono 18 meq/L per i vini bianchi e rosati e 20 meq/l per i vini rossi. Può formarsi: dopo la fermentazione alcolica da parte dei lieviti che producono acido acetico in concentrazioni variabili a seconda del ceppo; in seguito alla fermentazione malolattica grazie alla degradazione dell'acido citrico da parte dei batteri lattici e

in seguito alla degradazione dell'etanolo da parte dei batteri acetici in condizioni di aerobiosi (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017);

- Etilacetato: da parte dei lieviti, durante la fermentazione alcolica, viene prodotto in piccole dosi. Se presente in quantità elevate, però, significa che è stato prodotto dai batteri acetici. Questo estere è il principale agente del difetto di acescenza nel vino. La sua soglia olfattiva è inferiore all'acido acetico di 200 volte circa. La sua soglia "*si situa attorno ai 160 mg/L, ma anche al di sotto di questo valore, senza essere identificabile sensorialmente, può denaturare il bouquet di un vino conferendogli una nota pungente, sgradevole*" (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017);
- Etilfenoli: presenti in maggiore quantità nei vini rossi, gli etilfenoli come il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo sono i principali responsabili dei difetti di stalla, scuderia e del difetto di affumicato. Derivano principalmente dall'invecchiamento in barrique già utilizzate anche se non è sempre una costante, perché "*si possono riscontrare vini rossi «fenolici» con barrique nuove e anche con vasche*" (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017).

Tra i primi a proporre questo tipo di fermentazioni vi fu Tommaso Castelli, il quale studiò la fermentazione mista con inoculo sequenziale di *Torulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* al fine di ridurre il contenuto di acidità acetico nel prodotto finale. Alcuni lieviti non-*Sacch.* possiedono delle attività enzimatiche specifiche come: quella proteasica, quella β-glucosidasica, quella esterasica, quella liasica, garantendo, così, la liberazione di svariati aromi.

Gli inoculi per fermentazioni miste possono essere condotti seguendo due modalità:

- <u>Co-inoculo</u>: ceppi di lieviti *Saccharomyces* e i non-*Saccharomyces* vengono inoculati in contemporanea. In questo caso, i lieviti non-*Saccharomyces* devono essere inoculati in alte concentrazioni cellulare per permettere loro di svilupparsi senza essere sovrastati dai ceppi di *Saccharomyces.*
- <u>Inoculo sequenziale</u>: ceppi di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* vengono inoculati a distanza di diverse ore. Per primi vengono inoculati lieviti non-*Saccharomyces* e successivamente, a distanza di 24-72 ore, i lieviti *Saccharomyces*. Questa operazione permette di far sviluppare i lieviti indigeni in condizioni normali, senza competizioni con *Saccharomyces*.

Un altro vantaggio portato dalle fermentazioni miste, che rende questa tecnica sempre più richiesta è la riduzione del quantitativo di alcol presente nel vino. A causa delle attuali condizioni climatiche e delle temperature medie annuali e stagionali sempre più alte, infatti, il contenuto zuccherino medio dei vini sta incrementando anche in zone dove, fino a qualche decennio fa, era necessario utilizzare tecniche di arricchimento per raggiungere il titolo alcolometrico volumico minimo richiesto dal Disciplinare di Produzione. L'alcol etilico influisce negativamente sulla percezione aromatica dei vini. A questo proposito, l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* garantirebbe un contenuto inferiore di etanolo grazie alla loro via fermentativa e attività respiro-fermentativa che determina un rendimento in alcol inferiore. Questa resa dipende molto dalla specie di lievito non-*Saccharomyces* . Si può rilevare, inoltre, un'ampia variabilità intraspecifica. I risultati dei vari studi hanno dimostrato come ceppi di lieviti indigeni selezionati, in condizioni di anaerobiosi o aerobiosi controllata con inoculo sequenziale di lieviti *Saccharomyces*, possono essere utilizzati per ridurre il quantitativo di alcol etilico finale nel vino. (Romano *et al*., 2022)

Il presente elaborato si prefigge lo scopo di approfondire i vantaggi delle fermentazioni miste nel vino, quali l'aumento delle sostanze aromatiche, la diminuzione del titolo alcolometrico volumico e la disacidificazione naturale. Inoltre, verranno presi in considerazione i risultati di recenti studi sperimentali e di campo relativi all'utilizzo combinato di diversi generi non-*Saccharomyces* con *Saccharomyces cerevisiae*.

2.0 IL PROCESSO DI FERMENTAZIONE

Secondo l'Unione Europea si definisce vino "*il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica totale o parziale di uve fresche, pigiate o no, o di mosti di uve*" (Gazzetta ufficiale, CE n. 1493/99). Di conseguenza si trae la conclusione che la fermentazione è necessaria al fine di produrre vino. A seconda dei lieviti che intervengono nel processo e della loro provenienza, le fermentazioni possono essere controllate, miste spontanee e miste controllate; queste ultime saranno oggetto di approfondimento in questo elaborato.

2.1 La fermentazione alcolica

Per vinificazione si intende il processo che porta alla produzione del vino. In seguito alla raccolta delle uve, si procede alla diraspapigiatura cioè la separazione degli acini dal raspo e la successiva pigiatura che consente l'ottenimento del mosto (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017).

La trasformazione da mosto a vino viene operata da lieviti che metabolizzano gli zuccheri (glucosio e fruttosio) attraverso la fermentazione alcolica producendo etanolo e anidride carbonica. Dal punto di vista metabolico la prima fase di questo processo è la glicolisi, svolta nel citoplasma delle cellule dei lieviti, che comprende una serie di reazioni al termine delle quali ogni molecola di glucosio viene scissa in due molecole di piruvato con una resa netta di 4 ATP (adenosin tri-fosfato); questo processo comporta la riduzione di due molecole del coenzima NAD+ in NADH. A causa della condizione di anaerobiosi del mezzo, i lieviti non possono attuare il processo di respirazione cellulare che risulterebbe più conveniente dal punto di vista energetico ma che richiede la presenza di ossigeno quale accettore finale di elettroni durante la fosforilazione ossidativa. Quindi, i lieviti sfruttano una via alternativa, la fermentazione alcolica, tramite la quale l'acido piruvico viene decarbossilato con produzione di aldeide acetica (C_2H_4O) e anidride carbonica grazie all'enzima piruvato decarbossilasi. Successivamente, l'aldeide acetica, composto tossico per la cellula, viene ridotta in etanolo con conseguente ossidazione di NADH in NAD^+ (C_2H_6O). (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017).

La fermentazione alcolica viene condotta seguendo due modalità principali: fermentazione indotta e operata da lieviti *starter* selezionati e fermentazione spontanea. Nel primo caso il produttore ha la totale libertà di scegliere il o i generi di lievito da

utilizzare. Il più utilizzato è il *Saccharomyces cerevisiae* che, a seconda dell'azienda e delle esigenze, è disponibile in diverse formulazioni (es. lievito secco attivo, lievito in crema ecc.). Nel secondo caso la fermentazione viene svolta dai cosiddetti lieviti autoctoni, prevalentemente di generi non-*Saccharomyces*. La problematica principale di questo tipo di fermentazione è la grande varietà microbiologica presente. Infatti, i prodotti del metabolismo differiscono a seconda del genere e della specie del lievito e possono influenzare negativamente le caratteristiche organolettiche e non del vino.

Diverse variabili influiscono sull'andamento fermentativo:

- OSSIGENO → in condizioni di anaerobiosi totale, la fermentazione non può avvenire. I lieviti, quindi necessitano di almeno 5 – 10 mg/L di O_2;
- TEMPERATURA → l'intervallo ottimale di temperatura per un corretto sviluppo dei lieviti si attesta tra i 10 e i 35 C°;
- AZOTO PRONTAMENTE ASSIMILABILE → suddiviso in ammoniacale e amminico, se non presente causa scompensi nutrizionali rilevanti. Le sue concentrazioni ottimali si attestano attorno ai 150 – 180 mg/L;
- TENORE ZUCCHERINO → gli zuccheri sono di fondamentale importanza per la fermentazione ma, a concentrazioni eccessive, causano uno stress iperosmotico che ha come conseguenza la diminuzione dell'attività fermentativa e la successiva morte dei lieviti;
- VITAMINE E I SALI MINERALI → vitamine come: tiamina, biotina, l'acido pantotenico, l'acido nicotinico e l'inositolo sono fondamentali per le attività cellulari. I sali minerali come: azoto, zolfo, fosforo, potassio, magnesio, calcio, zinco sono fondamentali come costituenti cellulari e cofattori enzimatici;
- ALCOL ETILICO → è il prodotto principale della fermentazione alcolica ma a concentrazione elevate causa l'inibizione dei lieviti. A seconda del loro genere la quantità di alcol presente influenza la loro vitalità;
- DIOSSIDO DI CARBONIO → nonostante i lieviti, attraverso la fermentazione, producano grandi dosi di CO_2, concentrazioni troppo elevate possono inibirne l'attività. Per questo è necessario eseguire operazioni che permettono l'arieggiamento dei mosti;
- ACIDI → La quantità di acidi volatili come l'acido acetico, influisce moltissimo sulla vitalità dei lieviti, nonostante venga prodotto da loro stessi;

- ANTISETTICI → A concentrazioni elevate di SO_2 o di prodotti anticrittogamici, possono essere causati rallentamenti o inibizioni della fermentazione. (Cappelli e Vannucchi, 2014).

2.2 La fermentazione spontanea

Le fermentazioni alcoliche spontanee vengono svolte da lieviti comunemente chiamati "indigeni" o "naturali". Essi, sono presenti naturalmente già sull'uva e nell'ambiente di vinificazione. L'andamento fermentativo dipende da tre principali fattori:

- la composizione del mosto
- il corredo enzimatico dei lieviti
- le condizioni ambientali in cui i lieviti si trovano.

Prima che si iniziassero a selezionare lieviti come il *Saccharomyces cerevisiae*, i mosti per la produzione dei vini venivano fermentati spontaneamente. Già nell'uva, infatti, è possibile trovare specie di lieviti indigeni. Si stima che sulla superficie della buccia dell'uva si trovino popolazioni microbiche che raggiungono le 10^3-10^5 UFC/g, composte principalmente da batteri, lieviti e funghi filamentosi. Generalmente le concentrazioni cellulari di lieviti presenti sulle bucce è maggiore quando l'uva ha raggiunto un buon grado di maturità (10^4-10^6 UFC/g). I generi che predominano sui grappoli immaturi sono: *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida*. Su grappoli maturi, invece, predominano *Hanseniaspora spp.* e *Metschnikowia spp.* (50-70%) e a seguire: *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Dekkera* spp., *Issatchenkia* spp., *Kluyveromyces* spp, *Pichia* spp, *Rhodotorula* spp., *Saccharomycodes* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Cryptococcus* spp., *Sporidiobolus* spp., *Torulaspora* spp. *e Zygosaccharomyces* spp. Il principale agente di fermentazione del vino, *Saccharomyces cerevisiae*, è assente o presente in concentrazioni bassissime sulle uve. Studi rivelano anche che, annualmente, la distribuzione quantitativa e qualitativa dei ceppi di *S. cerevisiae* presenti sulle uve nella stessa azienda possa variare anche di molto. I motivi per cui i lieviti non-*Saccharomyces* riescano a sopravvivere sulle bucce delle uve non sono del tutto chiari, ciononostante si può presupporre che sia dovuto a:

- compatibilità di fattori di tipo fisiologico e biochimico delle diverse specie con la superficie delle uve (per esempio l'adesione alle superfici delle bucce e la capacità di metabolizzare i composti presenti)
- tolleranza nei confronti delle condizioni ambientali (temperatura, irradiazione, luce solare e siccità)
- tolleranza a sostanze tossiche presenti sulla superficie dell'uva
- fenomeni di interazione lievito-lievito (meccanismi alla base di questa interazione non ancora chiariti)

Moltissime specie intervengono nel processo della fermentazione spontanea. La fermentazione, in base all'evoluzione della popolazione microbica, può essere divisa in due parti: la prima in cui i lieviti dominanti sono quelli apiculati che presentano una scarsa attività fermentativa *Hanseniaspora* spp. e i generi *Candida, Pichia, Rhodotorula, Issatchenkia e Kluyveromyces* (quelli ritrovati in maggior quantità e frequenza risultano essere *Candida stellata* e *Hanseniaspora uvarum*); la seconda, in cui il lievito dominante risulta essere *Saccharomyces cerevisiae* che, a causa delle condizioni non più favorevoli per i lieviti *non-Saccharomyces,* prende il sopravvento e conclude il processo fermentativo (Grafico 1) (Romano e Capece, 2018).

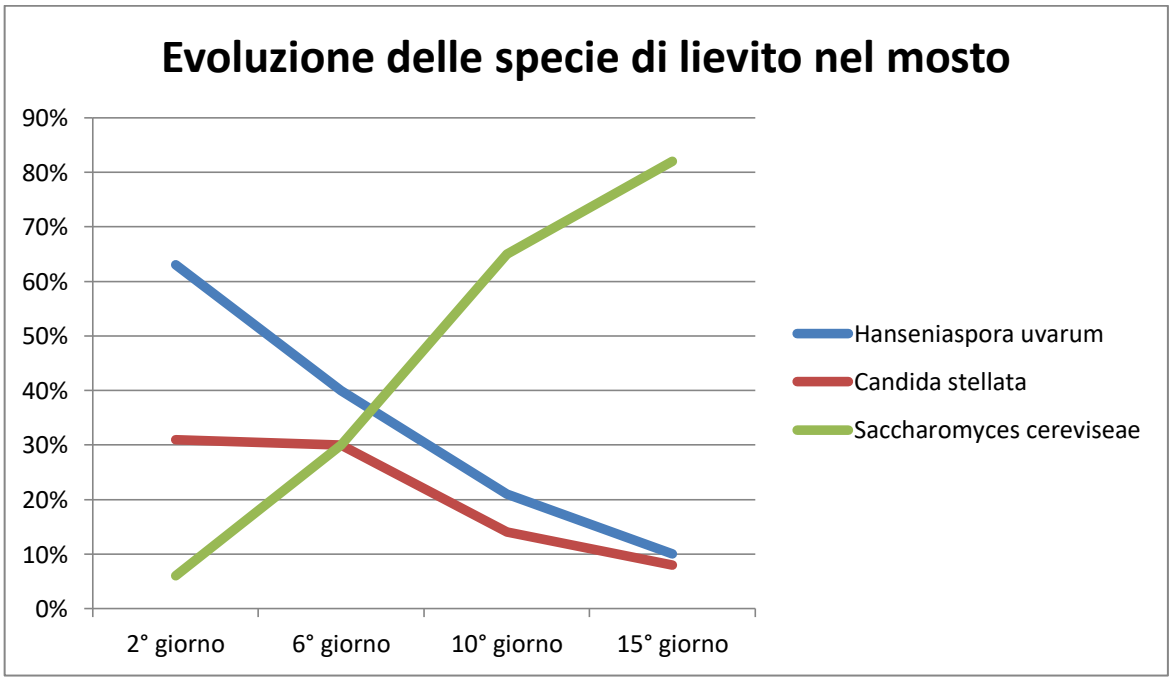

Grafico 1 – Evoluzione delle specie di lievito *Hanseniaspora uvarum, Candida stellata, Saccharomyces cereviseae* in un campione di mosto Nero d'Avola (rielaborazione dei dati della figura 1.3 pp 6 di Romano *et al.*, 2018)

2.3 Le fermentazioni controllate

Lo scopo principale delle fermentazioni guidate è quello di ottenere un prodotto finale che presenti delle precise caratteristiche organolettiche. A questo fine, sono disponibili in commercio molte formulazioni di lieviti *starter* il cui inoculo deve essere fatto su mosti che hanno subito il processo di flottazione o decantazione statica. I mosti, inoltre, devono essere stati stabilizzati dal punto di vista microbico attraverso l'utilizzo di solforosa o chitosano. I vantaggi della fermentazione guidata sono:

- inizio rapido e velocità di fermentazione
- regolarità del processo fermentativo
- sviluppo inferiore di acidi volatili
- completo consumo degli zuccheri presenti e rendimento maggiore di zucchero in alcol
- risultati discreti anche con mosti di bassa qualità
- stabilità del vino all'ossidazione maggiore e chiarificazione più rapida e efficace
- ottenimento di prodotti con caratteristiche organolettiche costanti negli anni.

Nella selezione dei ceppi di lieviti tramite colture, vengono ricercate alcune proprietà che vengono suddivise in: primarie, come la produzione di etanolo, la resistenza all'alcol, il vigore fermentativo, la velocità di fermentazione, la resistenza alla solforosa; secondarie. legate alle caratteristiche organolettiche del vino come lo sviluppo di aromi, lo sviluppo di glicerolo, il quantitativo di acido acetico prodotto, gli alcoli superiori. Il ritrovamento costante di nuovi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di elevata qualità enologica e con proprietà secondarie relative alla zona di ritrovamento ha permesso di incrementare la tipicità del prodotto. (Cappelli e Vannucchi, 2014).

3.0 LE FERMENTAZIONI MISTE

Durante il processo di fermentazione alcolica, varie specie di lievito interagiscono tra di loro. Il ruolo dei lieviti indigeni nella fermentazione, grazie agli studi eseguiti negli ultimi anni, è stato rivalutato. Le fermentazioni miste o *multistarter* consistono nell'inoculo di diverse specie di lievito simultaneamente o sequenzialmente.

Nel caso di inoculo simultaneo, ovvero co-inoculo, le specie di lievito scelte vengono introdotte nel liquido da fermentare in contemporanea. E' necessario tener presente che nel caso di fermentazioni spontanee, i lieviti non-*Saccharomyces* vengono eliminati dallo sviluppo di *S. cerevisiae*, anche a causa della loro estrema sensibilità all'etanolo. Coerentemente, alcuni studi hanno mostrato come, tramite la tecnica del co-inoculo di ceppi *Saccharomyces*/non-*Saccharomyces*, non sia sempre possibile controllare la durata di sopravvivenza dei ceppi non-*Saccharomyces* con la sola modulazione del rapporto iniziale di insemenzamento (Salmon *et al.*, 2006); è utile, quindi, effettuare inoculi scalari (sequenziali) che riproducano la successione naturale delle diverse specie di lieviti. Tuttavia, la scelta tra co-inoculo e inoculo sequenziale resta guidata dai risultati che si desidera ottenere: Tabella 1 illustra i risultati di uno studio che ha valutato le variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle prove in co-inoculo o inoculo sequenziale non-Saccharomyces/S. cerevisiae rispetto al controllo costituito da una coltura pura di S. cerevisiae (Domizio et al., 2011)Si è notato che la conduzione di fermentazioni sequenziali con lieviti non-convenzionali e *Saccharomyces* rappresenta un approccio interessante per la risoluzione di alcune problematiche come, ad esempio, la riduzione del contenuto di etanolo nel vino. Infatti, questa modalità di inoculo permette di sfruttare il metabolismo del primo lievito

Per utilizzare al meglio le caratteristiche metaboliche dei lieviti indigeni nelle fermentazioni sequenziali vanno prese in considerazione 2 principali caratteristiche:

- il livello di inoculo;
- l'intervallo fra un inoculo e l'altro.

Alte concentrazioni cellulari del lievito non-convenzionale favoriscono la sua competitività con *S. cerevisiae*. Il periodo di intervallo tra un inoculo e l'altro influisce significativamente sull'efficienza dell'attività metabolica (Ciani, 2016).

Lieviti	Modalità inoculo	Cinetica di fermentazione	Etanolo (% v/v)	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Acidità volatile (g/l ac. acetico)	Glicerolo (g/l)	Polisaccaridi (mg/l mannani)
***K. thermotolerans* (101)**	coinoculo	-	-	+ +	-	+	+
+	sequenziale **24 h**	-	- -	+ +	- - -	+ +	+ +
S. cerevisiae	sequenziale **48 h**	-	- -	+ +	- -	+	+
***Z. florentinus* (42)**	coinoculo	≈	≈	≈	- -	-	+
+	sequenziale **24 h**	- -	≈	+	-	-	+ +
S. cerevisiae	sequenziale **48 h**	-	≈	+ +	-	-	+ +

≈ simile al controllo
- inferiore al controllo
+ superiore al controllo

Tabella 1 - variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle prove in co-inoculo o inoculo sequenziale non-*Saccharomyces/S. cerevisiae* rispetto al controllo costituito da una coltura pura di *S. cerevisiae (*Domizio *et al.*, 2011*)*

I lieviti non-*Saccharomyces*, nonostante la loro ampia variabilità, presentano una bassa attitudine fermentativa e producono prodotti secondari che possono avere caratteristiche sia positive che negative. I principali composti prodotti sono glicerolo, polisaccaridi, acido acetico, etilacetato, etilfenoli. Gli aspetti che inoltre vanno considerati sono:

- La variabilità intraspecifica dei lieviti non-*Sacch*
- La fermentazione mista che rappresenta la normale condizione nelle fermentazioni spontanee con la presenza di diversi ceppi

Questo tipo di fermentazione non è una novità, infatti tra i primi a proporla ci fu Tommaso Castelli, il quale già negli anni 60' studiò la fermentazione mista con inoculo sequenziale di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* al fine di ridurre il contenuto di acidità volatile nel prodotto finale. Ad oggi, le fermentazioni miste sono utilizzate principalmente per ridurre il contenuto in acido acetico nel vino e ampliare il bouquet aromatico del vino. (Romano *et al*., 2022)

3.1 L'aumento delle sostanze aromatiche

Come già accennato precedentemente, a seconda della specie di lievito i composti prodotti dal metabolismo variano. L'apporto delle sostanze aromatiche dipende dalla

biosintesi di norisoprenoidi, terpeni, esteri, alcoli superiori, acidi grassi volatili, composti carbonilici e tiolici. La produzione di composti aromatici oltre ad essere una variabile interspecifica è anche una caratteristica intraspecifica. Per esempio, nel caso delle diverse specie del genere *Hanseniaspora, H. uvarum* produce elevate quantità di acetato di isoamile (aroma di banana); *H. osmophila, H.guilliermondii e H. vineae* producono buoni quantitativi di fenilacetato (aroma di miele). Altri esempi sono: *Metschnikowia pulcherrima* che produce elevate quantità di acetato di isoamile, β-feniletanolo (aroma di rosa) e tioli volatili (frutti esotici); *Torulaspora delbrueckii,* nelle fermentazioni simultanee e sequenziali, incrementa la produzione di esteri acetati, tioli, terpeni (come l'α-terpineolo e il linalolo) e il β-feniletanolo. Attraverso gli studi eseguiti si è notato, inoltre, che il quantitativo, l'intensità, la complessità e la persistenza degli aromi prodotti varia anche a seconda della varietà del vitigno. (Romano *et al*., 2022)

3.2 La riduzione dell'etanolo

La necessità di ridurre il contenuto in etanolo, negli ultimi anni, è sempre più richiesta. Grazie all'utilizzo di fermentazioni sequenziali o simultanee questo è possibile. A causa del continuo innalzamento delle temperature medie annuali e stagionali, dovute al cambiamento climatico (ARPA FVG, 2022), i contenuti in alcol dei vini sono in costante aumento (Grafico 2) (Liv-ex, 2021) anche in zone in cui, fino a qualche decennio fa, le uve non raggiungevano un grado di maturazione necessario a soddisfare il contenuto alcolico naturale minimo richiesto dai Disciplinari di Produzione. Nel caso della D.O.C. Friuli Colli Orientali *"le uve destinate alla vinificazione devono assicurare ai vini «Friuli» Colli Orientali un titolo alcolometrico volumico naturale minimo del 10% vol."*.

Grafico 2 – Aumento del tenore alcolico dagli anni '90 al 2020 di vini condotto dal "*The London International Vitners Exchange".* (Liv-ex, 2021)

Secondo gli studi eseguiti a livello internazionale, nei prossimi trent'anni le temperature aumenteranno significativamente, mentre, le piogge diminuiranno (ISPRA-SCIA 2015, IPCC 2013). Proprio per questo motivo l'utilizzo di ceppi di lievito non-*Saccharomyces* potrebbe aiutare nella diminuzione del quantitativo di alcol etilico prodotto. Tuttavia, si rileva un'ampia variabilità intraspecifica. I risultati dei vari studi hanno dimostrato come ceppi di lieviti indigeni selezionati, in condizioni di anaerobiosi o aerobiosi controllata con inoculo sequenziale di lieviti *Saccharomyces*, possono essere utilizzati per ridurre il quantitativo di alcol etilico finale nel vino (Romano *et al*., 2022).

Ad esempio, Ciani *et al*. (2016) hanno proposto l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* in forma immobilizzata in fermentazioni miste sequenziali con Saccharomyces *cerevisiae*. I ceppi selezionati erano *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bombicola*; i risultati dello studio hanno rilevato una effettiva riduzione del contenuto di etanolo maggiore dell'1.0% v/v se confrontate con fermentazioni pure di *S. cerevisiae*. Precedentemente, prove di fermentazioni miste operate da *Lachancea thermotolerans-Saccharomyces cereviseae* (Gobbi *et al*, 2013) e *Metschnikowia pulcherrima-Saccharomyces cereviseae* (Contreras *et al*, 2014) con inoculo ritardato tra un genere avevano garantito la riduzione del contenuto di etanolo

rispettivamente del 0,7% v/v del 0,9-1,6% v/v. Nel caso dei test effettuati da Contreras *et al.* (2014) la riduzione maggiore è stata ottenuta ritardando l'inoculo rispettivamente di 9 e 17 giorni.

3.3 La disacidificazione naturale

L'acido L-malico è un acido organico presente naturalmente nell'uva. La sua concentrazione varia a seconda della varietà del vigneto e dalle condizioni climatiche. Solitamente per diminuire il suo contenuto nel vino si sfrutta la fermentazione malolattica, ove, i batteri lattici (generi *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Oenococcus*) attraverso la spontaneamente o attraverso il loro inoculo, consumano l'acido malico formando acido lattico (Cappelli e Vannucchi, 2014).

Non sempre, però, la presenza di acido lattico è voluta nel vino. In alcuni casi oltre ai batteri lattici, lieviti come *Lachancea thermotolerans* causa un aumento dell'acido lattico nel vino. La produzione di acido lattico da parte di questo lievito dipende da due variabili:

- La variabilità intraspecifica
- La temperatura di fermentazione.

Il quantitativo di acido lattico varia dai 0,2-0,3 ai diversi grammi litro. (Romano *et al.*, 2022).

Se l'acido lattico non è un prodotto che si desidera nel vino, l'utilizzo di *Schizosaccharomyces pombe* potrebbe essere una soluzione. Infatti, è noto per la sua attitudine a trasformare l'acido L-malico in etanolo e per resistere a pH bassi e tenori di SO_2 elevati.

	Mosto originale	Vino bianco con *Schiz. pombe*	Vino bianco senza *Schiz. pombe*
Etanolo (% v/v)	0.20	9.50	9.80
Zuccheri riducenti (g/L)	201	1.10	1.10
Acidità totale (g/L)	11.20	7.10	11.1
pH	3.12	3.34	3.12
SO_2 libera (mg/L)	24		
SO_2 totale (mg/L)	72		
Glicerolo (g/L)	Tracce	4.56	4.68
Acido L-malico (g/L)	8.40	2.40	6.16
Acido acetico (g/L)	Tracce	0.22	0.22
Acido lattico (g/L)	Tracce	0.05	0.07
Acido succinico (g/L)	Tracce	0.07	0.09
Acetato di etile (mg/L)	Tracce	25.3	29.0
Metanolo (mg/L)	Tracce	35.2	33.5
1-Propanolo (mg/L)	Tracce	22.9	21.0
Isobutanolo (mg/L)	Tracce	16.3	16.1
Alcol amilico (mg/L)	Tracce	1.70	2.60
Alcol iso-amilico (mg/L)	Tracce	116.5	111.4
Idrogeno solforato (g/L)	Tracce	5.3	3.1

Tabella 2 – Evoluzione dei composti di 3 mosti attraverso la fermentazione con *Schizosaccharomyces pombe*. (Silva et *al.*, 2001)

A seguito di un test eseguito in cantina attraverso l'utilizzo i *Schizosaccharomyces pombe* in formato immobilizzato, sia in un vino bianco che in un vino rosso, si può notare come il tenore di acido malico sia diminuito (Tabella 2) (Silva *et al.*, 2001).

3.4 Il biocontrollo e l'attività antimicrobica

Durante diverse fasi della vinificazione si ricorre all'utilizzo della SO_2 che risulta essere un ottimo antisettico, un antiossidante, un antiossidasico e protegge l'aroma del vino attraverso il legame con composti come l'etanale. Ciononostante, la tendenza degli ultimi anni è quella di diminuire il contenuto di solfiti nei vini, a causa della loro tossicità per l'uomo (nausea, vomito, irritazione gastrica) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2017).

Una delle tecniche che negli ultimi anni si sta sempre più evolvendo è l'utilizzo di specie di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* per il biocontrollo e la stabilizzazione dei vini. Infatti, durante la compresenza di più generi o specie di lievito, vengono rilasciate dai microrganismi (solamente alcune specie) delle tossine. I cosiddetti lieviti *killer*, raggruppati in 11 categorie, da K1 a K11 in base alla tossina prodotta (Fattore *Killer*) e secondo *"le reazioni di sensibilità tra i ceppi, nonché per la natura e l proprietà delle tossine implicate"* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2017). In base alla produzione o alla sensibilità verso le tossine si riscontrano 4 fenotipi di lievito:

- Killer (K): secernono delle tossine che sopprimono altri ceppi
- Neutri (N): non producono tossine ma sono resistenti a quest'ultime
- Sensibili (S): vengono inibiti dalle tossine prodotte da altri lieviti
- Killer-sensibili (KS): producono tossine che inibiscono l'attività di altri lieviti ma, al tempo stesso, risultano essere sensibili ai fattori K prodotti da altri lieviti.

Oltre ai lieviti del genere *Saccharomyces* esistono lieviti di tipo indigeno che producono le tossine come ad esempio i generi *Hansenula, Candida, Kloeckera, Hanseniaspora, Pichia, Torulopsis, Kluyveromyces, Debariomyces.* (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017).

4.0 INTERAZIONI TRA S. cerevisiae e LIEVITI NON-Saccharomyces

Sono diversi i generi che vengono utilizzati nelle fermentazioni miste. Ognuno di essi ha diverse peculiarità e apporta diverse caratteristiche al vino (Tabella 3). Tra i generi di *non-Sacch* più utilizzati si trovano: *Torulaspora*, *Metschnikowia*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*.

Specie	Varietà d'uva impiegate	Impatto sull'aroma del vino	Impatto sulla composizione del vino
Torulaspora delbrueckii	Malvar, Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Soave, Chardonnay, Tempranillo Merlot, Macabeo, Verdicchio	Incremento della componente aromatica varia, terpeni, tioli, frutti tropicali, note floreali	Riduzione dell'acidità volatile, incremento dei polisaccaridi, persistenza della schiuma
Hanseniaspora uvarum/vinae	Pinot noir, Negroamaro, Chardonnay, Macabeo	Incremento di composti volatili (acetali, terpeni, etc)	Possibile incremento dell'acidità volatile
Starmerella bacillaris/bombicola	Barbera, Bovale, Montepulciano	Incremento della complessità aromatica e della struttura	Incremento di glicerolo, riduzione dell'acidità volatile
Metschnikowia pulcherrima	Riesling, Macabeo,	Incremento degli aromi fruttati (citrico, pesca-pera)	Incremento di mannopropteine
Lachancea thermotolerans	Riesling, Sangiovese	Incremento del carattere fruttato e speziato	Incremento dell'acidità totale (acido lattico)
Zygotorulaspora florentina	Sangiovese	Incremento delle note fruttate, floreali e speziate	Riduzione dell'acidità volatile
Zygosaccharomyces bailii	Chardonnay	Incremento degli esteri etilici	Incremento del glicerolo
Schizosaccaromycs pombe/Japonicus	Shiraz	Incremento dei polifenoli	Incremento di mannopropteine

Tabella 3 – Lieviti vinari non convenzionali impiegati in coltura mista e loro impatto sul vino (Ciani, 2017)

Diverse aziende di rilevanza mondiale (Laffort, Lallemand) a seguito di un'attenta e precisa selezione, producono e commerciano prodotti *starter* a base di lieviti *non-Saccharomyces*. Di seguito vengono menzionati i generi maggiormente studiati in abbinamento con *S. cerevisiae.*

4.1 Gen. *Torulopsis*

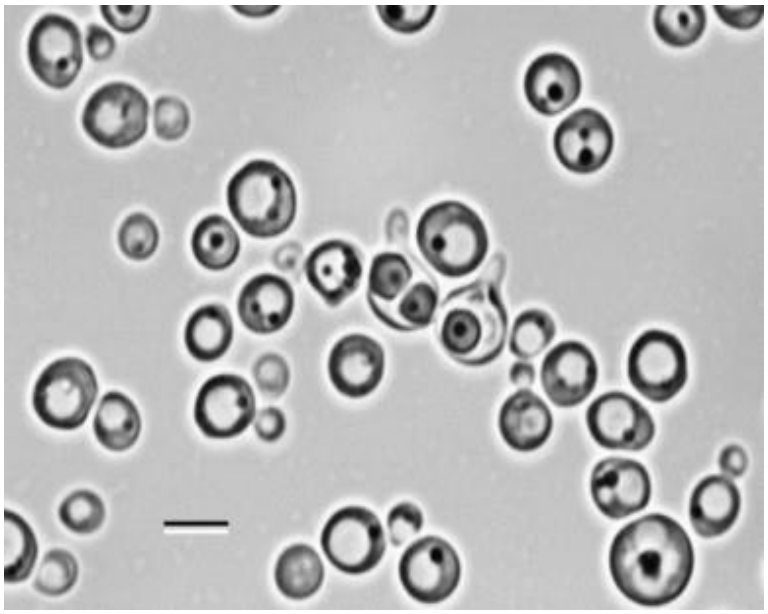

Figura 1 – Morfologia cellulare e forma di *Torulaspora delbrueckii* (Giacomobono, 2020)

Uno dei lieviti maggiormente studiati è quello del genere *Torulaspora*. Più precisamente, il *Torulaspora delbrueckii*. Le sue peculiarità sono:

- possedere un buon potere fermentativo, infatti, riesce a sviluppare fino al 9-10% v/v di alcol etilico;
- resistere ad alte concentrazioni di alcol etilico;
- ridurre il contenuto di acido acetico in fermentazioni sequenziali con *Saccharomyces cerevisiae*. Nel caso di fermentazioni alcoliche con monocoltura di *S. cerevisiae* è stata rilevata una produzione maggiore di acido acetico rispetto alla fermentazione sequenziale. (Delač Salopek *et al.*, 2022);
- produrre glicerolo, aumentando la concentrazione finale da 0,2 a 0,8 g/l;
- ridurre il contenuto di alcol etilico fino a 1% v/v;

La caratteristica principale per cui viene utilizzato è l'apporto di aromi. Infatti, nella varietà di Sauvignon Blanc ha determinato un incremento dell'intensità e della qualità dell'aroma del vino. Ha permesso un maggiore rilascio di tioli aumentando i caratteri varietali e fruttati del vino finale. Oltre alla fermentazione classica, questo genere di lievito è utilizzato anche per le rifermentazioni dei vini spumanti permettendo di diminuire la schiuma e aumentare la concentrazione di aromi come l'etilesanoato e l'etilotanoato (Romano *et al.*, 2022).

4.2 Gen. Metschnikowia

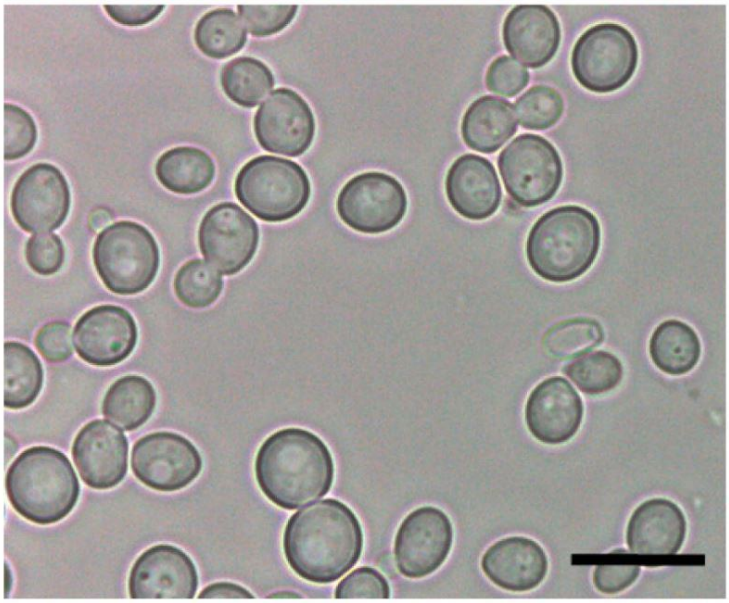

Figura 2 – Morfologia cellulare e forma di *Metschnikowia pulcherrima* in scala grafica di 10µm (Giacomobono, 2020)

Nel caso delle fermentazioni miste con *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima* influenza molto il profilo aromatico producendo elevate quantità di alcoli superiori, con concentrazioni particolarmente elevate di isobutanolo e feniletanolo (Morata *et al.*, 2019). Importante, inoltre, è l'attività β-liasica nei confronti dei precursori dei tioli varietali e quella β-glucosidasica nei confronti dei precursori terpenici. Nel caso di varietà come Sauvignon Blanc, Verdejo e Verdicchio questi composti sono di fondamentale importanza per il bouquet aromatico del vino finale (Romano *et al*., 2022). Tutti questi effetti positivi sul profilo aromatico derivano dalla sua fermentazione sequenziale con *Saccharomyces cerevisiae*. Infatti, nel caso di fermentazioni alcoliche condotte solamente da *Metschnikowia pulcherrima*, si è potuta denotare un'elevata produzione di acetato di etile, composto che porta caratteristiche negative dal punto di vista aromatico al vino (Morata *et al.*, 2019).

Oltre all'aumento delle sostanze aromatiche, *Metschnikowia* spp., produce anche un buon quantitativo di glicerolo. Come visto precedentemente, *M. pulcherrima* viene sfruttato in fermentazioni sequenziali al fine di ridurre il contenuto di etanolo del vino. Grazie alla sua fermentazione, assieme a *Saccharomyces cerevisiae*, è stata rilevata una diminuzione del contenuto di etanolo compresa tra il 0,9% v/v e l'1,6% v/v (Contreras *et al*, 2014).

Oltre alle peculiarità precedentemente descritte, *M. pulcherrima* produce un composto che è utilissimo per il controllo microbiologico. Questo composto antimicrobico naturale

prende il nome di *pulcherrimina*, un pigmento rosso insolubile con funzione antimicotica. Grazie a questo prodotto *Metschnikowia pulcherrima* può essere utilizzato per combattere altri lieviti come *Brettanomyces*/*Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e funghi come *Botrytis cinerea*. Inoltre, *S. cerevisiae* sembra non essere influenzato dall'attività antimicrobica della *pulcherrimina*. (Morata *et al.*, 2019).

4.3 Gen. *Lachancea*

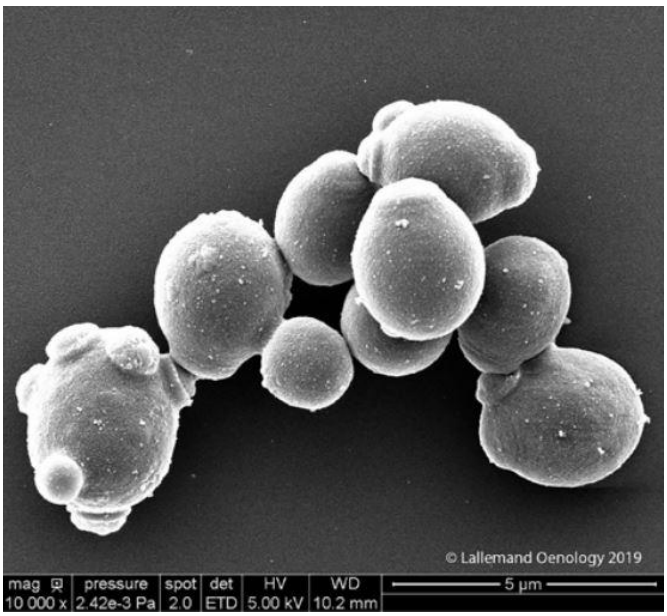

Figura 3 – *Lachancea thermotolerans* al microscopio elettronico in scala grafica di 5 µm (Lallemand, 2020)

La specie del genere *Lachancea* più rilevante a livello enologico è la *Lachancea thermotolerans*. La peculiarità principale di questo lievito è quella di produrre quantità rilevanti di acido lattico, aumentando l'acidità totale del vino (Grafico 4). Come citato precedentemente, i quantitativi di acido lattico variano da 1 a 16,8 g/L. Queste produzioni di acido lattico hanno una influenza significativa sul pH del vino. Questo genere risulta importante anche per la produzione di glicerolo (influenzata anche dalla temperatura di fermentazione) il quale è un composto fondamentale, dopo l'etanolo, per garantire la sensazione di corposità, pienezza e morbidezza del vino. (Morata *et al.*, 2018).

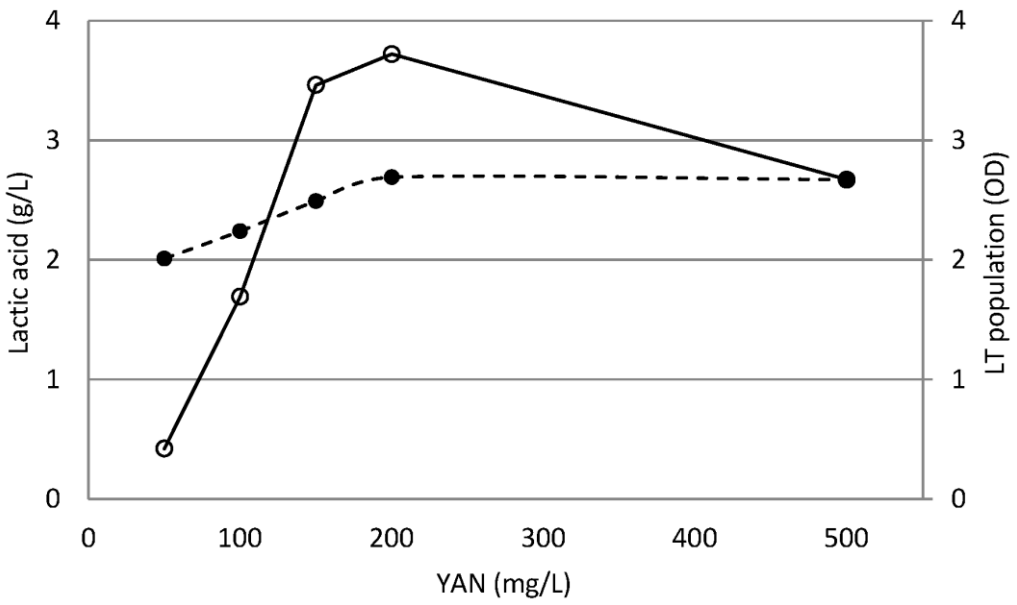

Grafico 3 – Evoluzione della produzione di acido lattico durante la fermentazione da parte di *Lachancea thermotolerans* a concentrazioni variabili di APA (YAN) (Morata *et al., 2018)*

Questa specie è caratterizzata da una bassa produzione di acido acetico (Romano *et al*., 2022). I quantitativi di acido acetico prodotti sono compresi tra i 0,3 e i 0,5 g/L (Morata *et al.*, 2018)

Lachancea thermotolerans è caratterizzato anche da un'elevata produzione di terpeni come geraniolo, farnesolo e acetato di citronellile, aromi fondamentali per esaltare la tipicità varietale (Delač Salopek *et al.*, 2022).

In seguito ad uno studio si è potuto osservare che in un vino ottenuto da fermentazione sequenziale *Lachancea thermotolerans – Saccharomyces cerevisiae* il contenuto alcolico risulta essere inferiore e gli zuccheri residui più elevati (>7 g/L). E' stata osservata, inoltre, una diminuzione del contenuto di antociani, probabilmente dovuto ad una maggiore capacità di adsorbimento della parete cellulare del lievito (Mucalo *et al.*, 2023).

4.4 Gen. *Hanseniaspora*

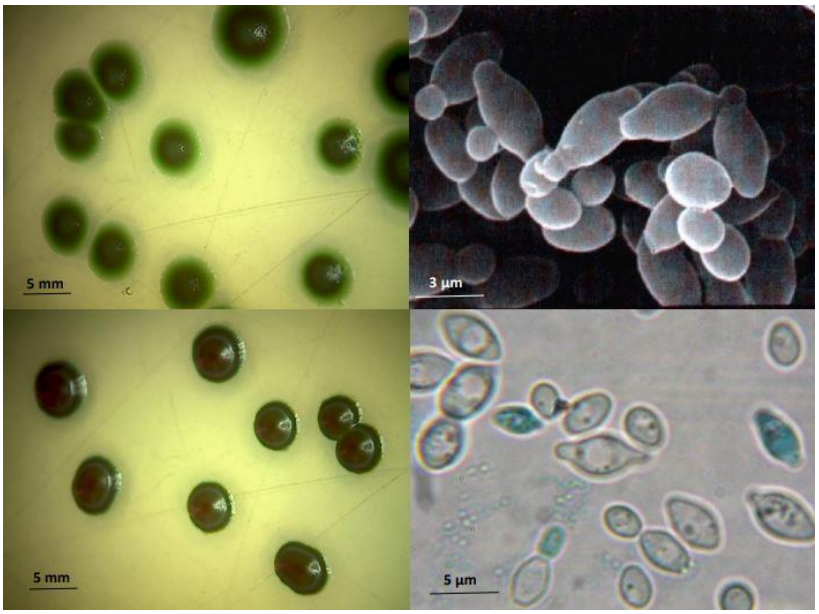

Figura 4 – Colonie di *Hanseniaspora uvarum* al microscopio ottico e al microscopio elettronico (Martin *et al.*, 2018)

Le specie appartenenti al genere *Hanseniaspora* sono note per la loro scarsa tolleranza all'alcol etilico. Nelle fermentazioni in purezza la percentuale massima di alcol prodotta si avvicina attorno al 4% v/v (Romano *et al.*, 2022).

A seguito di un esperimento svolto su 7 quintali di mosto di Negroamaro si è potuto osservare che, nella fermentazione mista da parte di *H. uvarum* e *S. cerevisiae*, si è rilevata una complessità aromatica maggiore rispetto alla fermentazione di *Saccharomyces cerevisiae* in purezza (Tabella 4). I composti che si sono sviluppati maggiormente sono gli isoamilalcoli (aroma fruttato) e il 2-feniletanolo (note di rosa). La fermentazione di questi due lieviti ha garantito, inoltre, una diminuzione della concentrazione di acido acetico maggiore rispetto alla fermentazione con monocoltura. (Tristezza *et al.*, 2016).

	Lab-scale		Pilot-scale		Industrial-scale	
	Control	H1+S	Control	H1+S	Control	H1+S
ESTERS						
Isoamyl acetate	369.35	2330.00	2234.67	2239.18	312.05	2596.76
Ethyl hexanoate	434.51	510.00	510.49	560.85	433.73	547.57
Ethyl octanoate	371.69	604.91	406.42	573.12	476.00	661.15
3-Hydroxy-ethyl butanoate	53.79	69.78	52.23	65.35	51.41	67.74
Ethyl decanoate	183.24	230.00	188.19	252.18	234.87	229.38
Phenylethyl acetate	413.57	620.00	516.66	695.84	493.73	649.92
Ethyl acetate (mg/L)	42.11	84.78	22.07	92.04	25.05	87.04
ALCOHOLS						
Isoamyl alcohols	547.85	750.00	554.01	767.61	680.33	801.87
Phenylethylalcohol	11,480.03	11,994.45	13,760.43	12,962.32	10,555.51	11,716.07
ACIDS						
Hexanoic acid	2088.15	2246.68	2159.34	2366.45	2200.32	2246.68
Octanoic acid	3869.21	4574.65	3921.89	4716.22	3722.84	4574.65
TERPENS						
Terpineol	54.13	66.50	50.40	72.80	57.15	68.80
KETONS/ALDEHYDES						
Acetoin (mg/L)	4.11	11.24	7.65	11.85	6.05	11.34
Acetaldehyde (mg/L)	5.04	25.05	6.05	28.00	5.11	24.11

The pure culture of S. cerevisiae was used as control.

Tabella 4 – Concentrazione dei composti volatili in vini ottenuti con fermentazione mista H. *uvarum* / S. *cerviseae* su mosto della varietà Negroamaro (Tristezza *et al.*, 2016).

I motivi per cui *Hanseniaspora* migliori il vino derivano dalle sue buone attività enzimatiche come glucosidasi, xilosidasi, glicosidasi e proteasi fondamentali per produrre, in coltura mista, esteri acetati in buone concentrazioni (Romano *et al*., 2022).

4.5 Gen. *Schizosaccharomyces*

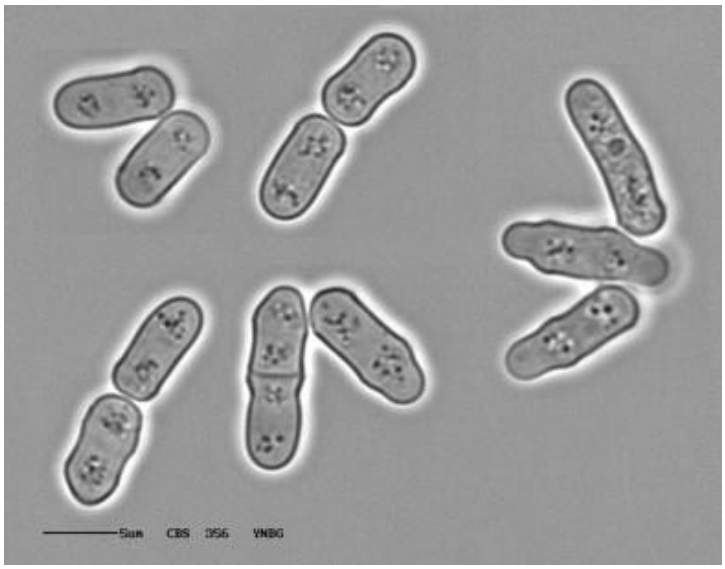

Figura 5 – Colonie di *Schizosaccharomyces pombe* al microscopio ottico (Giacomobono, 2020)

Uno dei principali motivi per cui *Schizosaccharomyces* viene utilizzato in enologia è la disacidificazione naturale del vino. Infatti, come già citato precedentemente, *Schizosaccharomyces pombe* utilizzato in fermentazione mista con *Saccharomyces cerevisiae* garantirebbe una buona diminuzione dell'acidità. Questo lievito permette anche di ridurre il contenuto di acido gluconico (presente in quantità considerevoli in uve botritizzate), ridurre il contenuto delle ammine biogene e ridurre il contenuto di Ocratossina A. Una delle caratteristiche che potrebbe far insorgere dubbi sul suo utilizzo è la sua tendenza a produrre acido acetico. Nonostante ciò, attraverso il suo co-inoculo o l'inoculo sequenziale con *Saccharomyces cerevisiae* permetterebbe di ridurre il rilascio di questo acido. La produzione di polisaccaridi è una delle altre peculiarità positive di questo genere di non-*Sacch*. I polisaccaridi hanno molteplici caratteristiche positive che permettono di: ridurre l'instabilità delle proteine e dei tartrati, aumentando la sensazione di corpo e la persistenza degli aromi.

5.0 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La fermentazione delle uve è un processo complesso in cui intervengono e interagiscono diversi gruppi di microrganismi. La microflora indigena è stata sfruttata per molti anni come agente fermentante nelle cosiddette fermentazioni spontanee che vedono la successione di diverse specie di lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*. A quest'ultimo genere appartiene la specie che viene considerata il lievito vinario per eccellenza, *Saccharomyces cerevisiae*. La selezione e la commercializzazione di questo lievito come *starter* da inoculare nel mosto ha portato alla sostituzione delle fermentazioni spontanee con fermentazioni guidate, che garantiscono un maggior controllo della vinificazione e la produzione di vini con caratteristiche costanti e riproducibili. Tuttavia, l'utilizzo di colture pure di *S. cerevisiae* ha portato all'ottenimento di vini molto uniformi, con scarsa complessità organolettica; al contrario, vini ottenuti dalla fermentazione spontanea, presentano caratteristiche aromatiche peculiari, grazie al contributo di ognuno dei lieviti quanto ognuno dei lieviti che sviluppa durante il processo. Negli ultimi anni, nonostante in passato venissero considerati lieviti indesiderabili a causa della bassa efficienza di fermentazione e maggiore produzione di sostanze indesiderate rispetto a *S. cerevisiae*, i lieviti non-*Saccharomyces* sono stati rivalutati in quanto diversi

studi ne hanno evidenziato ruolo rilevante sul profilo analitico e sensoriale dei vini (Pietrafesa, 2020). Inoltre, in aggiunta all'ampliamento del *bouquet* aromatico dei vini, è stato dimostrato che lieviti non convenzionali intervengono nella disacidificazione del vino (Silva *et al*., 2001), esercitano un bio-controllo sui microrganismi del mosto/vino (Ribéreau-Gayon *et al*., 2017) e contribuiscono all'abbassamento della quantità di alcol etilico (Ciani *et al*., 2016, Contreras *et al*., 2014, Gobbi *et al*., 2013,), fattore cruciale nelle attuali vinificazioni a causa del cambiamento climatico.

In questo contesto, fermentazioni miste controllate, consistenti nel co-inoculo o nell'inoculo sequenziale di lieviti vinari selezionati non convenzionali (non-*Saccharomyces*) e il lievito *Saccharomyces cerevisiae* e che sfruttano le caratteristiche uniche di entrambe le tipologie di lievito, possono essere uno strumento biotecnologico utile per i produttori. A questo scopo vengono utilizzati prevalentemente i generi *Torulaspora, Metschnikowia* ma anche i generi *Lachancea, Hanseniaspora, Schizosaccharomyces* stanno attirando sempre più l'attenzione di ricercatori e produttori.

Dal punto di vista operativo, gli studi realizzati sembrano dimostrare che gli inoculi sequenziali siano da preferire ai co-inoculi. Questo perché non è sempre possibile controllare la durata di sopravvivenza dei ceppi di lievito non convenzionale variando i rapporti iniziali dei livelli di inoculo dei due lieviti. Dai risultati ottenuti in alcuni studi, si può dedurre che per l'utilizzazione di coppie di ceppi *S. cerevisiae*/non-*Sacch.* sia preferibile riprodurre la naturale successione delle diverse specie di lieviti (Salmon *et al.*, 2006). Tuttavia si precisa che la scelta di una delle due tecniche deve basarsi sui risultati a cui si ambisce.

In conclusione, l'analisi della bibliografia presentata in questo elaborato ha messo in luce il promettente ruolo delle fermentazioni miste in ambito enologico. L'utilizzo di alcune specie di lieviti vinari non convenzionali, in sinergia con *S. cerevisiae* può essere considerato un importante strumento che permette di esprimere al meglio le potenzialità aromatiche dell'uva, garantendo allo stesso tempo un controllo e la buona riuscita delle fermentazioni, con l'ulteriore vantaggio di facilitare la risoluzione di una serie di fattori che, fino ad qualche anno fa, venivano considerati di difficile gestione come, ad esempio, la produzione di alti livelli di etanolo e l'uso della solforosa.

Resta comunque fondamentale la figura dell'enotecnico, che deve saper adattarsi alle condizioni e adoperare correttamente gli innumerevoli strumenti a sua disposizione al fine di ottenere sempre il miglior risultato possibile.

6.0 BIBLIOGRAFIA

- Ana Mucalo, Irena Budic-Leto e Goran Zdunić, "*Effect of sequential fermentation witch Lachancea thermotolerans/S. cerevisiae on aromatic and flavonoid profiles of Plavac Mali wine*", https://www.mdpi.com/2304-8158/12/9/1912 , 2023
- Antonio Morata, Iris Loira, Carlo Escott, Juan Manuel del Fresno, Maria Antonia Banuelos e Jose Antonio Suarez-Lepe, "*Applications of Metschnikowia pulcherrima in wine biotechnology*", https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/63 , 2019
- Antonio Morata, Iris Loira, Wendu Tesfaye, Maria Antonia Banuelos, Carmen Gonzalez e Jose Antonio Suarez Lepe, "*Lachancea thermotolerans applications in wine technology*", https://www.mdpi.com/2311-5637/4/3/53 , 2018
- ARPA FVG, https://www.arpa.fvg.it/temi/temi/meteo-e-clima/ultimi-approfondimenti-pubblicati/il-friuli-venezia-giulia-e-la-viticoltura-nel-cambiamento-climatico/ , 2022
- Cappelli P. e Vannucchi Vanna, "Gli agenti delle fermentazioni: lieviti e batteri" in Enologia, Zanichelli, Bologna, pp. 53-61, 2014
- Ciani (2017). I lieviti non convenzionali e le fermentazioni miste: una strategia per migliorare e caratterizzare i vini. OICCE TIMES, p. 52-54, N. 73, Anno XVIII
- Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, Henschke PA, Curtin C, Varela C., "*Evaluation of Non-Saccharomyces yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine*", Appl Environ Microbiol. 80:1670–1678, 2014
- Disciplinare di Produzione Friuli Colli Orientali, www.colliorientali.com/wpcontent/uploads/2015/10/DOCFriuliColliOrientali.pdf , 2015
- Doris Delač Salopek, Ivana Horvat, Ana Hranilović, Tomislav Plavša, Sanja Radeka, Igor Pasković e Igor Lukić, "*Diversity of volatile aroma compound composition produced by Non-Saccharomyces yeasts in the early phase of grape must fermentation*", https://www.mdpi.com/2304-8158/11/19/3088 , 2022
- Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M; "*Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and*

sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine", Food Microbiol 33:271-281, 2013

- Jean-Michel Salomon, Perrine Languet, Anne Orti-Julien, "*Colture miste di lieviti in fermentazione alcolica*". Journée Scientifique Vigne-Vin, Agro.M, Montpellier, 2006.
- Lallemand, https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2020/09/Cover-VVQ-Settembre-2020_Laktia.pdf , 2020
- Liv-ex, https://www.liv-ex.com/2021/06/alcohol-levels-wine-rising-proof/ , 2021
- Mariana Tristezza, Maria Tufariello, Vittorio Capozzi, Giuseppe Spano, Giovanni Mita e Francesco Grieco, "*The oenological potential of Hanseniaspora uvarum in simultaneous and sequential co-industrial wine production*", https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00670/full?&utm_source=Email_to_authors_&utm_medium=Email&utm_content=T1_11.5e1_author&utm_campaign=Email_publication&field=&journalName=Frontiers_in_Microbiology&id=194658 , 2016
- Maurizio Ciani, Laura Canonico, Francesca Comitini e Lucia Oro, "*Fermentazioni sequenziali mediante l'impiego di lieviti non-convenzionali per la riduzione del contenuto di etanolo nel vino*", 2016
- Pietrafesa A., (2020). Fermentazioni miste controllate per migliorare il profilo analitico e sensoriale dei vini. Agrifoglio, Vol. 99.
- R. Gawel, P.A. Smith, E. J. Waters, "*Influence of polysaccharides on the taste and mouthfeel of white wine*", https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ajgw.12222, 2016
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., "*Trattato di enologia 1*" ed. 4, Edagricole, Milano, pp. 261-325, 2017
- Romano P. e Capece A., "La fermentazione spontanea" in *Microbiologia enologica*, ed. 2 a cura di Suzzi G. e Tofalo R., Edagricole, Milano, pp 1-12, 2018
- Romano P., Cocolin L., Ciani M., "*Microbiologia della vite e del vino*" ed. 1, CEA, Milano pp 132 – 139, 2022
- Romina Giacomobono, https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/torulaspora-delbrueckii/ , 2020

- Romina Giacomobono, https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/schyzosaccharomyces-pombe/ , 2020
- Sofia Silva, Felipe Ramon-Portugal, Patricia Andrade, Susana Abreu, Maria de Fatima Texeira e Pierre Strehaiano, "*Consumo di acido malico da parte di cellule secche immobilizzate di Schizosaccharomyces pombe*", in American Journal of Enology and Viticulture N°119, 2001, https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto1079-01-1.pdf
- Valentina Martin, Maria Jose Valera, Karina Medina, Eduardo Boido e Francisco Carrau, "*Oenological impact of the Hanseniaspora/Kloeckera Yeast Genus on Wines – A Review*", https://www.researchgate.net/publication/327565714_Oenological_Impact_of_the_HanseniasporaKloeckera_Yeast_Genus_on_Wines-A_Review/fulltext/5b97243b4585153a53257166/Oenological-Impact-of-the-Hanseniaspora-Kloeckera-Yeast-Genus-on-Wines-A-Review.pdf , 2018