UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGROALIMENTARI, AMBIENTALI E ANIMALI

Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia

Tesi di Laurea

SELEZIONE DI LIEVITI ENOLOGICI PER FERMENTAZIONI A BASSO IMPATTO ENERGETICO

RELATRICE: Prof.ssa Lucilla Iacumin
CORRELATRICE: Dott.ssa Michela Pellegrini

LAUREANDA: Antonella Fontanel
Matricola 152281

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO – *ABSTRACT*

L'utilizzo di ceppi indigeni, ossia naturalmente presenti nel sistema vigneto, ha da qualche decennio destato particolare interesse, perché permette di mantenere maggiormente le caratteristiche tipiche del territorio di coltivazione delle uve. D'altro canto, però, nelle fermentazioni spontanee è comune incorrere in problemi fermentativi in quanto concretamente non si conoscono le caratteristiche dei ceppi che stanno conducendo la fermentazione e si potrebbe incorrere in blocchi di fermentazione o problemi organolettici. I ceppi considerati buoni fermentatori, ossia i *Saccharomyces* spp., molto raramente si trovano già in vigneto e da qui deriva l'importanza del loro studio nel caso in cui, invece, siano presenti. Oltra a garantire di portare a compimento la fermentazione alcolica in modo rapido, senza deviazioni fermentative, tutte le loro altre caratteristiche intrinseche, come quelle valutate in questo studio, quali resistenza al rame, resistenza alla solforosa, devono essere studiate, poiché caratteristiche ceppo-dipendente. Oltre a ciò questo studio ha voluto considerare il sempre più presente problema del riscaldamento globale, condizione dettata da una lunga serie di abitudini, nella maggior parte dei casi cattive. Per una realtà produttiva come quella di una cantina, il problema del riscaldamento climatico non può essere considerato minimale in quanto molte operazioni, prima tra tutte la refrigerazione, richiedono l'utilizzo di una mole considerevole di energia. Tra riscaldamento globale ed energia sussiste infatti un legame tanto forte quanto allarmante, dato dalle fonti fossili impiegate, che inevitabilmente procurano una produzione massiccia di CO_2 liberata poi in atmosfera. La refrigerazione in cantina è utilizzata in vari stadi del processo di vinificazione, ma in maniera importante soprattutto durante la fase di fermentazione alcolica dei vini provenienti da uve a bacca bianca, questo perché le conoscenze in ambito enologico suggeriscono il mantenimento di basse temperature al fine di preservare la componente aromatica del prodotto. Nonostante questa sia una nozione appurata e di cui si conosce la veridicità, lo scopo di questo lavoro è stato quello di "pensare

controcorrente” e tentare di fermentare mosti di uve bianche a temperature più elevate, valutando solo alla fine la ricaduta sul profilo organolettico del vino finito. Temperature superiori a quelle tradizionalmente impiegate permetterebbero di condurre delle vere e proprie fermentazioni a basso impatto energetico, ma con l’ottenimento di un prodotto altrettanto valido e coerente con quello richiesto dal mercato. Oltre a questo si somma poi il mantenimento del *terroir* in quanto, le stesse fermentazioni, verrebbero condotte mediante ausilio di uno starter composto, per l’appunto, dai ceppi da noi isolati e caratterizzati.

Indice

RIASSUNTO – *ABSTRACT* i

INTRODUZIONE 1

1 Lieviti *Saccharomyces* 1

1.1 La fermentazione alcolica 3

1.1.1 Biochimismo della fermentazione alcolica 4

1.1.2 Temperatura di fermentazione 6

1.1.3 Controllo della fermentazione alcolica 8

1.1.4 Arresti fermentativi 9

1.2 Caratteri di selezione del lievito 11

1.2.1 Vigore fermentativo 11

1.2.2 Resistenza al rame 12

1.2.3 Resistenza alla solforosa 15

1.2.4 Potere aromatizzante 17

1.2.5 Liberazione di mannoproteine 21

2 Refrigerazione industriale 23

2.1 Frigorie in cantina 23

PARTE SPERIMENTALE 27

3 Scopo del lavoro 27

4 Materiali e metodi 28

4.1 Lieviti e terreni 28

4.2 Microfermentazioni su succo d'uva per la valutazione del vigore fermentativo 29

4.2.1 Preparazione del succo d'uva 29

4.2.2 Inoculo in bottiglia 30
4.2.3 Monitoraggio delle fermentazioni 30
4.3 Suscettibilità nei confronti di SO_2 e Cu 30
4.3.1 Resistenza a Cu 30
4.3.2 Resistenza a SO_2 32
4.4 Microfermentazioni su mosto di uve Sauvignon blanc 32
4.4.1 Preparazione del mosto 33
4.4.2 Monitoraggio delle fermentazioni 34
4.4.3 Analisi chimiche 35
4.4.4 Analisi microbiologiche 39
5 Risultati e discussioni 41
5.1 Evoluzione fermentativa 41
5.2 Resistenza a Cu 42
5.3 Resistenza a SO_2 46
5.4 Fermentazioni su mosto di Sauvignon 49
5.5 Analisi chimiche 52
5.6 Analisi microbiologiche 62
5.7 Risultati analisi aromi fermentativi 65
6 Conclusioni 68
7 Bibliografia 69

INTRODUZIONE

1 Lieviti *Saccharomyces*

I lieviti del genere *Saccharomyces* sono dei microorganismi eucarioti largamente studiati in biologia la cui fama è dovuta alle loro innumerevoli applicazioni industriali. Sono classificati in due grandi gruppi: *Saccharomyces sensu stricto*, che include specie strettamente correlate all'industria delle fermentazioni; e *Saccharomyces sensu lato,* a cui appartengono specie più distanti da *S. cerevisiae*. Il gruppo *Saccharomyces sensu stricto* comprende le specie *S. bayanus, S. cerevisiae, S. paradoxus* e *S. pastorianus* [1]. Più recentemente, tre nuove specie sono state introdotte, quali *S. cariocanus, S. kudriavzevii* e *S.mikatae*, seppur vi siano dibattiti ancora aperti su questo aspetto [2]. Questa classificazione non è ancora considerata sufficientemente accurata e diversi studi recenti hanno evidenziato l'inadeguatezza del raggruppamento, soprattutto in relazione alle specie *S. bayanus* e *S. pastorianus* [3].

Le specie all'interno di questo gruppo sono geneticamente molto correlate, al punto che la classificazione è stata dibattuta diverse volte e continua ad esserlo, perché la distinzione fra i diversi ceppi non è semplice, soprattutto perché le tecniche di identificazione, nonostante lo sviluppo dei metodi e delle conoscenze molecolari, prevede ancora prove basate su aspetti morfologici e fenotipici, che si riferiscono alla "tassonomia convenzionale". I limiti di questo approccio dipendono da: i) la morfologia del lievito non è un carattere stabile e può variare da ceppo a ceppo, anche appartenenti alla stessa specie; ii) la distinzione fra due taxa può essere attribuita anche ad uno o due soli aspetti fenotipici; iii) molte caratteristiche fenotipiche possono variare anche in funzione di un'unica mutazione in un singolo gene. Ci si è quindi indirizzati verso l'approccio molecolare, utilizzando l'rRNA e sul templato rDNA come *target*, poiché i ribosomi sono presenti in tutti gli organismi e la loro sequenza nucleotidica è altamente conservata. A questo scopo la regione 18S rRNA della subunità del ribosoma piccolo, permette efficacemente la distinzione fra taxa distanti; mentre le regioni

ITS sono più efficiente per la distinzione fra specie maggiormente geneticamente correlate, poiché contengono un alto grado di variabilità. Nel 1996 il genoma di *S. cerevisiae* è stato sequenziato rendendolo così il primo organismo eucariote di cui si conoscesse l'intera sequenza cromosomica [4], inoltre, è stato presto adottato come organismo modello da vari rami della biologia: microbiologia, biochimica, fisiologia, genetica o genomica, tra gli altri. La sua peculiarità principale è la capacità di produzione di etanolo. Nel 2013 è stato stimato che questa via metabolica sia frutto di una mutazione genetica iniziata ben 100 milioni di anni fa [5] atta a garantire la sopravvivenza della specie in una situazione di competizione, quale quella di accaparramento degli zuccheri fermentescibili. Questa via biosintetica è promossa dalla particolarità del metabolismo di *S. cerevisiae* che è regolato da due leggi contrapposte, l'effetto Pastuer e l'effetto Crabtree: se da un lato, infatti, la respirazione inibisce la via fermentativa, dall'altro, ad alti livelli di zucchero, si stima a partire da concentrazioni di 9 g/L, la via fermentativa viene preferita alla via respirativa [6]. Sembra che la spinta evolutiva che ha portato allo sviluppo dell'effetto Crabtree sia stata generata da meccanismi di competizione: in un ambiente ad alta concentrazione zuccherina, *S. cerevisiae* potrebbe competere per il substrato con altri microrganismi producendo EtOH, che grazie al suo effetto tossico, causerebbe una riduzione del microbiota competitore [7] [8].

Con l'industria enologica detiene una relazione millenaria tanto che ne sono state trovate tracce in un vaso vinario egiziano risalente al 3150 a.C. [9], da allora questi rapporti si sono rafforzati e gli studi che vedono protagonista *S. cerevisiae* si susseguono tutt'ora. Di pratica comune sono le fermentazioni pilotate, queste si differenziano in fermentazioni pure, ossia condotte da un unico ceppo inoculato, o in co-inoculo, in cui la metabolizzazione degli zuccheri è a carico di più specie inoculate che convivono all'interno del sistema. Guidare i processi fermentativi con l'utilizzo di colture starter selezionate è un'innovazione relativamente giovane nella storia della vinificazione [10] e non è diventata una pratica diffusa fino agli anni '70. Nelle fermentazioni pilotate l'incidenza nell'uso di *S. cerevisiae* è altissima, questo a monte delle sue caratteristiche intrinseche,

quali la resistenza ad alti livelli di zucchero, agenti antiossidanti (SO_2), bassi pH, temperature elevate e contenuti crescenti di etanolo. Si sommano a queste proprietà anche la sua capacità di produzione di metaboliti, essenziali nell'aumento della complessità di un vino. I composti prodotti in fase fermentativa sono soprattutto esteri, alcoli superiori e aldeidi [11], a cui si devono poi aggiungere altri composti definiti varietali in quanto propri, per l'appunto, della varietà. La produzione di esteri, siano essi acetici o etilici, è modulata dal lievito e dalla quantità di enzimi che esso stesso possiede [12]. Per quanto gli esteri siano i composti più rilevanti nella determinazione di un aroma, sono invece gli alcoli superiori ad essere quantitativamente più importanti e da studi condotti è stato dimostrato come sia la disponibilità di azoto, come fonte nutritiva per le cellule, a determinarne l'effettiva concentrazione [13]. I terpeni sono una classe di composti il cui rilascio in forma volatile è possibile grazie alla rottura di legami. Anche questa reazione può venire catalizzata da un enzima proprio delle cellule di lievito, ma è altrettanto vero che da studi è stato messo in evidenza come nei lieviti *Saccharomyces* questa attività sia limitata [14] [15] [10].

1.1 La fermentazione alcolica

La fermentazione degli zuccheri, di qualsiasi natura essi siano, è la tecnologia più antica esistente, ma al contempo anche la più impiegata oggigiorno. Attraverso questo processo le cellule, nel nostro caso di lievito, hanno la possibilità di degradare gli zuccheri in condizioni di anaerobiosi e utilizzarle per la loro nutrizione. Dalla fermentazione il composto principe che otteniamo è l'etanolo di cui conosciamo gli svariati utilizzi: produzione di biocarburante, consumo alimentare, produzione di profumi, disinfettante in ambito casalingo, solvente e coadiuvante microbiologico.

1.1.1 Biochimismo della fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica e la respirazione sono le vie metaboliche di cui i lieviti dispongono per la degradazione degli zuccheri, accomunate dal processo della glicolisi si differenziano poi sulla base dell'utilizzo dell'O_2, che è indispensabile per la respirazione, in quanto è la molecola accettrice di e^- nella catena di trasporto degli elettroni a livello della membrana mitocondriale, mentre non serve, dal punto di vista metabolico, per la fermentazione, che è quindi un processo anaerobico.

Il processo della glicolisi, conosciuto anche come via di Embden-Meyerhoff dal nome dei suoi scopritori, è una via metabolica anaerobica che si sviluppa nel citosol delle cellule [6]. Per comodità può essere scomposta in tre fasi successive: nella prima il glucosio viene convertito in glucosio-6-fosfato da un'esochinasi mediante l'utilizzo di ATP e un gruppo fosfato. Il glucosio-6-fosfato viene successivamente convertito nel suo isomero fruttosio-6-fosfato ad opera della fosfoglucosio isomerasi. A seguire, da quest'ultimo prodotto di reazione, abbiamo l'ottenimento di fruttosio-1,6-difosfato con l'utilizzo di una seconda molecola di ATP, la reazione è catalizzata dall'enzima fosfofruttochinasi. Si conclude in questo modo la prima fase della glicolisi. Nella seconda, partendo dal fruttosio-1,6-difosfato, otteniamo innanzitutto due prodotti: diidrossiacetone fosfato (DHAP) e gliceraldeide-3-fosfato, tra loro isomeri. La reazione è catalizzata dall'enzima aldolasi. Seppure quest'ultima reazione porti alla formazione di due molecole distinte in realtà l'equilibrio è fortemente spostato verso la gliceraldeide-3-fosfato, poiché viene sottratta molto velocemente per il proseguo della via glicolitica. Per questa ragione, il DHAP viene immediatamente convertito in gliceraldeide-3-fosfato grazie all'enzima triosofosfato isomerasi e dal bilancio netto della reazione otteniamo quindi due molecole di gliceraldeide-3-fosfato. Da questo punto tutti i prodotti di reazione, partendo da due reagenti, sono raddoppiati.

Nella terza fase della glicolisi, a partire dalla molecola di gliceraldeide-3-fosfato e per opera di un'ossidazione che vede coinvolto il NAD^+ che si riduce a NADH

e H^+, otteniamo 1,3-difosfoglicerato. La catalisi avviene grazie all'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi.

La fosfoglicerato chinasi catalizza la reazione mediante la quale da 1,3-difosfoglicerato otteniamo 3-fosfoglicerato e ATP, recuperando così la prima molecola energetica. Successivamente, 3-fosfoglicerato si converte in 2-fosfoglicerato, con l'enzima fosfogliceratomutasi. A seguito di una disidratazione, ossia la perdita di una molecola di acqua, catalizzata dall'enzima enolasi, otteniamo fosfoenolpiruvato (PEP). Questa molecola si caratterizza per la sua grande capacità di trasferire il gruppo fosfato e proprio a causa di ciò la piruvato chinasi ha la possibilità di rimuovere il gruppo fosfato dal PEP comportando la formazione di piruvato e recuperando la seconda molecola di ATP impiegata precedentemente [16].

Per una molecola di glucosio e due molecole di ATP il processo della glicolisi permette quindi la produzione di due molecole di piruvato, quattro molecole di ATP e due molecole di NADH. Successivamente, l'acido piruvico può essere utilizzato secondo due vie metaboliche, la respirazione (entrando nel ciclo di Krebs) in condizioni di aerobiosi o la fermentazione alcolica. Nelle condizioni presenti nel mosto d'uva (alta concentrazione zuccherina) pur in presenza di O_2 sarà la fermentazione l'unica via possibile, per l'effetto Crabtree, di cui precedentemente abbiamo discusso. [17] (Figura 1).

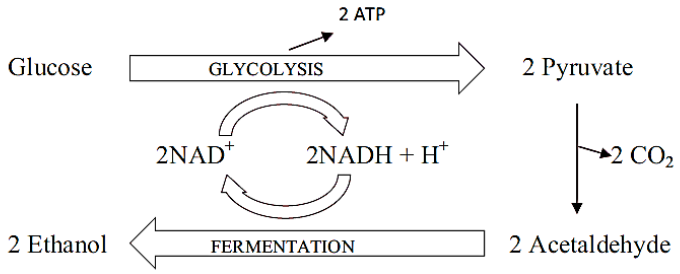


Figura 1 Glicolisi e fermentazione alcolica nei lieviti (Walker & Walkerx, 2018)

Affinché al fermentazione alcolica avvenga con successo, ci sono una serie di condizioni ceppo-specifiche che devono necessariamente essere rispettate, prime tra tutte temperatura, presenza di nutrienti nel mezzo e concentrazione della popolazione iniziale. Una volta raggiunte queste condizioni la fermentazione alcolica può quindi avere inizio: a partire dal piruvato si ha l'ottenimento di acetaldeide e CO_2 grazie all'enzima piruvato decarbossilasi. L'enzima alcol deidrogenasi catalizza la reazione mediante la quale da acetaldeide si ha la produzione di etanolo, con annessa rigenerazione di NAD^+ atto ad inizializzare un successivo processo di glicolisi [17] (Figura 2).

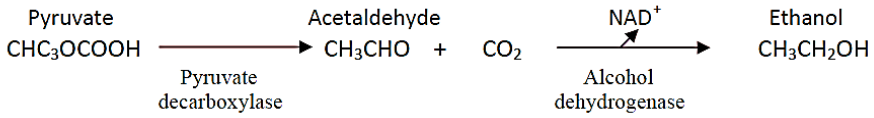


Figura 2 Biochimismo della fermentazione alcolica nei lieviti (Walker & Walkerx, 2018)

1.1.2 Temperatura di fermentazione

Tra i fattori che determinano la fermentazione sottolineiamo la temperatura, condizione ceppo-dipendente, tant'è che proprio grazie a questo parametro è possibile caratterizzarli. Alcune specie, soprattutto *Saccharomyces*, hanno delle capacità di crescita maggiori a optimum di temperatura più alti nel confronto con i non-*Saccharomyces.* Ne risulta quindi che nelle fermentazioni miste siano proprio i lieviti apiculati, comunque presenti a concentrazioni molto maggiori rispetto a *Saccharomyces* nel mosto, a prendere innanzitutto il sopravvento, bloccati poi dal crescente contenuto di etanolo e di temperatura stessa [18]. Ricordiamo che la fermentazione alcolica è una reazione esoergonica, dalla quale si liberano 23,5 Kcal per mole di zucchero fermentato [19]. La temperatura ha un effetto diretto sul metabolismo dei lieviti, sia regolando le loro capacità di crescita e colonizzazione, sia regolando la produzione di metaboliti secondari [20]. Diversi studi condotti hanno messo in evidenza come le fermentazioni

condotte a diverse e controllate temperature abbiamo portato a risultati significativamente differenti in termini di crescita microbica. Una temperatura tra i 15 e i 20°C induce in una fase di lag con durata maggiore e una velocità massima di fermentazione più lenta, ciò è dato dal rallentamento nella fase di crescita propria della biomassa, ma che una volta colonizzato il sistema, ha la capacità di mantenere un'alta concentrazione durante l'intero processo portando a compimento la fermentazione con un consumo totale degli zuccheri. Fermentazioni condotte tra 25 e 30°C hanno invece una fase di latenza (lag) più breve, la fermentazione in toto risulta temporalmente più corta, ma permette comunque un buon grado di consumo zuccherino. Temperature intorno ai 35 °C non danno la possibilità alle cellule di attraversare la fase lag, si trovano invece subito nella loro fase esponenziale di crescita raggiungendo la concentrazione massima di biomassa ben presto. Questo scenario non è però così positivo, la fase stazionaria ha la possibilità di durare solo per pochi giorni avendo un'immediata concorrenza tra le cellule stesse. In un tale stato di stress le cellule di lievito avranno la tendenza a morire residuando alte concentrazioni di zucchero. Lo stesso studio ha poi analizzato i principali parametri analitici correlati alle cinetiche fermentative sopra descritte: tra il tenore di etanolo e la temperatura esiste una correlazione inversamente proporzionale mentre, di contro, tra acido acetico, glicerolo, acido succinico ed acetaldeide esiste una correlazione direttamente proporzionale. L'unione di questi parametri ha influenza sulla resistenza del ceppo, concetto relazionato soprattutto alle naturali condizioni della loro area di isolamento [21].

Altri studi hanno dimostrano come l'adattabilità del lievito alla temperatura di fermentazione si basi sulla composizione della membrana plasmatica propria delle cellule di lievito, con particolare riferimento agli acidi grassi di cui la stessa si compone. Tra le molteplici specie considerate in tale saggio, si è visto come gli acidi maggiormente presenti siano acido palmitico ($C_{16}H_{32}O_2$), ossia quello con maggior grado di saturazione, acido palmitoleico ($C_{16}H_{30}O_2$), acido linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$) e acido linolenico ($C_{18}H_{30}O_2$) con un rapporto stabile tra C_{16}/C_{18}. Il generale aumento delle temperature in fase fermentativa aumenta la presenza di

acido palmitico mentre, in opposizione, il suo decremento induce un aumento della quantità di acido palmitoleico. La variazione dell'acido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) in relazione ai cambiamenti di temperatura, invece, risulta essere una caratteristica propria di ceppo [22]. La lunghezza della catena lineare di tali acidi e il loro grado di insaturazione favoriscono una maggiore fluidità della membrana, come già detto temperature elevate favoriscono la presenza di acidi grassi saturi che, a loro volta, determinano invece un irrigidimento della membrana, condizione che a lungo andare può comportare la morte della cellula [23]. Da studi successivi è poi emerso come un ruolo importante nell'abilità del lievito di sopravvivere a cambiamenti di temperatura lo giochino gli steroli [24], gruppo di composti chimici accomunati da una struttura di base, quella dello sterolo, con carattere anfipatico. La loro via biochimica di sintesi vede come reagente principe l'Acetil-Coenzima A, tale reazione avviene a livello cellulare, ma solo nel caso in cui durante tale fase la cellula si trovi in presenza di O_2 [25]. Pertanto, risulta di fondamentale importanza l'ossigenazione dei mostri, seppur esso si trovi in fermentazione, durante la fase iniziale della fermentazione, in modo che vi sia O_2 disponibile per la sintesi di steroli, seppur sia assolutamente inutile per la via metabolica.

1.1.3 Controllo della fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica è una reazione portata avanti dai lieviti è funzione anche delle condizioni in cui essi si trovano. [26]. Capiamo quindi come sia un processo molto delicato e, altrettanto lo è il suo controllo. Il consumo degli zuccheri, la quantità di energia richiesta per regolare la reazione, la densità del mezzo, la durata della fermentazione e la produzione di anidride carbonica sono i parametri che più comunemente vengono valutati ma, innanzitutto, è essenziale conoscere quali siano le condizioni di partenza e quali, invece, quelle d'arrivo. Alcuni autori hanno messo in evidenza come, di fatto, ci sia una correlazione lineare tra concentrazione di zucchero consumata e concentrazione di etanolo e diossido di carbonio invece prodotti [27]. Frutto di tali studi sono due equazioni che stabiliscono una correlazione lineare tra l'incremento in anidride carbonica e

la concentrazione di zucchero ed etanolo durante l'interno processo di fermentazione, con un margine di errore di ± 3% e ± 4%.
Ne consegue quindi che, conoscendo la quantità di CO_2 prodotta in fase fermentativa che può essere facilmente misurata valutando il costante decremento di peso della massa in fermentazione, possiamo indirettamente ricavare la quantità di zucchero consumata e, quindi, la quantità di etanolo prodotta [26].

1.1.4 Arresti fermentativi

Un arresto fermentativo è sempre un grande problema in cui il produttore può incorrere. Le cause possono essere molteplici, ma la conseguenza è comune a tutte: residuo zuccherino nel vino. In queste condizioni finali è facile che si innestino microorganismi indesiderati che potrebbero portare ad una trasformazione peggiorativa del prodotto. Purtroppo, un arresto fermentativo non è sempre prevedibile e quando si concretizza è ormai troppo tardi. A determinarlo sono le condizioni ambientali in cui il lievito si trova, prime tra tutte carenza di nutrienti, pH troppo basso, temperatura non adatta alla fermentazione, tossicità intrinseche date da etanolo, acidi grassi o acidi organici, presenza di tossine e presenza di altri microorganismi [28].
La carenza di nutrienti, due tra tutti azoto e fosforo, ostacola fortemente l'attività fermentativa dei lieviti in quanto, soprattutto nelle fasi iniziali di crescita, ha un effetto limitante nella divisione cellulare e quindi nella produzione di biomassa che potrà poi prendere il sopravvento [29]. Studi condotti hanno dimostrato come, per evitare eventuali problemi fermentativi, il mosto in partenza debba contenere concentrazione di azoto tra i 140 e i 160 mg/L con un contenuto di ammonio pari a 20 mg/L [6].
Dell'etanolo si conosce la capacità di riduzione della polarità in ambienti acquosi e il suo aumento, invece, in ambienti idrofobici, questo è strettamente correlato alle cellule del lievito e alla condizione in cui si trovano. L'etanolo ha quindi effetto diretto sulla membrana plasmatica delle cellule che, per adattarsi alle condizioni

di crescita, modificano la loro fluidità, ossia modificano il grado di insaturazione degli acidi grassi. Al contempo questo si traduce in un rallentamento degli scambi transmembrana e in una riduzione della possibilità di movimento della cellula [23].
Un altro fattore di stress, che come target ha la membrana plasmatica, è la temperatura. Come ben noto la temperatura di crescita ottimale di un lievito è una caratteristica ceppo-specifica. Ciò significa che in maniera individuale ogni lievito possiede un range di valori entro il quale è in grado di espletare al meglio la fermentazione alcolica, in condizioni che differiscono da queste la sua attività è senza dubbio modificata. Si è visto come le temperature basse vadano ad influenzare la fluidità della membrana plasmatica comportando una sua rigidità, le temperature alte, invece, ne aumentano la fluidità, ma possono altrettanto portare ad una denaturazione dei complessi amminoacidici. A livello di membrana ci riferiamo ai trasportatori [30] [31].
Una caratteristica intrinseca di alcuni lieviti è la capacità di produzione di tossine, comunemente conosciuta come fattore killer [32], altamente dipendente dal mezzo in cui si trovano [33]. Tali tossine vengono secrete e sono indirizzate in particolar modo da tutti quei ceppi considerati sensibili, ossia ceppi la cui attività viene inibita a seguito del contatto con tali agenti. Analoga azione hanno i composti prodotti da altri microorganismi, quali patogeni che attaccano la pianta della vite, a tali tossine si sommano poi i prodotti di risposta all'infezione che produce la pianta e a cui il lievito è altrettanto sensibile [34]. Anche delle pratiche enologiche troppo spinte, a titolo di esempio la chiarifica, possono portare ad un blocco dell'attività metabolica del lievito. Questi, di fatto, trovandosi in un ambiente povero di nutrienti risentono lo stress fino a raggiungere la morte cellulare [35].
Nel corso della fermentazione alcolica generalmente una specie ha la capacità di prendere il sopravvento sulle altre, ciò non toglie che in taluni casi ci possano comunque essere interazioni tra specie atte in ogni caso a consumare lo zucchero nel mezzo per la produzione di etanolo [36]. Se per una delle ragioni elencate sopra si incorre in un arresto fermentativo questo può dare spazio a specie differenti di proliferare, generalmente specie che in condizioni normali non

sarebbero riuscite a prendere il sopravvento, portando a fermentazioni indesiderate. Queste si caratterizzano per la produzione di metaboliti secondari con accezione negativa in grado di deteriorare il prodotto [37].

1.2 Caratteri di selezione del lievito

1.2.1 Vigore fermentativo

Con vigore fermentativo intendiamo la velocità con la quale un lievito inizia la fermentazione, valutata mediante la quantità di CO_2 prodotta [38]. La velocità di inizio fermentazione è un parametro strettamente legato alla percezione che le cellule di lievito hanno delle caratteristiche chimico-fisico e ambientali del mezzo e quindi alla loro capacità di adattamento in esso. I segnali chimici riguardano il livello di nutrienti presenti (zuccheri, azoto, ossigeno, vitamine…), ma anche la presenza di eventuali sostanze inibitrici, quali etanolo, residui di trattamenti o tossine killer. Per discriminare un lievito sulla base del suo vigore fermentativo è opportuno conoscerne la cinetica di crescita, comunemente descritta con una funzione sigmoidale. Questa si compone di una serie di fasi successive, prima tra tutte la fase di latenza (lag) nel mezzo che concretamente è quella che determina l'efficienza del ceppo. Maggiore è il tempo richiesto per l'adattamento e minore sarà la sua capacità di propagazione, a favore delle altre specie contemporaneamente presenti nel sistema. *S. cerevisiae* è considerato un ceppo buon fermentatore proprio sulla base di questa asserzione, le sue caratteristiche strutturali e comportamentali gli conferiscono la capacità di ambientarsi velocemente nel mezzo iniziando ben presto la sua fase di proliferazione (fase esponenziale). In quest'ultima la concentrazione netta di cellule vive è di gran lunga superiore a quella delle cellule morte, determinando quindi un generale aumento della biomassa microbica. Parallelamente però le cellule, svolgendo la loro attività di respirazione e/o fermentazione, provocano una variazione nell'ambiente in cui si trovano rendendolo non più accomodante alla loro proliferazione. Ne consegue un incremento nella mortalità delle cellule e un decremento nel tasso di crescita (fase stazionaria) che si protrae fintanto che non

viene raggiunta l'ultima fase della curva di crescita ossia quella in cui il numero di cellule vive è pari a zero (fase di morte) [39] (Figura 3).

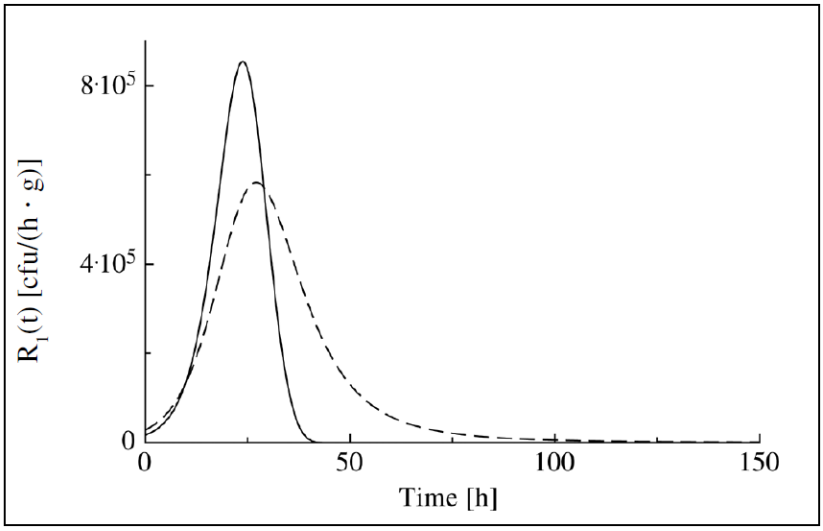


Figura 3 Evoluzione della crescita cellulare durante la fermentazione da modelli previsionali, la linea continua e la linea tratteggiata rappresentano i due test eseguiti

1.2.2 Resistenza al rame

La resistenza al rame è uno dei caratteri tecnologici di selezione del lievito e la sua valutazione risulta importante in quanto, con la diffusione delle pratiche colturali biologica, sempre più spesso i lieviti si trovano a fare i conti con questo metallo in fase fermentativa. La sua presenza è di rilevante importanza, in quanto è coinvolto in molte reazioni biochimiche in veste di cofattore enzimatico, nello specifico partecipa alle reazioni di trasferimento di elettroni. Da questo deduciamo come la quantità di rame richiesta per l'espletamento di tale funzione sia minima, concentrazioni elevate sono quindi un fattore di grande stress per le cellule di lievito [40]. La tossicità intrinseca del rame è funzione del suo grado di solubilità, assorbimento, trasporto, reattività ed organismo. Infatti, esso è per tutti gli organismi, dai microrganismi unicellulari agli organismi pluricellulari, fino all'uomo, un oligoelemento, indispensabile a concentrazioni piccolissime (ppm),

ma tossico a concentrazioni superiori, causando, ad esempio nell'uomo, problemi neurotossici, epatotossici o nefrotossici. Una delle proprietà più rilevanti del rame riguarda la sua capacità di ossidoriduzione, coinvolta nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) e nella catalisi della reazione di perossidazione delle molecole lipidiche [41]. A seguito di ciò le cellule, nel nostro specifico caso cellule fungine, hanno la necessità di mettere a punto dei meccanismi di detossificazione, primo tra tutti la produzione di metallotioneine (MT) ed enzimi con funzione antiossidante. Le MT rappresentano un gruppo di molecole di natura proteica caratterizzate dall'abbondanza di cisteina nella loro struttura, dal loro basso peso molecolare e dalla loro capacità di legare i metalli mantenendo così la naturale omeostasi della cellula. Analizzandole da un punto di vista prettamente strutturale si evidenzia la presenza di due differenti domini di legame, α e β, costituiti da cisteina che portano con sé, rispettivamente, tre e quattro siti di legame altamente affini con gli ioni metallici [42] (Figura 4).

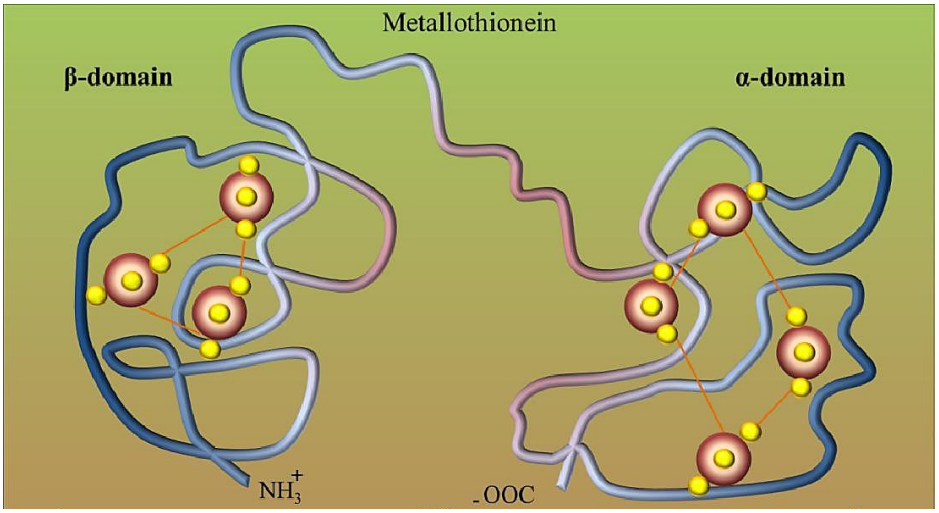


Figura 4 Struttura di una metallotioneina, sono evidenziati i domini di legame α e β e gli ioni metallici a loro affini. (Ruttkay-Nedecky, et al., 2013).

Studi condotti hanno messo in evidenza come in *S. cerevisiae* le MT siano codificate dal gene CUP1 e dal gene CRS5. In un mezzo carente in rame il gene CUP1, presente in molteplici copie nel genoma cellulare, è di difficile individuazione, proporzionalmente invece al progressivo aumento di ioni rame aumenta anche la sua presenza che rimane poi stabile nel tempo. Invece, per quanto concerne il gene CRS5, presente in unica copia nel genoma, è stato dimostrato come anch'esso in assenza di rame abbia una concentrazione minima, tendente all'aumento con l'inserimento del metallo nel mezzo [43].

Oltre a questa tecnica di detossificazione è opportuno citarne altre, considerate secondarie, ma di importanza comunque rilevante. A risposta della concentrazione eccessiva di rame le cellule sono in grado di attivare specifici enzimi definiti superossido dismutasi (SOD) con azione di forti antiossidanti. Esistono all'interno di una cellula numerose SOD, differenziate sulla base del metallo che funge da cofattore enzimatico. Nel caso-studio di Bannister et. al.[80] (1987) le SOD coinvolte sono le rame/zinco superossido dismutasi, codificate in *Saccharomyces cerevisiae* dal gene SOD1. La loro attivazione ha permesso di abbattere i ROS risultanti dal metabolismo ossidoriduttivo del rame, salvaguardando così membrane biologiche (membrana citoplasmatica, membrana mitocondriale, membrana lisosomiale), proteine e acidi nucleici della cellula. L'eccesso di ioni rame è in grado di inibire i geni che codificano per i trasportatori di membrana, gli importatori intracellulari e le proteine *chaperone* intracellulari, tutti coinvolti e nella distribuzione e nel passaggio degli ioni rame da e verso la cellula [43]. I geni che codificano per i trasportatori svolgono però un'ulteriore funzione: sono in grado di attivare la trascrizione dei geni che codificano per le MT, ne deriva quindi che con una loro inibizione l'attivazione delle MT non potrà avvenire, provocando la distruzione dell'integrità della cellula e quindi la sua morte [44].

La resistenza al rame è una caratteristica di ceppo, ciò significa che la concentrazione minima alla quale le cellule vengono inibite avrà difficilmente un valore standard e univoco.

1.2.3 Resistenza alla solforosa

L'anidride solforosa (SO_2), grazie alle sue caratteristiche di antiossidante, antiossidasico e antisettico, trova largo impiego nel settore enologico, in particolar modo con lo scopo di preservare antociani e catechine, entrambi composti fenolici altamente sensibili all'ossidazione. Espleta queste funzioni all'interno del sistema vino grazie alla sua capacità di dissociazione, strettamente correlata al pH del mezzo, dalla quale si ottengono tre differenti specie: anidride solforosa molecolare ($SO_2 \cdot H_2O$) stabile da pH 0 a pH 2, bisolfito (HSO_3^-) stabile da pH 3 a pH 7 e solfito (SO_3^{2-}) stabile da pH 7 a pH 10. La stechiometria di tali reazioni è la seguente (Figura 5):

$$SO_2 + H_2O \leftrightarrow SO_2 \cdot H_2O$$
$$SO_2 \cdot H_2O \leftrightarrow HSO_3^- + H^+$$
$$HSO_3^- \leftrightarrow SO_3^{2-} + H^+$$

Figura 5 Stechiometria di reazione di dissociazione dell'anidride solforosa nel sistema vino

L'anidride solforosa può essere presente nel sistema vino in quanto metabolita secondario della fermentazione alcolica ma, se presente in concentrazioni considerevoli, deriva da aggiunte esogene. In entrambi i casi la sua presenza ha un effetto sulle cellule di lievito le quali innescano delle reazioni atte a ripristinare l'omeostasi. L'effetto antisettico nei confronti dei microorganismi presenti nel vino, intesi sia come batteri che come lieviti, è dato dall'inibizione della loro crescita microbica, frutto di tre azioni sinergiche che la SO_2 è in grado di esercitare. Di fatto, a livello di membrana citoplasmatica, sono presenti dei recettori specifici a cui l'anidride solforosa si lega provocandone un generale danneggiamento, oltre a questo la cellula subisce una progressiva perdita di metaboliti secondari e una diminuzione intracellulare della concentrazione di ATP. Tra i complessi enzimatici legati alla membrana troviamo le ATPasi la cui funzione principale è quella di regolare il passaggio dei soluti da e verso la cellula, in caso di presenza di anidride solforosa questa innesca una rapida reazione di idrolisi dell'ATP, reazione catalizzata dall'innalzamento della temperatura, a cui

segue un blocco di tutte le reazioni biochimiche ATP-dipendenti. Questa reazione gode però di reversibilità, dagli stessi studi è infatti emerso come in assenza di solforosa le stesse cellule, con cinetiche di 15 minuti circa, siano in grado di rigenerare la concentrazione di ATP iniziale determinando la loro sopravvivenza nel mezzo [45].

L'anidride solforosa nella sua forma molecolare, godendo di un'assenza di carica, ha la capacità di entrare in maniera passiva (diffusione facilitata) nella cellula. Una volta giunta al citosol si trova in condizioni differenti rispetto al mezzo, soprattutto in termini di pH, e questo induce la sua dissociazione con produzione di bisolfito [46]. Di contro il passaggio dello ione bisolfito, avendo carica netta negativa, avviene mediante un trasporto mediante simporto mediato da protoni, questo perché deve sempre essere assicurato il mantenimento del pH cellulare. In entrambi i casi è stato messo in evidenza come il suo ingresso all'interno della cellula abbia un effetto immediato nell'inibizione della gliceraldeide-3-fosafto deidrogenasi, enzima che gioca un ruolo chiave all'interno del processo glicolitico, in quanto permette la catalisi della reazione che porta alla formazione di due molecole di 1,3-difosfoglicerato a partire da due molecole di gliceraldeide-3-fosfato. La sua inibizione, a cascata, non permette né la riduzione del NADH, né l'ottenimento finale del piruvato, ne consegue quindi che le cellule di lievito, non potendo più portare a termine la fermentazione in un mezzo deficitario di ossigeno, vadano incontro a morte [47]. Oltre a ciò, va considerata anche l'elevata affinità dell' anidride solforosa con l'acetaldeide, legandosi a quest'ultima non la rende disponibile per la fase terminale del processo di fermentazione condannando la cellula, analogamente alla reazione sopra descritta, a morte [48]. È proprio basandosi su questa affinità che la cellula mette a punto i suoi meccanismi di detossificazione, con una produzione massiva di acetaldeide lega la solforosa presente nel mezzo evitando che possa produrre danni irreversibili [49] e , contemporaneamente, produce glicerolo. Grazie a questo processo, infatti, mantiene l'equilibrio redox cellulare, riossidando il NADH a NAD^+, compensando la mancata riossidazione causata dal blocco della fermentazione a livello dell'acetaldeide.

L'effetto della solforosa nei confronti dei microorganismi non è generalizzabile, bensì strettamente dipendente dallo stato fisiologico in cui la cellula si trova, dalla specie e addirittura dal ceppo della singola specie. La resistenza alla SO_2 è una capacità codificata da molteplici geni che, in condizioni di contatto prolungato, hanno subito delle mutazioni utili a garantire la sopravvivenza della specie. Nonostante le sue accezioni negative la presenza di anidride solforosa, nella forma di ione solfato (SO_4^{2-}), è fondamentale per la vita del lievito, poiché viene utilizzata nelle reazioni di produzione di amminoacidi contenenti zolfo, tra cui cisteina e metionina [50], anche se non è mai stato dimostrato come una carenza di questi amminoacidi si traduca in una maggiore resistenza alla SO_2.
L'utilizzo dell'anidride solforosa è ad oggi normato e i termini per il suo impiego sono descritti dalla RISOLUZIONE OIV-OENO 9/98 varata dall'Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino, un'organizzazione intergovernativa che intrattiene un forte legame in collaborazione con l'Unione Europea, dalla quale viene riconosciuta.

1.2.4 Potere aromatizzante

Nella caratterizzazione di un vino particolare importanza ha la parte aromatica, responsabile della complessità e dell'accettabilità dello stesso. Gli aromi che vengono percepiti all'olfatto, al retrolfatto o al gusto sono frutto di una serie di reazioni chimiche e la loro via di sintesi differisce sulla base del singolo aroma che si sta valutando. Molti sentori, definiti come varietali, provengono e sono caratterizzanti la varietà d'uva impiegata, altri definiti come aromi terziari si sviluppano solo in fasi successive alla fermentazione, quali le fasi di affinamento e maturazione, mentre una terza classe di composti, quella per noi più rilevante, prende vita durante il processo di fermentazione ad opera dei lieviti che la conducono. Quest'ultimi aromi, comunemente chiamati aromi fermentativi, sono a loro volta divisi in gruppi: esteri, aldeidi, alcoli superiori e terpeni [51]. Gli esteri sono forse i composti più rilevanti e da studi condotti è stato evidenziato come la loro produzione, nel caso di *S. cerevisiae*, sia codificata da sei geni. I geni ATF1,

Lg-ATF1 e ATF2 codificano per il meccanismo d'azione dell'enzima alcol acetiltransferasi, rendendoli così i più rilevanti nella produzione di esteri. Il gene EHT1 codifica invece per l'enzima esanolo transferasi, coinvolto nella sintesi e nell'idrolisi di esteri derivanti da acidi grassi a media catena. Il gene EEB1 codifica per gli enzimi etanolo acetiltransferasi e etil idrolasi e il gene IAH1 codifica per i meccanismi di esterasi ed è coinvolto nell'idrolisi degli esteri acetici [12]. Dalla loro attività è possibile quindi la produzione di esteri, diversificandoli in esteri acetici ed esteri etilici. I primi si costituiscono di un gruppo acido, come l'acetato, e di un gruppo alcolico che può essere costituito da etanolo o da alcoli superiori, mentre i secondi sono formati da un gruppo alcolico, etanolo, e un gruppo acido costituito in questo caso da acidi grassi a corta o media catena [13] [12]. Si suppone che le cellule di lievito mettano a punto i sopra descritti meccanismi di produzione di esteri per una questione di equilibrio, nel caso degli esteri etilici la cellula ha la necessità di mantenere costante la concentrazione di Acetil-CoA, mentre nel caso di esteri etilici ha la necessità di detossificarsi dagli acidi grassi a media catena [52] (Figure 6 e 7).

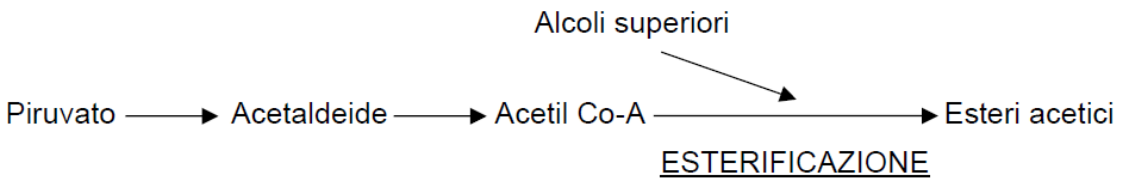


Figura 6 Reazione di esterificazione tra acetil-CoA e alcoli superiori

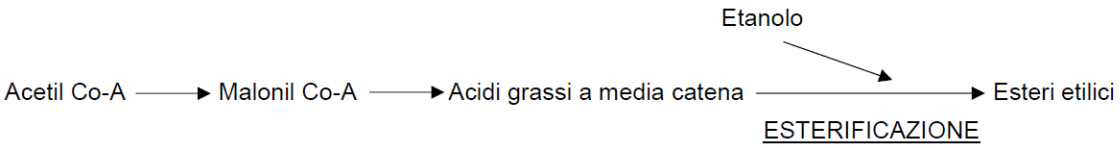


Figura 7 Reazione di esterificazione tra acidi grassi a media catena e etanolo

Gli alcoli superiori rappresentano, invece, i composti maggioritari all'interno del sistema vino. La loro produzione parte dall' α – chetoacido, il quale può avere

origine amminoacidica, e in questo caso l'amminoacido da cui si origina ha diretta influenza sull'alcol superiore, o glucidica [53] (Tabella 1).

Tabella 1 Corrispondenza tra amminoacido catabolizzato e alcol superiore prodotto

Amminoacido	→	**Alcol superiore**
Leucina (Leu)		3-metilbutanolo
Valina (Val)		2-metilpropanolo
Isoleucina (Ile)		2-metilbutanolo
Fenilalanina (Phe)		2-feniletanolo
Tirosina (Tyr)		2-(4-idrofenil) etanolo
Triptofano (Trp)		2-(indol-3-il) etanolo
Metionina (Met)		3-(metil) propanolo

La reazione di produzione degli alcoli superiori a partire da amminoacidi prende il nome di via di Ehrlich, innanzitutto a carico del singolo amminoacido avviene una reazione di transaminazione, necessaria per l'ottenimento dell'α – chetoacido. A questo punto l' α – chetoacido viene decarbossilato nell'aldeide corrispondente e da qui la reazione può procedere verso due strade differenti: in presenza di ossigeno l'aldeide viene ossidata producendo l'acido corrispondente, mentre in condizioni di anaerobiosi (quindi in condizioni di vinificazione) viene ridotta all'alcol corrispondente [54]. In *S. cerevisiae*, nelle reazioni iniziali della via di Ehrlich, sono implicate due proteine: Twt1p e Twt2p. La proteina Twt1p è coinvolta nell'attività di amminotransferasi all'interno del mitocondrio e risulta espressa durante la fase di crescita esponenziale, mentre repressa in quella stazionaria, la proteina Twt2p si occupa dell'attività di amminotransferasi, ma all'interno del citosol e la sua espressione è opposta alla proteina Twt1p (espressa nella fase stazionaria e repressa nella fase esponenziale di crescita) [54].

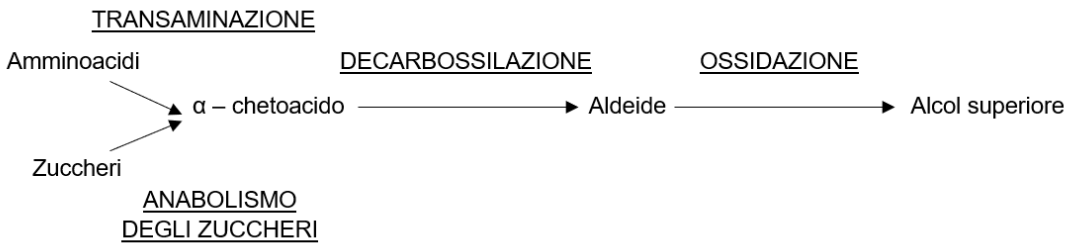


Figura 8 Reazione di produzione degli alcoli superiori, via di Ehrlich e anabolismo degli zuccheri (tramite il Ciclo di Kebs, uscita di α – chetoglutarato)

Anche le aldeidi sono una classe di composti molto importante nella formazione dell'aroma di un vino e sono uno dei metaboliti secondari maggiormente prodotti con la fermentazione alcolica. L'80% delle aldeidi prodotte dal lievito è costituito da acetaldeide, molecola precursore dell'etanolo, anche se la loro formazione non si limita a questa via bensì si verifica anche in fase di affinamento quando, a carico delle microssigenazioni, avviene l'ossidazione dell'etanolo [51].

I tioli sono composti strutturalmente molto simili agli alcoli sopra descritti, differiscono però per la presenza di un gruppo -SH, invece di un ossigeno, all'interno del gruppo idrossile. Sono molecole che è giusto citare, in quanto rappresentative dei Sauvignon, in particolar modo del Sauvignon blanc e le molecole più frequenti sono 3-mercaptoesan-1-olo (3MH), 3-mercaptoesilacetato (3MHA) e 4-mercapto-4metilpentan-2-one (4MMP) [55]. Si caratterizzano tutte per le basse soglie di percezione e riconoscimento, talmente basse da renderli piacevoli a concentrazioni basse (sentori di frutto della passione, foglia di pomodoro, tropicale) e negativi invece a concentrazioni elevate (sentori di urina di gatto) [56]. Di base i tioli sono di derivazione varietale e i loro precursori possono essere molecole glutatione-coniugate o cisteina-coniugate [57], ma la loro trasformazione in composti volatili è una reazione di competenza esclusiva dei lieviti, possibile grazie al corredo enzimatico in loro possesso. Ne deriva che le caratteristiche genetiche e fisiologiche dei vari ceppi giochino un ruolo fondamentale nella quantità di tioli volatili rilasciati, tanto che numerosi studi si sono espressi in questo senso dimostrando proprio come esista una sostanziale differenza addirittura tra ceppi appartenenti alla stessa specie [56]. L'ultima

classe di composti che è opportuno citare sono i terpeni, anch'essi derivano da precursori naturalmente presenti sulle uve e, allo stesso modo, la loro liberazione in forma volatile può avvenire solo a carico delle cellule di lievito. Questa attività la si deve ad una tipologia di enzimi in particolare, le β-glucosidasi, di cui è stata però verificata la scarsità nei lieviti Saccharomyces [15] [58].

1.2.5 Liberazione di mannoproteine

Le mannoproteine sono la seconda componente più importante della parete cellulare del lievito, ne costituiscono infatti circa il 40%. Sono dislocate principalmente nello strato più esterno della parete e ne sono in parte responsabili della sua permeabilità [59]. La loro struttura è composta da polisaccaridi in misura dal 50 al 95%, con una prevalenza di mannosio [60], mentre la parte rimanente si costituisce di proteine. La loro rilevanza in ambito enologico nasce dalle caratteristiche intrinseche di cui le mannoproteine godono, infatti sono utilizzate a seguito della loro capacità di assorbimento di tossine, in particolar modo l'Ocratossina A, di complessazione della componente fenolica, di aumento della biomassa di batteri malolattici e quindi attivazione della fermentazione malolattica, di riduzione della precipitazione del tartrato, di supporto alla componente aromatica del vino [61], ma anche di stabilizzazione del colore e di riduzione dell'astringenza dei tannini [62]. Alcuni studi condotti hanno dimostrato come la composizione della parete cellulare del lievito sia frutto delle sue condizioni di crescita, in particolar modo hanno importanza diretta la natura della fonte carboniosa, la nutrizione azotata disponibile, il pH e la temperatura [63]. Il rilascio di mannoproteine all'interno del sistema vino avviene generalmente alla fine del processo di fermentazione alcolica con l'autolisi cellulare, sebbene alcuni ceppi siano in grado di rilasciarne in maniera graduale anche durante tutto tale processo [64]. Primo tra tutti sembra sia stato Salkowski, studioso di chimica fisiologica e patologia, nel 1875 a utilizzare il termine "autolisi" per descrivere il processo biochimico di distruzione cellulare. Tale processo, indotto da sfavorevoli condizioni ambientali, costringe le cellule di lievito a morte

non avendo più la possibilità di moltiplicarsi. Nello specifico nella reazione di autolisi avviene un'idrolisi cellulare che, Babayan et al. (1981) nel loro studio dividono in quattro distinti e salienti momenti. Innanzitutto avviene un'alterazione nella struttura di membrana citoplasmatica, rivestimento esterno, e lisosoma, sistema digerente della cellula, tale da far espellere enzimi idrolitici e relativi substrati. Con la loro attivazione gli enzimi iniziano un'interazione con i polimeri presenti nella cellula e da questa reazione si ha l'accumulo di prodotti idrolizzati tra la stessa membrana citoplasmatica e la parete del lievito (periplasma) che, date le ridotte dimensioni, diffondono nell'ambiente extracellulare. Contemporaneamente avviene però anche la degradazione della parete stessa, ossia di mannoproteine e glucani di cui si compone, e questo determina la produzione di pori con dimensioni elevate, di conseguenza un'evacuazione più rapida dei prodotti di autolisi. Nonostante questo processo determini la morte cellulare non è da considerarsi prettamente negativo, anzi. Quelle che vengono definite come "fecce di lievito", se tenute a contatto con il vino, possono determinarne un miglioramento nella qualità e nella longevità, come testimoniato dagli Champagne e dai vini invecchiati, le cui tempistiche di permanenza sulle fecce sono altamente variabili, da qualche mese fino anche a dieci anni [65] [66].

2 Refrigerazione industriale

2.1 Frigorie in cantina

La fermentazione alcolica, come sopra descritto, è una reazione esoergonica, ossia una reazione che induce la produzione di calore quantificabile in kJ o, stando al Sistema Internazionale, in kcal. La valutazione dell'effettivo flusso di calore è stata fonte di discussione per molti autori, i quali a monte di studi condotti hanno decretato come valido il valore di 100,32 kJ per mole di zucchero metabolizzata [67]. Il calore, in quanto forma di energia scambiabile, viene in parte dissipato mediante le pareti dei vinificatori e in parte viene perso per evaporazione. La sua quantità netta è funzione di svariati parametri tra cui la quantità di zuccheri nel mosto, l'acidità totale, la temperatura a cui è condotta la fermentazione e la durata della stessa [68]. Secondo la Federation Départamentale des Centres d'Etudes et d'Informations Oenologiques di Gironde la produzione di calore in fase fermentativa è studiata dall'equazione Riportata in Figura 9 [69].

$$Q = \frac{\rho \cdot C_e \cdot D_t \cdot VF \cdot V}{100{,}32}$$

dove:
ρ rappresenta la densità del mosto vino espressa in kg/m^3
Ce rappresenta il calore specifico del mosto vino espresso in kJ/kg °C
Dt rappresenta l'aumento di temperatura espresso in %vol
VF rappresenta lo stato della fermentazione espresso in %vol/J
V rappresenta il volume totale espresso in m^3
100,32 è il calore espresso come valore numerico individuato come produzione media in termini di Joule ogni mole di zucchero fermentato.

Figura 9 Produzione di calore in fase fermentativa. L'equazione considera la densità del mosto (kg/m3), il calore specifico del mosto-vino (kJ/kg °C), l'aumento di temperatura (%vol), lo stato della fermentazione (%vol/J), il volume totale (m3) e la produzione media di energia (J) per mole di zucchero fermentato (Federation Départamentale des Centres d'Etudes et d'Informations Oenologiques di Gironde)

Oltre a questi fattori è opportuno considerare anche l'ubicazione del vinificatore in cui sta avvenendo la fermentazione, luogo che può essere maggiormente o minormente esposto ai raggi del sole. Questi ultimi hanno la loro influenza nel riscaldamento della vasca, studi condotti hanno infatti messo in evidenza come

il contributo termico di una vasca esposta al sole sia di circa 400 w/m^3 in inverno e di 800 w/m^3 in estate [70]. Ne consegue che nella valutazione della quantità di calore totale prodotto dalla fermentazione i fattori siano quindi molteplici, descritti dalla equazione in Figura 10.

$$Q_{totale} = Q_{fermentazione} - Q_{dissipato} \pm Q_{ambientale}$$

Figura 10 Calore (Q) totale prodotto dalla fermentazione. L'equazione tiene conto del calore prodotto dalla reazione esoergonica della fermentazione, del calore dissipato e del calore ambientale

Queste considerazioni risultano utili nell'ottica di una refrigerazione industriale, l'enologia moderna tende a controllare in maniera molto serrata la temperatura di processo, ma non solo durante la fermentazione alcolica, bensì durante quasi tutte le fasi della vinificazione, dalla pigiatura delle uve fino alla stabilizzazione tartarica. Molti sono gli autori a sostegno di questa pratica, finalizzata, soprattutto nel caso di fermentazione di uve a bacca bianca, a preservare gli aromi, indurre la produzione di nuovi precursori aromatici e ridurre l'uso di SO_2 [69].

Nelle operazioni di refrigerazione i sistemi utilizzati in cantina sono molteplici, per una facilità di comprensione possono essere distinti in sistemi a refrigerazione diretta e sistemi a refrigerazione indiretta. Nella prima si occorre all'utilizzo di un fluido frigorigeno, il quale può avere varia natura, ad oggi i più impiegati sono l'ammoniaca (R 717) e il Freon (R 22) [69], si trova all'interno di un evaporatore e, con la sua espansione, sottrae calore dalla massa da refrigerare [71]. Il mosto vino può subire così vari passaggi atti a raggiungere la temperatura di processo desiderata, oppure uno unico, ma con un abbattimento repentino della temperatura [69].

La refrigerazione indiretta si diversifica per il fatto che il fluido refrigerante è in questo caso in grado di refrigerare per tempi lunghi la massa da trattare, inoltre, risulta molto versatile e semplice da condurre attraverso un circuito di mandata e di ritorno opportunamente dotato di pompa [69]. La decisione circa il tipo di impianto e le frigorie da produrre si basano sulla dimensione della cantina, le condizioni del mosto vino e la disponibilità degli impianti. E' prassi diffusa, nella

progettazione di una cantina, tarare il fabbisogno di frigorie con un sovradimensionamento che va dal 30% al 50%, per assicurarsi una copertura maggiore ma, a con lo svantaggio di costi di investimento e mantenimento dell'impianto molto elevati [71].

Nardin et al. (2006) hanno studiato la potenza media espressa in kW di un impianto di refrigerazione impiegato per il raffreddamento di una massa in fermentazione, in tale studio sono stati messi a confronto i consumi che un'azienda sosterrebbe sia in presenza che in assenza di sovradimensionamento dell'impianto (Figura 11).

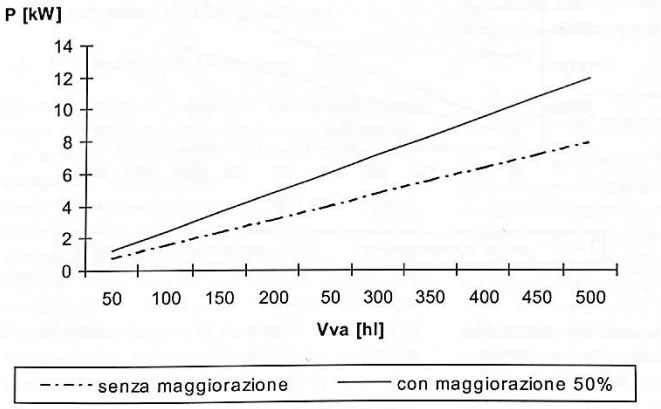


Figura 11 Potenza frigorifera media in kW in relazione alle capacità geometriche della vasca con un periodo di fermentazione di 8 gg (Nardin et. al., 2006)

Parallelamente l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), noto ente di ricerca per il settore viticolo ed enologico, ha messo a punto un sistema consultabile online che permette di avere informazioni circa il dispendio energetico necessario per le varie operazioni enologiche. Grazie ad una serie di informazioni, come la tipologia di vinificazione che si intende allestire, il volume del serbatorio, il materiale di cui questo è costituito, la sua forma, la sua dimensione e la sua superficie di scambio, è possibile ottenere un dato vicino a quello reale, rendendosi immediatamente conto come una realtà produttiva anche di piccole dimensioni abbia un fabbisogno energetico non indifferente. Ad oggi, secondo

trimestre 2023, il costo medio dell'energia in fascia F1, ossia fascia diurna, ammonta a 0,075 euro/kWh (fonte ARERA). A monte di questo ragionamento si capisce come la refrigerazione sia una pratica talvolta fondamentale nell'industria enologica ma, di contro, assolutamente onerosa.

PARTE SPERIMENTALE

3 Scopo del lavoro

L'utilizzo di lieviti starter ha da sempre vincolato la temperatura di fermentazione, caratteristica ceppo-specifica. Quest'ultima, se ben gestita, garantisce infatti il corretto espletamento della fermentazione alcolica mentre, di contro, se non regolata può sfociare in un possibile arresto fermentativo dato dalla condizioni di stress in cui le cellule di lievito si troverebbero. Deduciamo quindi come il controllo e il mantenimento della temperatura debbano essere eseguiti quotidianamente, operazioni possibili grazie all'uso di impianti di refrigerazione industriali muniti di sonde per il rilevamento della temperatura in posizioni ottimali. Tali impianti, di costo e dimensione considerevoli, permettono il raffreddamento dei vinificatori sottraendone calore, il quale viene misurato come frigoria. Maggiore è la temperatura della massa vendemmiata, maggiore sarà la temperatura del vinificatore e maggiori saranno quindi le frigorie impiegate. A discapito di questa situazione già di per sé onerosa, sia da un punto di vista energetico, che da un punto di vista economico, si aggiunge l' incessante riscaldamento climatico. Questa condizione, oltre a determinare una variazione annuale circa l'epoca vendemmiale, ha comportato anche la ricezione di uve, sempre in fase vendemmiale, con temperature significativamente più elevate. Ciò determina indirettamente un maggior consumo di frigorie che sommato poi alla condizione sociale attuale che vede i costi delle energie spaventosamente alti, una spesa sempre maggiore per i produttori.

Il presente lavoro è frutto quindi di una ricerca atta ad individuare dei ceppi di lieviti, appartenenti al genere *Saccharomyces*, in grado di fermentare a temperature elevate pur mantenendo pressoché stabile il profilo organolettico del vino fermentato. La necessità di svolgere questa sperimentazione nasce dalla volontà di fronteggiare le debilitanti condizioni climatiche ed economiche che ci troviamo a vivere abbracciando anche il concetto di biodiversità.

4 Materiali e metodi

4.1 Lieviti e terreni

I lieviti impiegati nel seguente lavoro sono stati isolati ed identificati a partire da uve di varietà differente, nello specifico Sauvignon blanc, Malvasia e Tocai Friulano, provenienti dalla zona del Collio friulano. Appartengono tutt'ora alla ceppoteca dell'Università degli Studi di Udine. Prima di essere impiegati nelle varie fasi di lavoro sono stati adeguatamente preparati. Lavorando in sterilità sono state allestite le colture madri facendo crescere i ceppi selezionati all'interno di tubi contenenti malto brodo (Oxoid, Milano, Italia) per 24 ore ad una temperatura costante di 30 °C.

Dalla coltura madre sono stati prelevati 100 µl di cellule di lievito e sono stati inseriti all'interno di un tubo contenente 5 ml di terreno malto brodo. Sia al momento del prelievo che al momento dell'inserimento nel tubo il contenuto di questi ultimi è stato opportunamente miscelato servendosi del vortex. A seguire le cellule sono state incubate a 30 °C per 48 ore, l'intero processo è stato ripetuto per tre volte.

La coltura finale ottenuta, prevede di avere cellule in fase stazionaria iniziale ad una concentrazione pari a 10^8 UFC/mL, così da poter standardizzare gli inoculi per tutte le fasi sperimentali successive a concentrazioni prestabilite (generalmente di 10^6 cellule CFU/mL) [38].

Per verificare la concentrazione raggiunta, al termine di ogni fase di crescita di 48 ore, sono state allestite le diluizioni seriali e si è proceduto alla conta delle colonie cresciute in Agar malto (Oxoid, Milano, Italia) dopo 48 ore di crescita a 30 °C.

Al termine della crescita dopo il 3° rinfresco, le cellule sono state recuperate per centrifugazione a 5000 Xg per 10 min e risospese in soluzione fisiologica (9 g/L NaCl e 1 g/L peptone batteriologico, Oxoid, Milano, Italia). Le colture così preparate sono state poi utilizzate per gli inoculi delle prove successive.

Tutta la procedura è stata svolta con attrezzature sterili e lavorando sempre in condizioni asettiche.

4.2 Microfermentazioni su succo d'uva per la valutazione del vigore fermentativo

Per la valutazione della bontà fermentativa dei lieviti oggetto di studio è stato utilizzato il criterio del vigore fermentativo, ossia la velocità di fermentazione. Tramite questa tecnica si valuta la quantità di CO_2, espressa in grammi, che viene prodotta dal metabolismo dei lieviti. Il monitoraggio della cinetica di fermentazione ci permette di valutare il tempo entro il quale la fermentazione stessa cessa e, valutando le curve ottenute, è possibile valutare il vigore fermentativo, la velocità di partenza della fermentazione, e tutto l'andamento fermentativo. Nella determinazione del vigore fermentativo si è impiegato del succo d'uva generico in quanto non essenziale che il mezzo garantisse anche la possibilità di valutazione di altre caratteristiche fermentative.

4.2.1 Preparazione del succo d'uva

Per garantire che la fermentazione avvenisse solo a carico dei lieviti inoculati, prima di procedere con qualsiasi operazione si è deciso di eseguire la pastorizzazione del mezzo, questa procedura è stata eseguita mediante l'uso dell'autoclave con il raggiungimento di una temperatura pari a 100°C mantenuta per 10 minuti. Il processo è stato ripetuto per due volte distanziate 24 ore l'una dall'altra.

Secondo la risoluzione OIV-OENO 370-2012 [38] il succo d'uva impiegato nella fermentazione deve contenere un quantitativo di zuccheri glucosio + fruttosio tra 200 e 300 g/L, dose che matematicamente consentirebbe una produzione di etanolo compresa tra 11,5 e 14,5% v/v. In accordo con quanto riportato, prima dell'inoculo in bottiglia si sono eseguite delle analisi sul succo d'uva utili a valutarne la composizione e l'adeguatezza ad un'eventuale fermentazione. Da tali controlli è emerso come i valori di zuccheri, e quindi di alcol potenziale, risultassero eccessivamente bassi, pari a 154,2 g/L.

Per poter valutare in modo efficace il vigore fermentativo e la curva di fermentazione, nonché l'attitudine del ceppo ad una fermentazione enologica, il

titolo in zuccheri è stato corretto a 200 g/L mediante aggiunta di saccarosio commerciale.

4.2.2 Inoculo in bottiglia

Per l'inoculo in bottiglia, si è proceduto, sempre lavorando in asettico, trasferendo 250 mL di mosto pastorizzato in bottiglie da 500 mL ed inoculando 10^6 CFU/mL di ognuno dei ceppi da testare. A seguito dell'inoculo in bottiglia la stessa è stata chiusa con una valvola di Müller (RESOLUTION OIV-OENO 370-2012) utile per permettere solamente alla CO_2 di lasciare il mezzo e non avere dati sfalsati in sede di monitoraggio.

4.2.3 Monitoraggio delle fermentazioni

Il monitoraggio delle fermentazioni su succo d'uva è avvenuto quotidianamente valutando la progressiva diminuzione di peso delle bottiglie in fermentazione, dovuta alla fuoriuscita della CO_2 prodotta dalla fermentazione alcolica dei lieviti. Mediante l'uso di una bilancia analitica le bottiglie sono state pesate ogni 24 ore a partire dal giorno in cui è avvenuto l'inoculo, definito t=0, fino al raggiungimento del peso costante, decretando quindi la cessazione della fermentazione. I dati sono stati raccolti mediante un foglio di lavoro elettronico e sono stati elaborati al fine di ottenere la cinetica di fermentazione di ogni ceppo considerato.

4.3 Suscettibilità nei confronti di SO_2 e Cu

4.3.1 Resistenza a Cu

La valutazione circa la resistenza al rame dei ceppi selezionati è avvenuta permettendo la crescita degli stessi in cinque terreni a differenti concentrazioni. I ceppi utilizzati per questa prova, in totale nove, sono stati selezionati all'interno dei ventuno ceppi di partenza sulla base del loro spiccato vigore fermentativo.

Le colture cellulari, preparate come descritto in paragrafo 4.1, sono state standardizzate ad OD_{600} pari a 0,1, corrispondenti a 10^6 CFU/mL. In cinque beute differenti sono stati introdotti 30 mL di malto brodo e sono state poi sottoposte a sterilizzazione. Al contempo sono state preparate le varie concentrazioni di solfato di rame sciogliendo il metallo, sottoforma di $CuSO_4 \cdot H_2O$ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), in acqua milli-Q e sterilizzando la soluzione con l'ausilio di una siringa sterile e filtro con porosità 0,2 µm (Millipore, Milano, Italia), questo per evitare che le elevate temperature raggiunte in fase di sterilizzazione potessero danneggiare il metallo portando alla formazione di precipitato. Il solfato di rame così preparato è stato addizionato ai terreni di malto brodo ottenendo le cinque concentrazioni desiderate: 0 g/L, 0,127 g/L, 0,206 g/L, 0,318 g/L e 0,413 g/L [72], corrispondenti ad una concentrazione di Cu di 0, 50, 82, 126 e 164 mg/L. Il pH dei brodi è stato in tutti i casi aggiustato a pH 3,5.

Per la valutazione vera e propria sono state utilizzate micropiastre sterili da 96 pozzetti ciascuna, riempiti seguendo uno schema definito in precedenza. All'interno dei pozzetti sono stati inseriti 190 µL di brodo alle differenti concentrazioni di solfato di rame e 10 µL di coltura, tenendo conto anche dei bianchi costituiti da 190 µL di brodo alle differenti concentrazioni di solfato di rame e 10 µL di soluzione fisiologica sterile. I pozzetti rimasti inutilizzati sono stati poi riempiti con acqua milliQ sterile, per permettere la termostatazione del sistema senza perdite di volume dei brodi per evaporazione, vista la durata dell'analisi. Per ogni micropiastra sono stati valutati contemporaneamente tre ceppi di lievito alle cinque concentrazioni di solfato di rame, la misura è stata eseguita in triplo per ogni ceppo. I ceppi sono stati inoculati ad una concentrazione di 10^2 CFU/mL in ognuno dei pozzetti e la loro capacità di crescita alle diverse concentrazioni di Cu è stata monitorata tramite lettore di micropiastre Tecan Sunrise (Männedorf, Svizzera). La lettura è stata effettuata a 25 °C ad una lunghezza d'onda di 620 nm per 24 ore, misura ogni 30 minuti, preceduta da una leggera agitazione della micropiastra per 10 secondi in modo da risospendere l'eventuale pellet formatosi.

Una volta terminata l'analisi i dati sono stati esportati in Excel dal software Magellan (Männedorf, Svizzera) ed elaborati calcolando le medie e relative deviazioni standard per ogni ceppo.

4.3.2 Resistenza a SO_2

La valutazione della resistenza alla SO_2 dei ceppi selezionati è avvenuta verificando la capacità di crescita degli stessi a differenti concentrazioni di solforosa. I ceppi utilizzati per questa prova, in totale nove, sono stati selezionati all'interno dei ventuno ceppi di partenza sulla base del loro spiccato vigore fermentativo, ossia i medesimi di cui è stata valutata la resistenza al rame.

Le colture cellulari, preparate come descritto in paragrafo 4.1, sono state standardizzate ad OD_{600} pari a 0,1, corrispondenti a 10^6 CFU/mL. La metodica adottata è stata analoga a quella precedentemente descritta con la variante che al terreno colturale è stato aggiunto metabisolfito di potassio in concentrazioni di 0 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L.

4.4 Microfermentazioni su mosto di uve Sauvignon blanc

Dopo aver selezionato inizialmente i lieviti sulla base del loro vigore fermentativo è stata eseguita una seconda scrematura incrociando i dati relativi alla loro resistenza al rame e alla solforosa. Da tale esame sono stati individuati sette ceppi che rispettavano i parametri imposti, il presente lavoro è proseguito valutando la capacità e qualità fermentativa su mosto d'uva per solo quattro dei suddetti ceppi (91,2; 80,8; 64,6; 109,9).

Sono state allestite quindi ulteriori fermentazioni, in questo caso su mosto di Sauvignon blanc, atte a valutare le caratteristiche tecnologiche e qualitative di tali ceppi e come queste potessero variare in funzione della temperatura di fermentazione. Ogni prova di fermentazione è stata allestita in triplo a due temperature distinte: 16 °C, mimando le condizioni di fermentazione di un mosto di uve bianche, e 20 °C, per vedere l'effetto di una temperatura più elevata sul

prodotto finito. L'andamento fermentativo è stato valutato con misurazione ogni 48 ore della progressiva produzione di etanolo. Al momento iniziale, finale e ad ⅓ della fermentazione sono stati invece valutati ulteriori parametri cui si rimanda ai paragrafi successivi.

4.4.1 Preparazione del mosto

Per le microfermentazioni su mosto è stato utilizzato mosto di Sauvignon Blanc, il quale non è stato sottoposto ad alcun trattamento termico allo scopo di evitare qualsiasi tipo di danneggiamento al suo profilo chimico-organolettico. Prima di procedere con l'inoculo sono state eseguite delle analisi atte a verificare l'adeguatezza del mezzo ad accogliere eventuali fermentazioni. Dalle stesse è emerso come il contenuto di glucosio + fruttosio, pari a 239,8 g/L, permettesse il raggiungimento di un titolo alcolometrico volumico totale e potenziale pari a 14,39 % vol. Partendo da questa considerazione è stato possibile calcolare il titolo alcolometrico che si sarebbe dovuto ottenere al raggiungimento di ⅓ della fermentazione. Per quanto concerne la nutrizione azotata la quantità di APA inizialmente presente nel mosto era eccessivamente bassa, pari a 18 mg/L. Sono stati dunque addizionati 132 mg/L di Fermaid E Blanc (Lallemand Inc. – Montréal, Canada), formulato completo di azoto organico, sali ammoniacali, steroli, acidi grassi insaturi, minerali e vitamine.

Le caratteristiche del mosto da fermentare sono mostrate in Tabella 2.

Tabella 2 Caratteristiche del mosto di Sauvignon blanc all'avvio della fermentazione

Glucosio + Fruttosio	239,8 g/L
Acidità Totale (acido tartarico)	2,58 g/L
Acidità Volatile (acido acetico)	0,07 g/L
Anidride Solforosa libera	8 mg/L
Anidride Solforosa totale	32 mg/L
Acido Malico	2,96 g/L
Acido Lattico	0,10 g/L
A.P.A.	150 mg/L
pH	3,72

Per le micro-fermentazioni su mosto sono state utilizzate bottiglie dal volume di 750 mL riempite, con l'aiuto di un matraccio tarato, con 600 mL di mosto. I lieviti inoculati sono stati preventivamente preparati, come riportato nel paragrafo 4.1. Una volta eseguito l'inoculo (10^6 CFU/mL) le bottiglie sono state chiuse mediante l'ausilio di cotone idrofilo da laboratorio e trasferite in termostato.

4.4.2 Monitoraggio delle fermentazioni

Il monitoraggio dell'andamento fermentativo è stato eseguito mediante valutazione delle crescenti concentrazioni di etanolo. A seguito di analisi eseguite il titolo alcolometrico volumico totale e potenziale risultava esse pari a 14,39 % vol. Sulla base di questo dato è stato possibile individuare il raggiungimento di ⅓ della fermentazione. Le analisi sull'etanolo sono state eseguite mediante Antoon Par con cadenza regolare di 48 ore.

4.4.3 Analisi chimiche

4.4.3.1 *Determinazione della solforosa*

La valutazione della solforosa è stata eseguita su mosto, ad ⅓ della fermentazione e alla fine della stessa. La misura è stata eseguita mediante kit enzimatico ENZYTEC LIQUID SO_2 TOTAL (RBiopharm – Darmstadt, Germania) che ha permesso di apprezzarne il contenuto totale. 2 mL di campione sono stati prelevati e inseriti in provette Eppendorf sterili, per illimpidirli è stata effettuata una centrifugazione di 1 minuto a 10000 rpm.

4.4.3.2 *Analisi mannoproteine*

Ad ⅓ ed alla fine della fermentazione sono state valutate le mannoproteine presenti nel mezzo, ossia rilasciate dalle cellule di lievito. Prima di procedere alla loro determinazione sono state raccolte tramite precipitazione con etanolo. Dal mosto-vino sono stati prelevati 2 ml di prodotto ed inseriti in tubi Falcon sterili, in cui successivamente sono stati addizionati 10 ml di etanolo al 96% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Dopo 24 ore le cellule sono state risospese per poi essere centrifugate per 5 minuti a 3500 RPM. Al termine della centrifugazione è stato eliminato l'etanolo. Il lavaggio si è ripetuto per un totale di tre volte. Prima di poter procedere con la quantificazione delle mannoproteine, avvenuta mediante HPLC, queste sono state conservate in Falcon aperti sotto cappa a flusso laminare affinché tutto l'etanolo residuo potesse evaporare.

La quantità di colloidi glucidici è stata determinata per precipitazione in etanolo, modificando il metodo di Usseglio-Tomasset e Castino (1975).

A 2 mL di vino centrifugato (3000 rpm per 10 min) sono stati aggiunti 5 volumi di etanolo al 96% (v/v) e posti a 0/+4 °C per 24 ore. Il *pellet* raccolto dopo precipitazione (dopo sosta a 0/+4 °C) è stato centrifugato (3000 rpm, 10 minuti) e lavato in etanolo 96 % v/v per due volte (dopo l'aggiunta di etanolo il pellet è stato risospeso mediante vortex e centrifugato subito dopo) e risospeso in acqua Milli Q. Il campione così ottenuto è stato filtrato su membrane in esteri misti di cellulosa (MCE) da 0.45 µm (Albet-Hahnemhle, Barcelona, Spagna) e

successivamente iniettato (20 µl) nel sistema cromatografico. Lo strumento utilizzato si costituisce di pompa Modello LC 250 Binary Pump (Perkin Elmer – Waltham, MA, USA), valvola di iniezione manuale tipo 7125 NS (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), detector con indice di rifrazione modello RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Giappone) e colonne Ultrahydrogel 250 (Waters, Milford, MA), 300 x 7,8 mm d.i., misura del poro 6 µm e PL aquagel-OH mixed-H (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), 300 x 7,5 mm d.i., misura del poro 8 µm.
L'eluente utilizzato è acqua Milli Q; la separazione è stata condotta in condizioni isocratiche ad un flusso di 0,7 mL/min.
La determinazione del peso molecolare è stata eseguita utilizzando il metodo dello standard esterno utilizzando un kit di polietilen-glicole a diverso peso molecolare (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e la quantificazione mediante una retta di taratura preparata a partire da concentrazioni note di mannano da *S. cerevisiae* (0-1500 mg/L).

4.4.3.3 *Analisi SPME-GC-MS aromi*

Alla fine della fermentazione alcolica è stata valutata la componente aromatica del vino utile a fornire un'idea sulle differenze, o analogie, del prodotto finito se fermentato ad una temperatura di 16°C piuttosto che di 20°C.
Per l'esame sono state utilizzate *vials* con volume di 20 mL chiuse mediante setto in silicone/politetrafluoroetilene (PTFE), contenenti 10 mL di campione e 3 g di NaCl (Honeywell, Charlotte, North Caroline, USA), a cui sono stati addizionati due standard interni: 50 µL di etileptanoato (0,1413 g/L in etanolo) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 100 µL di dodecanolo (0,092 g/L in etanolo) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).
L'analisi è stata svolta grazie all'uso del sistema cromatografico fornito da Shimadzu GCMSQP2020NX (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) e composto da autocampionatore (HTA modello HT2800T), gascromatografo (GC 2030 Nexis Shimadzu) per il quale la colonna utilizzata è stata una DB-Wax-ms di 30 m per 0,25 mm di diametro interno con spessore del film di 0,25 µm e

spettrometro di massa (GCMS-QP2020 NX Shimadzu) costituito da una sorgente a impatto elettronico e un analizzatore a quadrupolo. La frazione aromatica volatile è stata determinata con estrazione tramite SPME-GC-MS secondo adattamento all'uso di autocampionatore di metodica messa a punto da Tat et al., 2015; è stata usata una fibra trifasica di 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) con temperatura di campionamento di 40° C per un tempo complessivo di 15 minuti (più 15 minuti di equilibrazione termica del campione prima della microestrazione).

Le condizioni gas cromatografiche applicate erano le seguenti:

- isoterma di 5 minuti a 40° C;
- da 40° a 250° C a 4° C/min. e isoterma finale di 15 minuti;
- iniettore a 250° C ed elio in qualità di gas carrier ad un flusso di 0.9 ml/min;
- modalità di iniezione splitless per 3 min;
- temperatura della transfer line 240° C;
- sorgente a 200° C.

Lo spettrometro di massa ha operato in modalità SCAN (intervallo di scansione m/z 25-400). L'identificazione dei composti volatili è stata effettuata con l'ausilio della libreria in dotazione al programma di elaborazione dei dati (NIST 08), nonché dal confronto con quelli della bibliografia (http://webbook.nist.gov/chemistry/). La valutazione delle quantità relative (in equivalenti di std interno) si è basata sull'integrazione delle aree dei picchi cromatografici in corrente totale o singolo ione m/z nei casi di sovrapposizione cromatografica. Le aree dei picchi dei composti di interesse sono state rapportate a quelle dello standard interno. Il software usato per l'acquisizione e l'elaborazione di questi dati è stato GCMS Solution.
I dati cromatografici sono stati utilizzati per operare un'analisi PCA sui campioni tramite il programma Statistica 8 per Windows.

4.4.3.4 *Analisi HPLC acidi e zuccheri*

Sia ad ⅓ della fermentazione che alla fine della stessa sono state valutate le concentrazioni di acidi organici (citrico, tartarico, malico, lattico, succinico, acetico), zuccheri (glucosio, fruttosio) e glicerolo mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Il campione è stato preventivamente preparato inserendo 1ml di questo in una Falcon sterile contenendo 9ml di acido solforico 0,025 M e conservato a -20°C fino al momento delle analisi. Successivamente circa 2 mL di campione sono stati filtrati in Eppendorf da 2 ml con filtri siringa in esteri misti di cellulosa (MCE) da 0,45µm. Il volume di iniezione utilizzato è 20 µl. Lo strumento utilizzato si costituisce di pompa Perkin Elmer Birary LC Pump 250, valvola di iniezione Rheodyne 7125 NS, detector UV-Visibile Varian 2550 Variable λ, settato a 210nm per la rivelazione degli acidi organici, rivelatore ad indice di rifrazione Modello RID-10A (Shimadzu, Giappone), utilizzato per la rivelazione di glucosio, fruttosio e glicerolo, due interfacce CBM-102 (Shimadzu, Giappone), una per detector e colonna cromatografica modello Aminex HPX-87H, di dimensioni 300 x 7.8 mm (Biorad, Hercules, CA, USA).

La separazione cromatografica è stata effettuata in condizioni isocratiche, con colonna termostatata a 65 °C ed utilizzando acido solforico 0.025 M come eluente, con un flusso di 0.7 mL/min.

L'analisi quantitativa è stata effettuata confrontando l'area dei composti individuati e l'area ottenuta dall'iniezione di standard esterni a concentrazione nota (acidi tartarico e malico, Carlo Erba Reagents, Italia; acidi lattico, succinico, citrico, acetico, glicerolo, glucosio e fruttosio Sigma-Aldrich, Italia).

4.4.3.5 *Analisi HPLC cisteina e glutatione*

La determinazione di glutatione e cisteina è stata effettuata sia ad ⅓ della fermentazione che alla fine utilizzando i metodi proposti da Tirelli et al. (2010) e Fracassetti et al., (2011) che sono basati sulla derivatizzazione dei gruppi tiolici

con *p*-benzochinone (pBQ). Il campione è stato conservato in acido perclorico al 35% (v/v) quindi congelato fino al momento delle analisi. Per la derivatizzazione, sono stati utilizzati 2 mL di campione, a cui sono stati aggiunti 100 µL della soluzione di pBQ; dopo circa 1 minuto è stato aggiunto acido mercaptopropionico (1mL) per bloccare la reazione, come riportato nelle metodiche di riferimento. Al termine della reazione, le soluzioni sono state filtrate con filtro siringa in esteri di cellulosa da 0,45 µm e sottoposti all'analisi HPLC. Lo strumento utilizzato per l'analisi cromatografica era Shimadzu LC-200 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) dotato di detector UV/Vis settato a 303 nm. La separazione cromatografica è avvenuta tramite l'utilizzo di una colonna Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 x 150 mm d.i.; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), termostata a 25°C. Il volume di iniezione era di 20 µL e la concentrazione del solvente B (metanolo) è incrementata da 10 a 35% in 18 minuti con un flusso di 1.0 mL/min, come riportato da Tirelli et al 2010.

4.4.4 Analisi microbiologiche

Per la valutazione dei microorganismi presenti all'interno del mosto-vino sono state eseguite una serie di analisi microbiologiche in tre tempi: prima dell'inoculo, ad un terzo della fermentazione e alla fine della stessa. Per tali analisi sono stati utilizzati terreni di coltura differenti, sia differenziali che selettivi atti a discriminare le specie microbiche e favorire la crescita di solo alcune di esse su uno specifico terreno. Più precisamente i terreni impiegati sono stati Agar Malto (AM, Oxoid, Milano, Italia) addizionato di tetraciclina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), WLN (Oxoid, Milano, Italia), WLD (Oxoid, Milano, Italia), MRS (Oxoid, Milano, Italia) addizionato dell'1% di Delvocid (DSM Food Specialist B.V., Delft, Netherlands) e MRS addizionato dell'1% di Delvocid (DSM Food Specialist B.V., Delft, Netherlands) e del 20% di succo di mela biologico limpido (Zuegg S.p.a., Verona, Italia). L'utilizzo del terreno AM è atto alla valutazione della crescita di muffe e lieviti e mediante questo è anche possibile quantificarne le colonie, in questo caso è stato addizionato di tetraciclina, un antibiotico ad ampio spettro di azione. Le

tetracicline sono una classe di antibiotici scoperti negli anni 40 del ‘900 con azione nei confronti di batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, in cui inibisce l’attività di sintesi proteica [73]. Ne consegue che in questo specifico caso siano state quindi utilizzate per la valutazione in piastra esclusiva dei lieviti. Sono state eseguite un totale di sei diluizioni decimali, affinché si potesse ottenere la piastra con una concentrazione di colonie variabile da 30 a 300 (piastra ideale per la conta). Lo stesso principio è stato utilizzato per le piastre di WLD (Brodo Wallerstein Differenziale), terreno differenziale per la conta di lieviti divisi per genere in funzione della morfologia di crescita della colonia ad esclusione di *S. cerevisiae* che viene inibito dalla presenza di actidione e WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar), sempre differenziale come il precedente, ma in questo caso cresce anche ed è identificabile, *S. cerevisiae*. In entrambi questi terreni possono crescere e sono morfologicamente distinguibili anche i batteri acetici.
Il terreno MRS addizionato di Delvocid (natamicina) (MRS) è utile per l’enumerazione dei batteri lattici, mentre il terreno MRS addizionato di Delvocid e succo di mela (MRSm) è specifico per la crescita dei batteri *Oenococcus oeni*. L’actidione è un antibiotico, meglio conosciuto come cicloesimide, con effetto sulla sintesi proteica ma, in questo caso, dei lieviti [74]. Entrambi i terreni MRS sono stati preparati secondo il metodo per inclusione Per i terreni AM, WLD, WLN e MRS il tempo di incubazione è stato di 48 ore a 30 °C, per il terreno MRSm di 120 ore a 30 °C.

5 Risultati e discussioni

5.1 Evoluzione fermentativa

I ceppi di lievito selezionati sono stati fermentati su succo d'uva con lo scopo di valutarne esclusivamente il loro vigore fermentativo. Valutandoli per possibili fermentazioni pilotate è importante che avviino il processo fermentativo in modo rapido, riducendo al minimo la fase di latenza, periodo più a rischio per l'instaurarsi di competizioni fra lieviti. Data questa considerazione è stato fissato un limite temporale di 96 ore per valutare la CO_2 sviluppata, che è funzione del consumo di zucchero e quindi più è alta, maggiore sarà il vigore fermentativo. Considerando che in queste prove i ceppi si sono trovati a fermentare in un mezzo privo di altri microorganismi la loro incapacità di metabolizzare fin da subito gli zuccheri potrebbe rappresentare un problema in eventuali e future fermentazioni, in cui con difficoltà riuscirebbero a diffondersi. A ragion veduta è stata eseguita una cernita dei ceppi e considerati come buoni fermentatori i seguenti: 117,5; 64,6; 91,2; 109,9; 86,4; 109,6; 44,5; 117,4; 80,8.

Le fermentazioni hanno avuto una durata media di 20 ± 3 giorni.

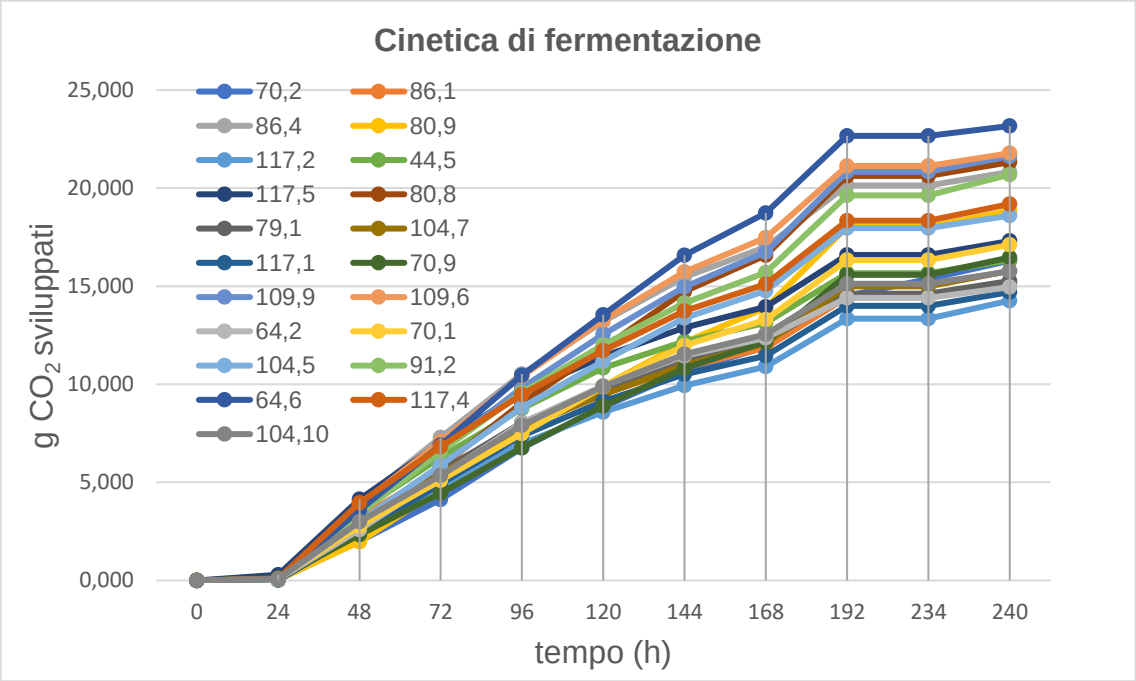


Figura 12 Cinetica di fermentazione evidenziata dallo sviluppo di CO_2

Analogamente a quanto mostrato da Albertin et al. (2011) i cui ceppi hanno mostrato una produzione di CO_2 pari a 1,4 g/l/ora, anche per i ceppi da noi considerati si è registrato un calo drastico nel peso, dato ovviamente da una produzione massiva di CO_2. Tale momento è coinciso con il raggiungimento delle prime 24 ore di fermentazione e il peso, prendendo a titolo di esempio il ceppo 64,6, che ha sviluppato 3,5 g di CO_2. Successivamente per entrambi gli studi è proseguito il calo del peso in maniera rapida fino alla 192esima ora (8 gg) circa, da questo momento in poi la curva ha subito un rallentamento. Ciò è attribuibile alle diverse attitudini dei ceppi di resistere alla concentrazione di EtOH prodotta. Ciò ha portato alcuni ceppi a terminare la fermentazione lasciando un residuo zuccherino.

5.2 Resistenza a Cu

La resistenza al rame dei ceppi selezionati è stata valutata mediante la loro cinetica di crescita, funzione della concentrazione di ossido di rame presente nel brodo.

Alla prima concentrazione di rame, ossia 0 g/l (Figura 13), tutti i ceppi sono riusciti a svilupparsi con una fase di latenza (fase lag) molto breve, di circa 25 min. Alla concentrazione di 50 mg/L di rame (Figura 14) i ceppi 109,6 e 84,4 sono stati drasticamente inibiti, trattandosi di ceppi indigeni isolati in vigneti a conduzione biologica si presupponeva l'isolamento di ceppi resistenti, la cui selezione naturale in campo fosse stata indotta dalla prolungata esposizione. Peculiare è quindi l'incapacità dei due ceppi sopracitati a svilupparsi anche alla più bassa concentrazione di rame, ma ciò dimostra che l'ecologia microbica in campo è dipendente dall'intero ecosistema ambientale e, insieme a ceppi stanziali, possono essere presenti ceppi alloctoni portati in luogo da veicoli di varia origine. Alla concentrazione di 82 mg/L (0,206 g/l $CuSO_4$) (Figura 15) i ceppi 64,6, 80,8 e 44,5 hanno subito un rallentamento dimostrato dalla fase lag sensibilmente più

lunga rispetto a quella degli altri ceppi valutati. Alla concentrazione di 126 mg/L di rame (0,318 g/l $CuSO_4$) (Figura 16), con una fase lag media della durata di 75 min, i ceppi 117,5, 109,9, 117,4 e 91,2 sono riusciti a svilupparsi dimostrando poi una fase esponenziale molto rapida. Alla concentrazione più elevata di rame (164 mg/L e 0,413 g/L $CuSO_4$) nessuno dei ceppi valutati ha invece avuto la capacità di crescere (Figura 17).

Le concentrazioni di rame alle quali sono stati valutate i ceppi sono analoghe a quelle riportate da Grangeteau et. al. (2017). In esso viene riportato come il 65% dei ceppi di *Saccharomyces* valutati riescano a crescere fino a 0,206 g/l di rame presente nel mezzo, mentre il restante 35% riesca a svilupparsi fino ad una concentrazione di 0,318 g/l di ossido di rame (Figura 16). Questo è coerente con i dati ottenuti in quanto, dal presente studio, emerge come il 66% dei ceppi valutati sia stato in grado di svilupparsi ad una concentrazione di ossido di rame pari a 0,206 g/l (Figura 15) mentre ad una concentrazione di ossido di rame pari a 0,318 g/l (Figura 16) si sia sviluppato il 44% dei ceppi valutati. Sia nello studio sopracitato che nel presente lo 0% dei ceppi esaminati è stato in grado di svilupparsi alla concentrazione più elevata di ossido di rame, 0,413 g/l (Figura 17). Dönmez e Aksu (1999) evidenziano che i ceppi da loro studiati sono stati in grado di sviluppare fino a 300 mg/l di $CuSO_4$ presente nel brodo di coltura, concentrazione più elevata valutata, con una fase di lag di 48 ore. Lo sviluppo a 0 mg/l e 100 mg/l ha richiesto una fase di lag di 8 ore, valori largamente maggiori rispetto alla durata della fase di lag delle cellule analizzate in questo studio pari a 25 min circa per la prima concentrazione di rame (0 mg/l) (Figura 13), 33 min circa per la seconda concentrazione (50 mg/l) (Figura 14) e 75 minuti per la quarta concentrazione (126 mg/l) (Figura 16).

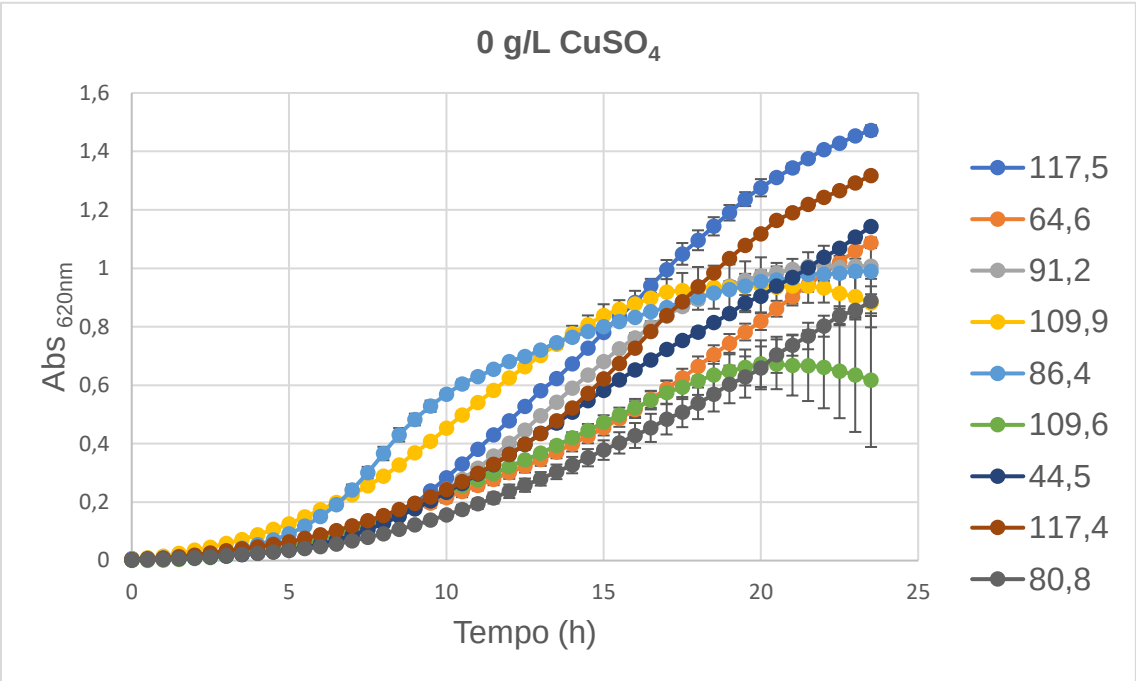


Figura 13 Resistenza dei ceppi a 0 g/L di ossido di rame

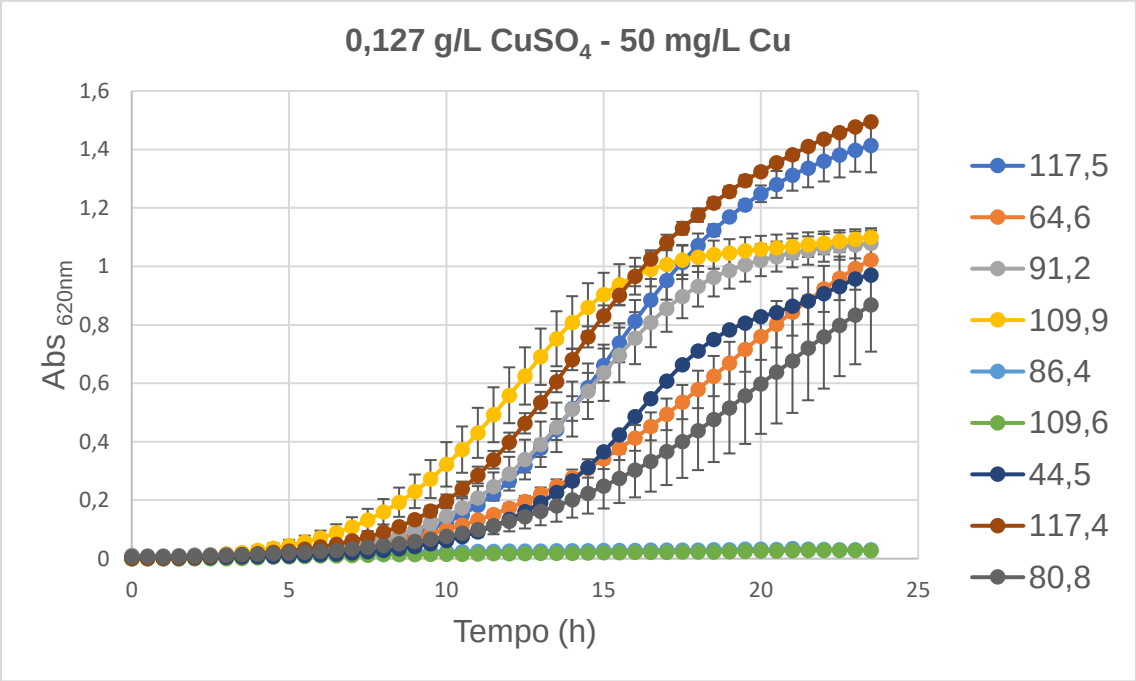


Figura 14 Resistenza dei ceppi a 0,127 g/L di ossido di rame

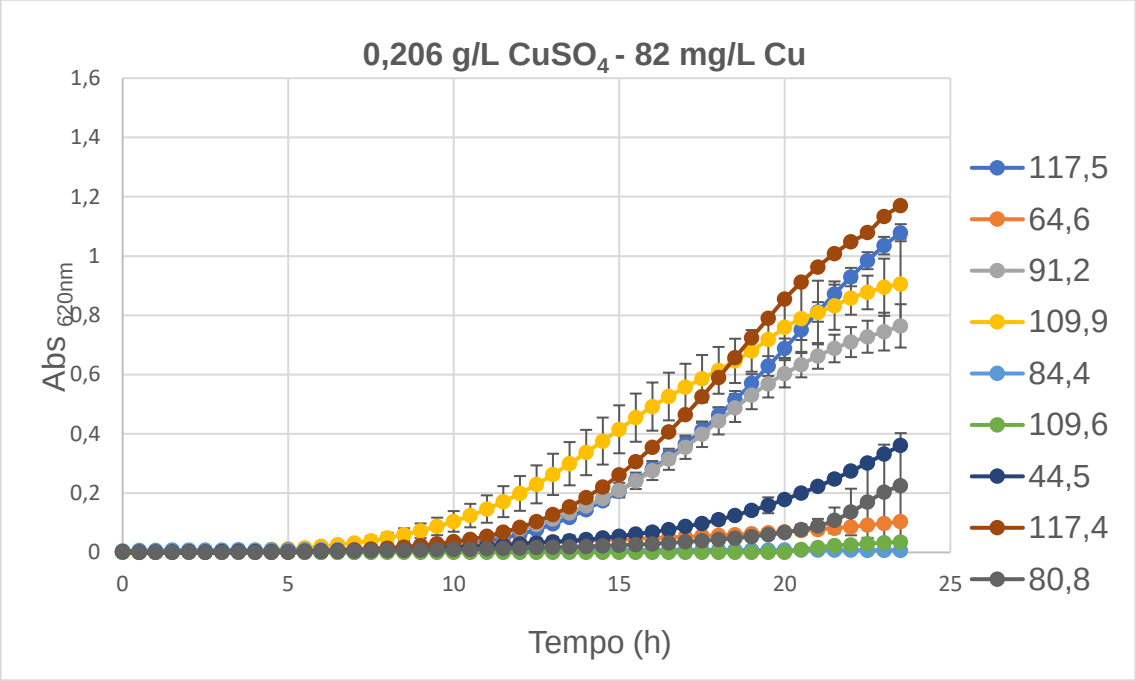


Figura 15 Resistenza dei ceppi a 0,206 g/L di ossido di rame

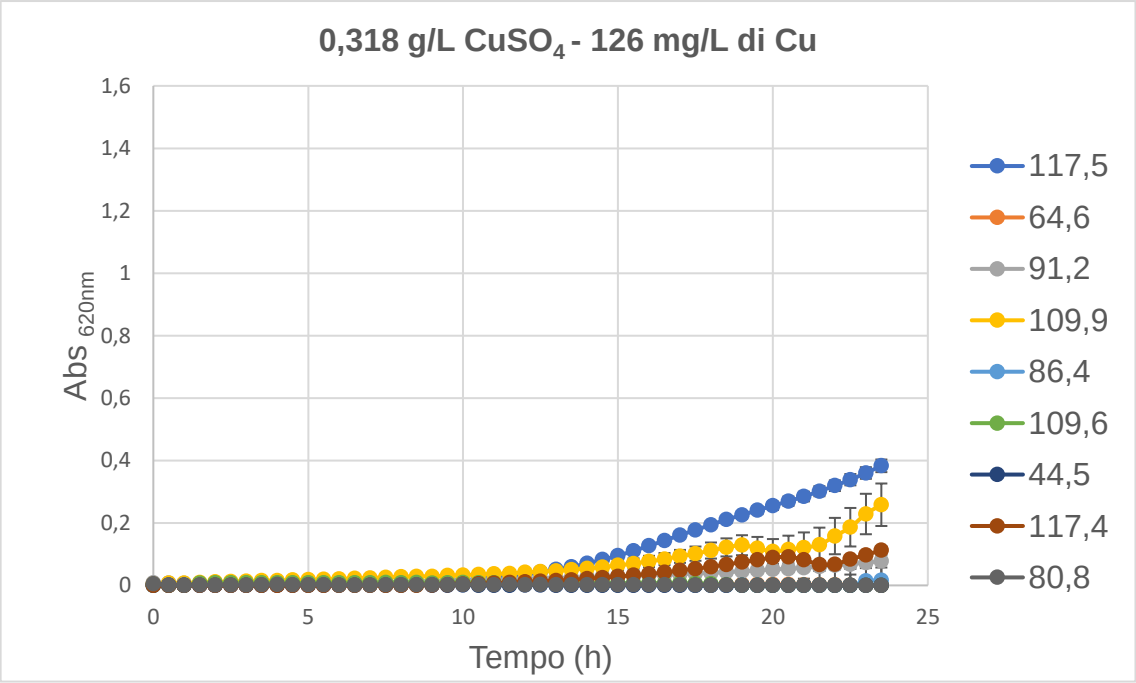


Figura 16 Resistenza dei ceppi a 0,318 g/L di ossido di rame

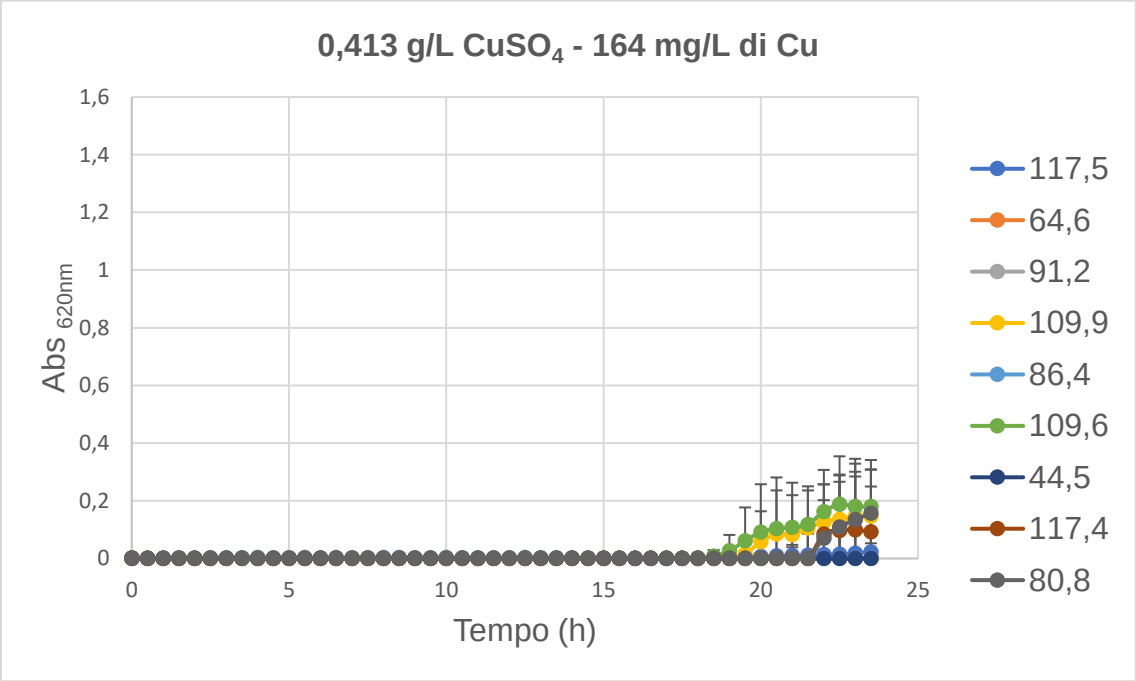


Figura 17 Resistenza dei ceppi a 0,413 g/L di ossido di rame

5.3 Resistenza a SO_2

Dai dati ottenuti è stato possibile ricostruire la cinetica di crescita dei ceppi considerati. Ogni ceppo valutato ha dimostrato una buona resistenza a SO_2, considerando anche le concentrazioni più elevate (Figure 18, 19 e 20). Stando alla curva di crescita di alcuni, soprattutto alle concentrazioni pari a 0 mg/L (Figura 18), si può presuppore una produzione intrinseca di composti solforati. Dallo studio di Grangeteau et al. (2017) è possibile notare come i ceppi testati siano stati in grado di svilupparsi, per il 30 % della totalità, fino a 8 g/l di SO_2 presente nel mezzo, mentre il restante 70 % sia in grado di svilupparsi fino ad una concentrazione di SO_2 pari a 16 g/l. I dati emergenti dallo studio da noi condotto, in cui la concentrazione massima di SO_2 a cui sono stati testati i ceppi equivale a 20 g/l (Figura 20), hanno mostrato come fino a tale concentrazione il 100% sia stato in grado di proliferare con una certa vigoria, fatta eccezione per il ceppo 109,9 che ha invece mostrato una minore resistenza. A differenza degli altri ceppi testati, che intorno ad un tempo variabile tra le 5 e le 10 ore, hanno

intrapreso la loro fase di crescita esponenziale per il campione 109,9 le tempistiche si sono allungate arrivando a 14 ore circa.

Questi dati non sorprendono in quanto è dichiarata la capacità dei lieviti *Saccharomyces* ad avere una minor sensibilità nei confronti dell'SO_2 e, proprio a seguito di questo, tale molecola viene impiegata per l'inibizione dei ceppi apiculati [6]. Di seguito le curve di crescita alle tre differenti concentrazioni di metabisolfito di potassio.

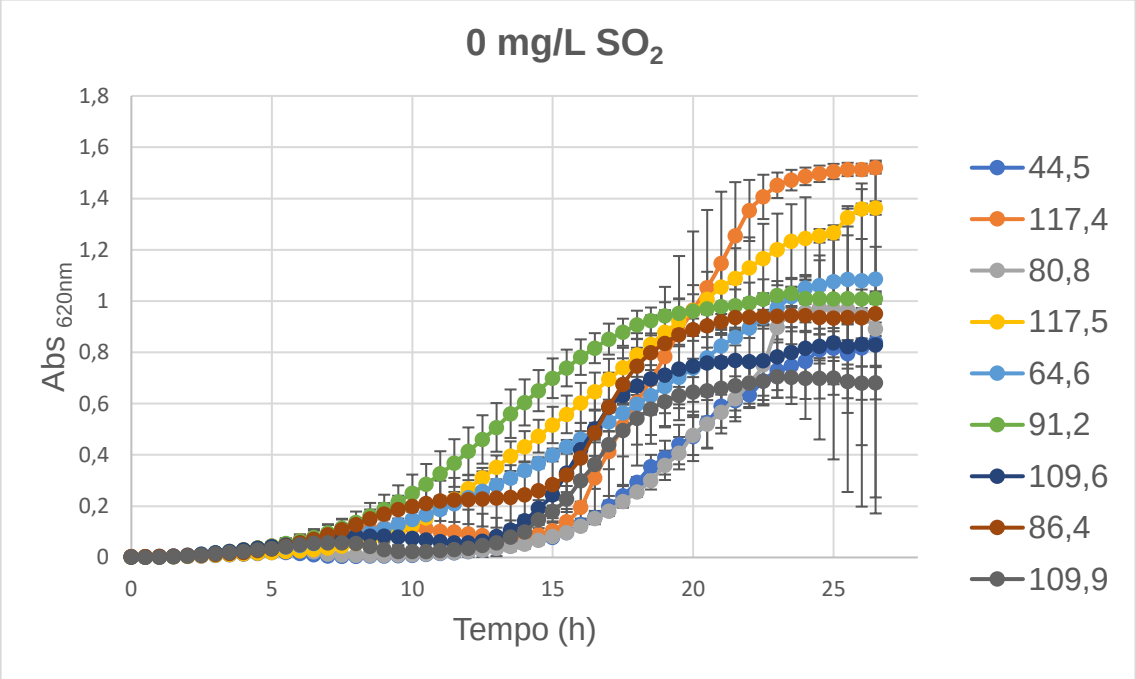


Figura 18 Resistenza dei ceppi a 0 mg/L di anidride solforosa

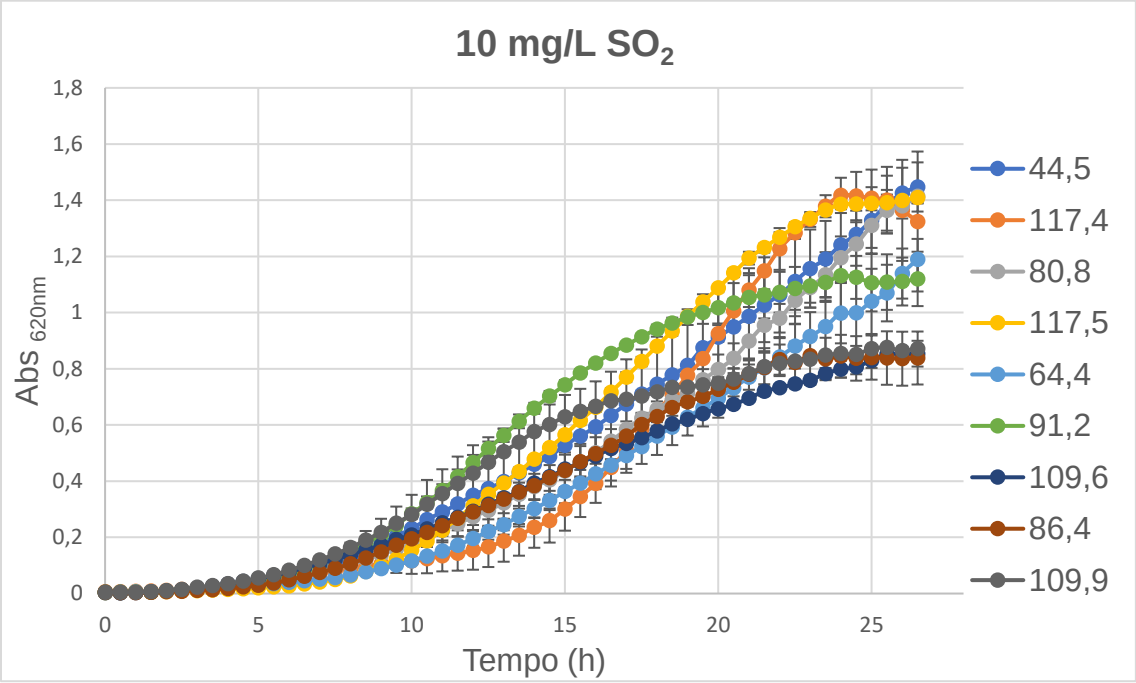


Figura 19 Resistenza dei ceppi a 10 mg/L di anidride solforosa

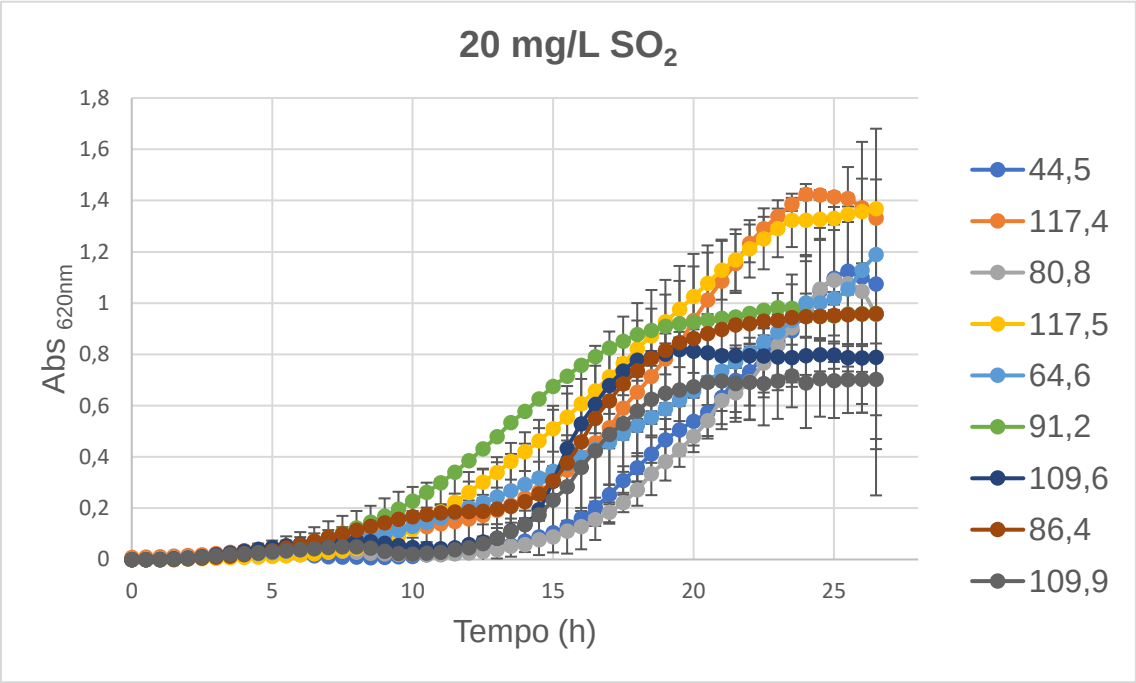


Figura 20 Resistenza dei ceppi a 20 mg/L di anidride solforosa

5.4 Fermentazioni su mosto di Sauvignon

Dopo aver eseguito una scrematura dei ceppi incrociando i dati risultanti dal vigore fermentativo, dalla resistenza al rame e dalla resistenza alla solforosa si è proseguito con le fermentazioni su mosto di uve Sauvignon. Questa fase della sperimentazione è risultata utile alla valutazione, oltre che dell'attività fermentativa in mosto reale, anche della componente aromatica imputabile all'attività fermentativa del lievito. L'andamento fermentativo (Figure 21-22) è stato monitorato mediante prelievo di mosto-vino ogni 48 ore, sul quale è stata poi misurata la quantità di etanolo presente. Nell'ultima fase della fermentazione i tempi di campionamento si sono allungati, perché l'evoluzione fermentativa procedeva molto lentamente e fare prelievo estremamente ravvicinati avrebbe comportato un consumo eccessivo di mosto-vino procurando così uno spazio di testa troppo elevato e un residuo di prodotto insufficiente per le analisi di fine fermentazione.

I dati raccolti sono stati impiegati per la riproduzione della cinetica di crescita all'interno del mezzo.

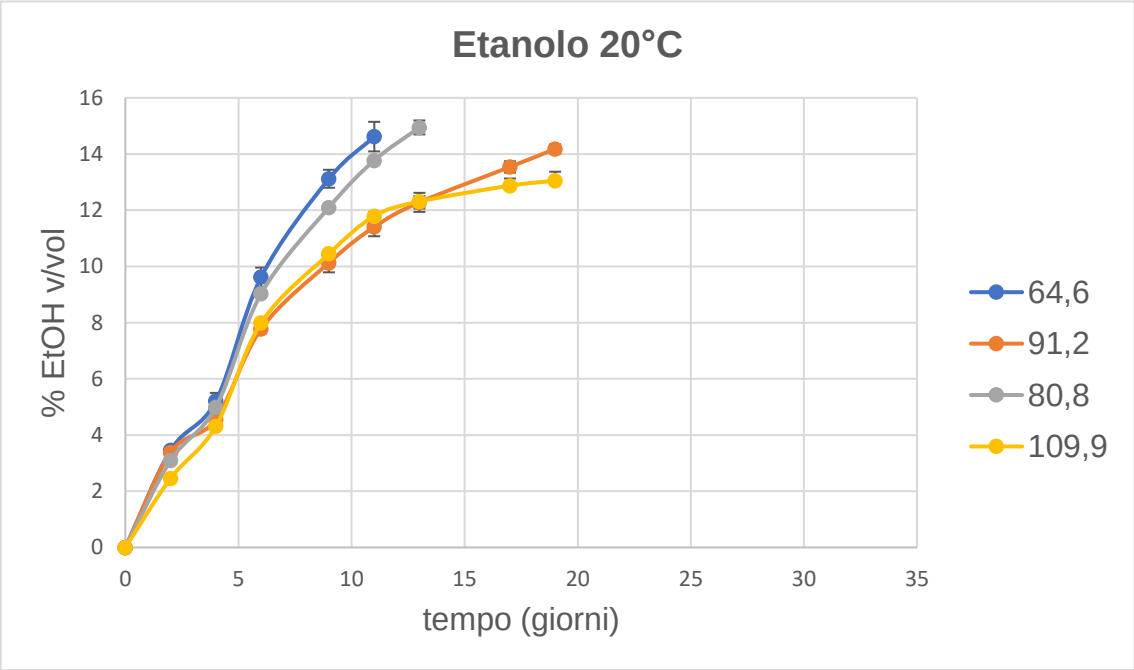


Figura 21 Andamento fermentativo dei ceppi fatti fermentare su mosto di uve Sauvignon ad una temperatura stabile di 20°C valutato mediante valutazione della progressiva produzione di etanolo

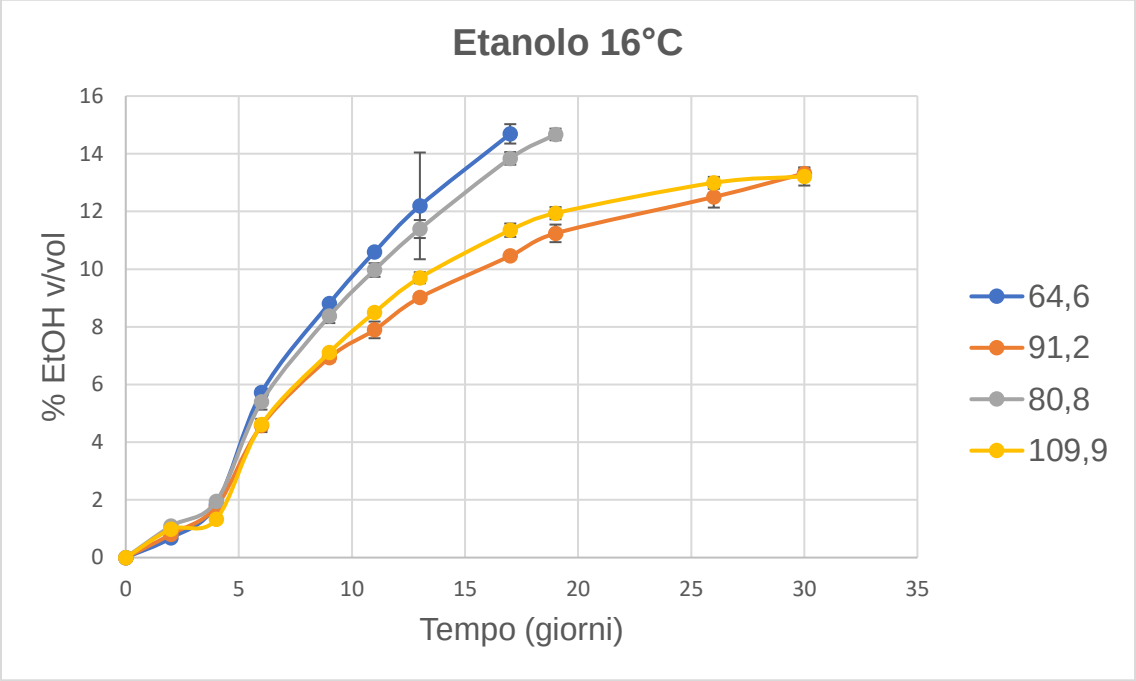


Figura 22 Andamento fermentativo dei ceppi fatti fermentare su mosto di uve Sauvignon ad una temperatura stabile di 16°C valutato mediante valutazione della progressiva produzione di etanolo

Il ceppo 64,6 ha dimostrato una grande capacità fermentativa, ad entrambe le temperature valutate, sia a seguito della sua capacità di riprodursi velocemente nel mezzo (fase lag breve), sia a seguito del suo spiccato potere alcoligeno. Alla temperatura di 20 °C è stato raggiunto in 11 gg un titolo alcolometrico pari a 14,62 %, mentre alla temperatura di 16 °C, un titolo alcolometrico comparabile (14,69 %) è stato raggiunto in 17 gg. Questo indica la capacità del ceppo 64,6 di fermentare la totalità degli zuccheri presenti nel mezzo, con una fase di latenza molto breve e tale da non permettere lo sviluppo di specie secondarie. In maniera generale la cinetica condotta a 16 °C richiede una fase lag più prolungata, data dal rallentamento metabolico alla minor temperatura e di conseguenza un maggior tempo di adattamento al mezzo per l'avvio della fermentazione, a 20 °C questo problema viene meno, in quanto ci troviamo vicini alle temperature di sviluppo ottimali medie per la specie. Il ceppo 80,8 ha raggiunto una produzione di etanolo equiparabile (14,94% v/vol a 20°C e 14,67 % v/vol a 16 °C). Di leggera differenza sono state le tempistiche entro le quali è avvenuto il consumo totale

degli zuccheri, maggiore rispetto al ceppo 64,6 di 48 ore per entrambe le temperature considerate. I ceppi 91,2 e 109,9 hanno invece dimostrato un vigore fermentativo inferiore, affermazione giustificata sia dall'allungamento delle tempistiche di fermentazione che dal livello di etanolo raggiunto, in particolar modo per la fermentazione a 16 °C. Riprendendo quanto scritto sopra, la fermentazione condotta ad una temperatura maggiore è fisiologicamente preferita in quanto le cellule di lievito hanno la capacità di adeguarsi più rapidamente al mezzo in cui si trovano e di partire prima quindi in riproduzione e fermentazione. Altrettanto vero è che esiste una correlazione inversamente proporzionale tra temperatura e sviluppo, legittimando così lo sviluppo più stentato a 16 °C e la fermentazione più debole degli zuccheri (registrata nell'esiguo tenore alcolico raggiunto). Le fermentazioni di tali ceppi, ad entrambe le temperature, si sono concluse in 19 gg a 20 °C e 30 gg a 16 °C, raggiungendo però tenori di etanolo comunque elevati (14,18% v/vol per il 91,2 e 13,05% v/vol per il 109,9 a 20 °C e 13,32% v/vol per il 91,2 e 13,22% v/vol per il 109,9 a 16 °C). Viceversa, Torija et al. (2003) nel loro studio evidenziano che in fermentazioni condotte a temperature differenti (in questo caso 15°C e 20°C) non vi è stata una significativa diminuzione nel contenuto di etanolo finale. Questi dati forniscono un'informazione molto chiara, tutti i ceppi di *Saccharomyces* su cui questo lavoro si è basato sono ubiquitari e quindi per questo in grado di fermentare in mezzi sensibilmente differenti, in altre parole sono in grado di creare competizione ma, soprattutto, di fermentare in qualsiasi condizione la totalità degli zuccheri presenti.

5.5 Analisi chimiche

Le condizioni del mosto prima dell'inoculo dei lieviti sono riportate in tabella 2.

Tabella 2 Rapporto di analisi mosto

Glucosio + Fruttosio	239,8 g/L
Acidità Totale (acido tartarico)	2,58 g/L
Acidità Volatile (acido acetico)	0,07 g/L
Anidride Solforosa libera	8 mg/L
Anidride Solforosa totale	32 mg/L
Acido Malico	2,96 g/L
Acido Lattico	0,10 g/L
A.P.A.	150 mg/L
pH	3,72

Sia ad ⅓ della fermentazione che alla fine della stessa ci si è serviti di kit enzimatici utili per monitorare il cambiamento nel contenuto di solforosa totale (Figura 23), acetaldeide (Figura 24), acido D-lattico (Figura 25), acido L-lattico (Figura 26) e acido L-malico (Figura 27).

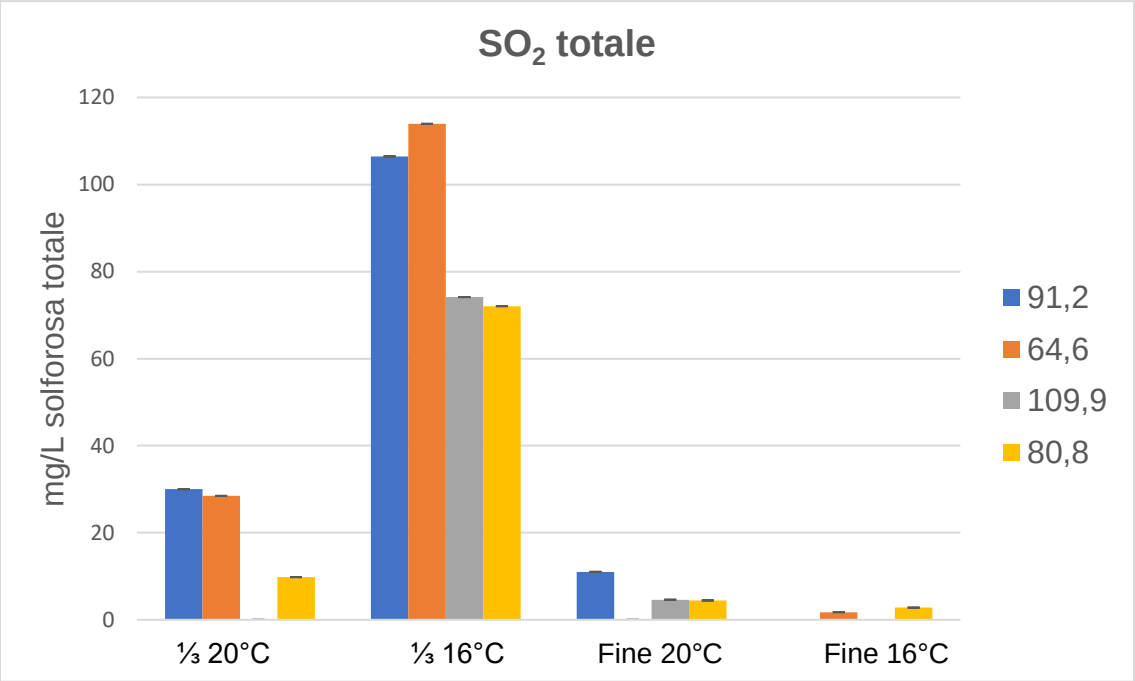


Figura 23 Risultati solforosa totale kit enzimatico ENZYTEC LIQUID SO2 TOTAL (RBiopharm – Darmstadt, Germania). Limite di rilevabilità 10 mg/L

Il contenuto di acetaldeide, Figura 24, si attesta per lo più a valori molto bassi, fatta eccezione per la fermentazione condotta a 16 °C dei ceppi 64,6 e 109,9, nella quale il contenuto di etanale sale fino a 0,186 mg/L e 0,23 mg/L rispettivamente ad 1/3 di fermentazione, per poi scendere nuovamente sotto il limite di rilevabilità a fine fermentazione (< 0,18 mg/L). Come è già chiaro l'acetaldeide è una delle molecole coinvolte nel processo di fermentazione, viene prodotta a partire da piruvato ed è la molecola precursore dell'etanolo, che produce solo a seguito di una riduzione. Se dall'acetaldeide segue, invece, una reazione di ossidazione, questa produrrà il suo acido carbossilico corrispondente, ossia acido acetico [6]. La soglia sensoriale per l'acetaldeide varia da 100 a 125 mg/L. Immediatamente dopo la fermentazione, i vini da tavola hanno generalmente livelli di acetaldeide inferiori a 75 mg/L. Tuttavia, oltre 125 mg/L di acetaldeide possono conferire odori descritti come "mele ammaccate troppo mature", carattere di "fermento bloccato" o caratteri di "sherry" e "simile alla noce". Il lievito può ossidare l'etanolo in acetaldeide in condizioni ossidative. Pertanto, i serbatoi pieni possono portare a un'infezione superficiale del lievito in cui viene prodotta acetaldeide (si noti che in queste condizioni possono essere prodotti anche alti livelli di acido acetico e acetato di etile). L'etanolo rappresenta la fonte primaria di carbonio nella crescita aerobica del film-lievito.

I livelli di acetaldeide aumentano anche con l'invecchiamento dei vini a causa dell'ossidazione chimica dell'etanolo. Poiché l'acetaldeide è anche un intermedio nella formazione batterica dell'acido acetico e in condizioni di basso contenuto di ossigeno e/o livelli di alcol superiori al 10% v/v, l'acetaldeide tende ad accumularsi invece di essere ossidata ad acido acetico. Oltre alla formazione chimica e microbiologica, le pratiche di vinificazione possono influenzare il livello di acetaldeide presente nel vino; l'aggiunta di SO_2 durante la fermentazione può aumentare la concentrazione di acetaldeide, così come l'aumento del pH e della temperatura di fermentazione. Infatti, è nota la sua affinità con il diossido di zolfo, tant'è che maggiore è il suo contenuto nel mezzo, maggiore sarà la liberazione di acetaldeide nel mezzo da parte del lievito, una delle sue modalità di disintossicazione. Il contenuto così limitato di acetaldeide è riconducibile quindi

ad un processo fermentativo che ha ben attivo il metabolismo, senza deviazioni, dovute a stress o a solforosa nel mezzo, soprattutto sulla base del fatto che durante tutto il corso della sperimentazione non sono mai state eseguite aggiunte esogene di SO_2. Interessante è quindi capire per quale ragione per i due ceppi sopra citati il contenuto di acetaldeide sia invece aumentato in maniera improvvisa, per poi diminuire nuovamente al di sotto della soglia di rilevabilità. La risposta si può trovare mettendo a confronto questi dati con quelli riportati in Figura 23. Nella fermentazione condotta a 16 °C, per tutti i quattro ceppi testati, il contenuto di solforosa aumenta in maniera singolare facendo pensare ad una produzione di solfiti con un picco di 113,94 mg/L prodotto dal ceppo 64,6. Durante la fermentazione alcolica il lievito, in veste di microorganismo fermentatore, mette a punto delle vie biosintetiche utili alla riduzione dei solfati e dalle quali può avvenire la liberazione di anidride solforosa [6]. In relazione a ciò, i ceppi di lievito vengono comunemente distinti in basso produttori di SO_2 e alto produttori di SO_2 [75], nel caso però in cui il contenuto di solforosa risulti superiore a 300 mg/l allora la sua produzione viene affibbiata ad un'alterazione della solfito reduttasi [76]. Questa è un'informazione di rilevanza sostanziale, la produzione di solforosa è uno dei parametri tecnologici su cui si può basare la selezione di un lievito, ma ancora fermentare con ceppi buoni produttori di SO_2 può essere utile nel caso di fermentazioni spontanee o fermentazioni in regime biologico.

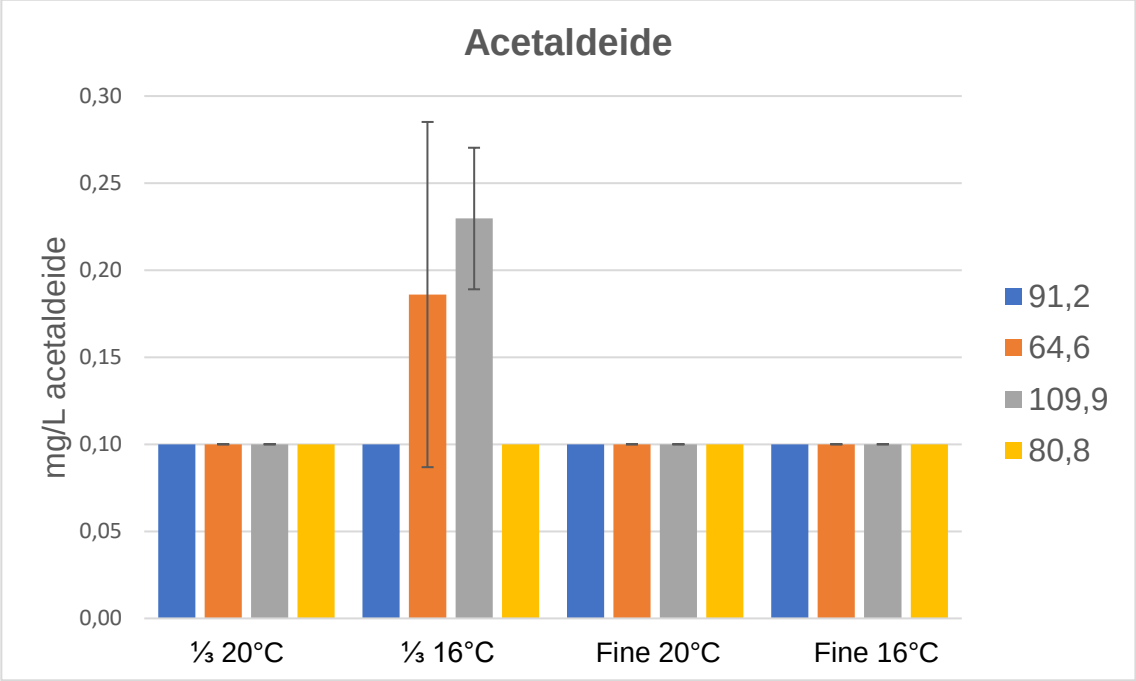


Figura 24 Risultati acetaldeide kit enzimatico K-ACHYD 01/20 (Megazyme – Bray, Irlanda). Limite di rilevabilità 0,18 mg/L

In Figure 25 e 26 sono riportati, rispettivamente, i contenuti di acido D-Lattico ed acido L-lattico rinvenuti nel mosto/vino a differenti tempi di prelievo. Rispetto al contenuto di acido D-lattico del mosto i valori dell'enantiometro destrogiro ad ⅓ e a fine fermentazione sono diminuiti risultando, soprattutto alla fine della fermentazione condotta a 16 °C, al di sotto della soglia minima di rilevabilità del kit enzimatico. È possibile però notare anche come, in concomitanza con temperature più elevate (20 °C) il suo contenuto sia maggiore rispetto alle temperature più basse (16 °C), questo in accordo con la bibliografia [77]. Un contenuto importante di acido D-lattico è sintomo di spunto lattico, ossia condizione per la quale ceppi particolari di batteri anaerobi, quale *Bacterium mannitopoeum,* è in grado di degradare il fruttosio producendo acido acetico e acido D-lattico (in questa condizione la forma levogira è presente solo in pochi mg/L). Nonostante questa supposizione per affermare la presenza di spunto lattico i quantitativi di acido D-lattico dovrebbero attestarsi attorno ai 200-300 mg/L, non è questo il caso [6]. Per quanto riguarda l'acido L-lattico, prodotto dalla

fermentazione malolattica, il suo contenuto si attesta al di sotto della soglia di rilevabilità nel prelievo intermedio (⅓) ad entrambe le temperature, contrariamente a quando ci si sarebbe aspettati dalle analisi microbiologiche che mettono invece in evidenza una presenza media di 3 Log UFC/mL di batteri totali. Alla fine della fermentazione alcolica il contenuto dell'enantiomero levogiro aumenta fino a raggiungere il picco massimo di 0,25 g/L nella fermentazione condotta dal ceppo 109,9 a 20 °C. Nonostante questo balzo la concentrazione è comunque piuttosto bassa per pensare ad una possibile fermentazione degli zuccheri da parte dei batteri, in accordo anche con le analisi microbiologiche che hanno mostrato alla fine del processo una presenza sia di batteri totali che di batteri appartenenti al genere *Oenococcus oeni* < 1 Log UFC/mL.

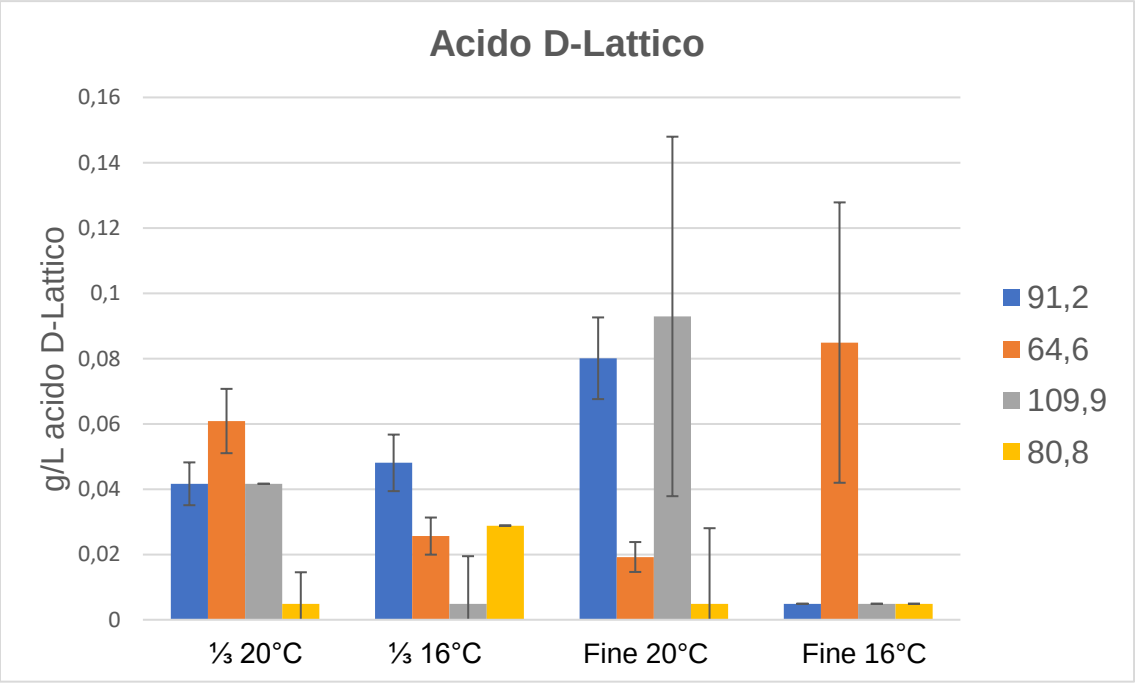


Figura 25 Risultati acido D-Lattico kit enzimatico K-DLATE 08/18 (Megazyme – Bray, Irlanda). Limite di rilevabilità 0,21 mg/L

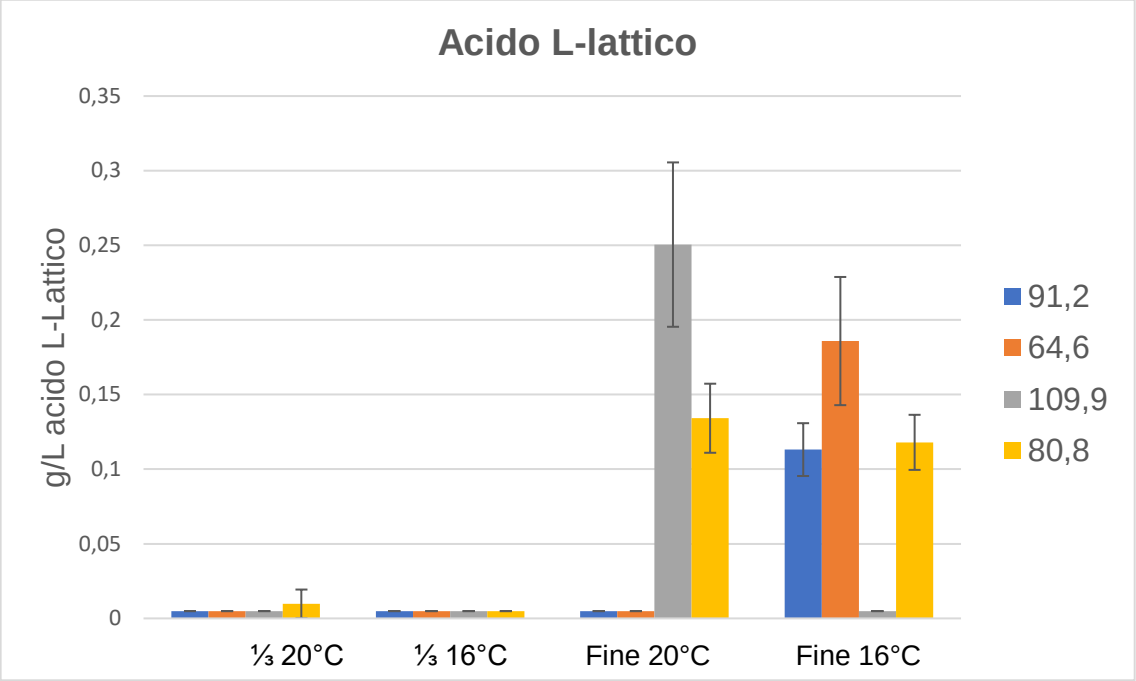


Figura 26 Risultati acido L-lattico kit enzimatico K-DLATE 08/18 (Megazyme – Bray, Irlanda). Limite di rilevabilità 0,21 mg/L

Dato che esiste un rapporto molto stretto tra contenuto di acido lattico e acido malico, è opportuno valutare il contenuto anche di quest'ultimo, Figura 27. Dalle analisi su mosto la sua presenza è pari a 2,96 g/L, valore, per alcune tesi, destinato all'aumento nel corso della fermentazione. Nel prelievo ad ⅓ di fermentazione il contenuto medio di acido L-malico si attesta a 2,83 g/L ma con un leggero incremento nella fermentazione condotta a 20 °C, assecondando quanto riportato nello studio di Liu et al. (2018). Il ceppo 80,8, ad entrambe le temperature, mostra un progressivo consumo di acido L-malico e, in accordo con il tenore alcolico raggiunto (14,81 ± 0,20), si potrebbe presuppore una capacità di esecuzione della fermentazione malo-alcolica, seppur condizione rara nei ceppi *Saccharomyces*, per i quali avviene solo per il 10-25% dell'acido malico totale [6]. Dai risultati ottenuti si può anche affermare che la fermentazione malolattica non è avvenuta, ciò è anche concorde ai risultati delle analisi microbiologiche rispetto la flora lattica presente, che vedremo in seguito.

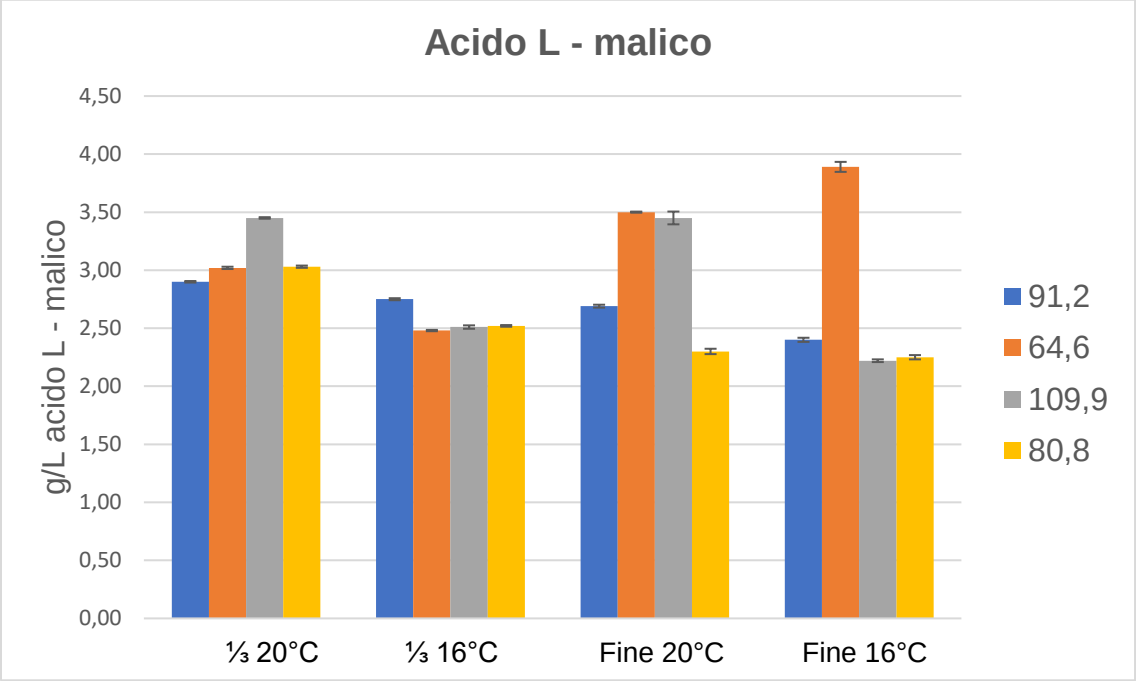


Figura 27 Risultati acido L-malico kit enzimatico L-LMAL-58/K-LMAL-116A 09/19 (Megazyme – Bray, Irlanda). Limite di rilevabilità 0,21 mg/L

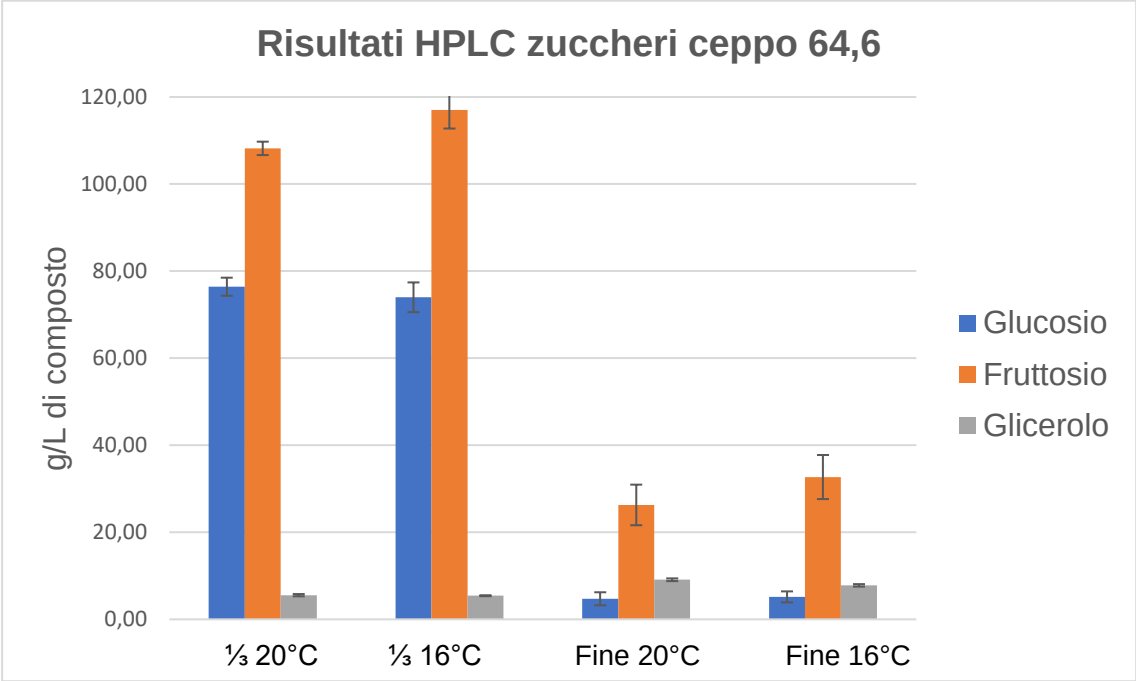


Figura 28 Contenuto in zuccheri in HPLC ad 1/3 e fine fermentazione condotta a 16°C e 20°C, ceppo 64,6

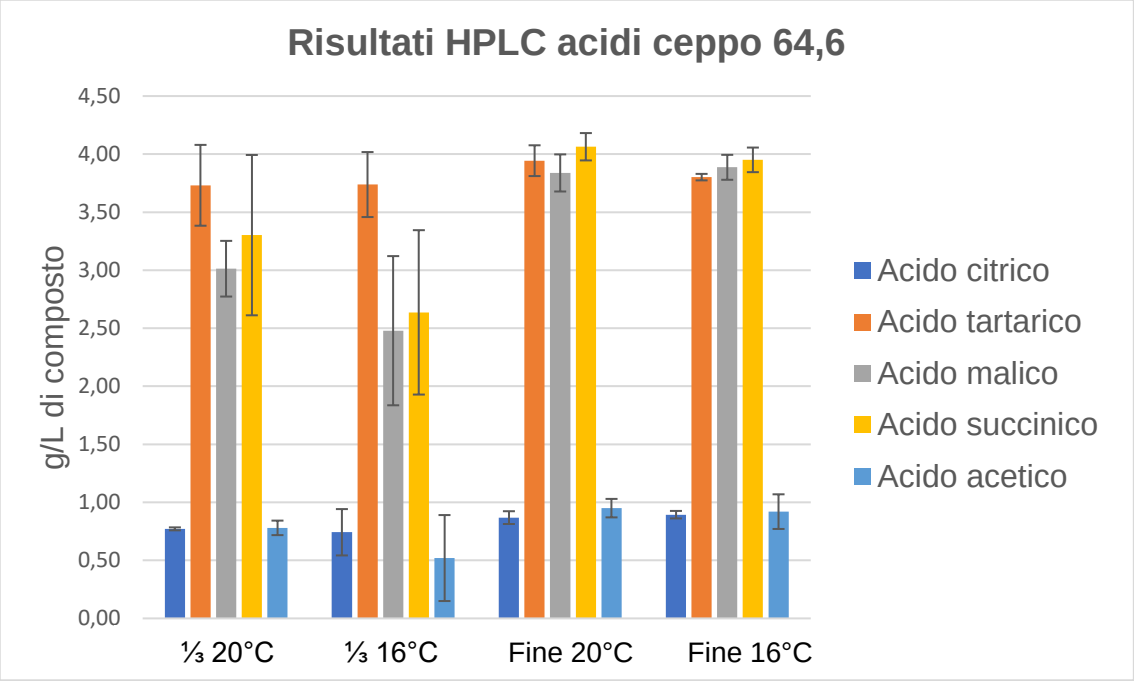


Figura 29 Contenuto in acidi in HPLC ad 1/3 e fine fermentazione condotta a 16°C e 20°C, ceppo 64,6

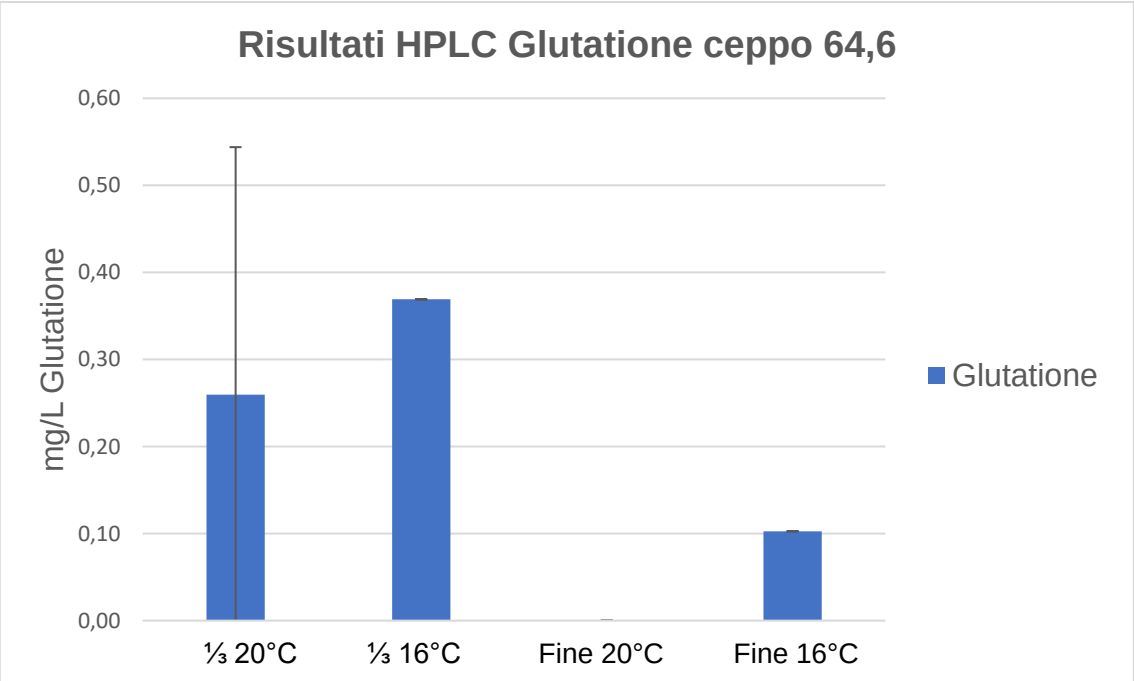


Figura 30 Contenuto in Glutatione in HPLC ad 1/3 e fine fermentazione condotta a 16°C e 20°C, ceppo 64,6

A monte del residuo zuccherino (Figura 28) si ha la conferma che la fermentazione alcolica sia stata condotta da *Saccharomyces cerevisiae,* in quanto tale specie predilige l'uso di glucosio, infatti gli eventuali residui si costituiscono in prevalenza di fruttosio, come nel caso specifico delle nostre fermentazioni. Nella fermentazione a 20°C c'è la possibilità che si siano generati all'interno del mezzo degli accumuli di temperatura localizzata i quali hanno aumentato la condizione di stress per il lievito. Questo, in risposta, ha sintetizzato glicerolo che, esattamente come ci si aspettava, risulta maggiore al termine della fermentazione condotta a 20°C. Per quanto concerne l'acido citrico (Figura 29) possiamo affermare l'assenza di variazioni significative alle due temperature di fermentazione, nemmeno per l'acido tartarico (Figura 29). Nonostante la conferma circa l'assenza della fermentazione malolattica in alcuni casi si registrano comunque valori bassi in acido malico (Figura 29). I batteri lattici presenti sono molto bassi, scendendo fin da subito sotto i livelli di rilevabilità stanno ad indicare che molto probabilmente queste fluttuazioni di acido malico che vediamo potrebbero essere dovute al metodo analitico e non rilevanti dal punto di vista della produzione. Si potrebbe ipotizzare che questo ceppo sia produttore di acido malico, ma sono speculazioni che vanno provate quindi non possiamo dare per certi questi aspetti senza prima una rivalutazione dei risultati. L'acidità volatile (VA) , determinata sostanzialmente dall'acido acetico presente (Figura 29), è un termine che rappresenta probabilmente la prima misura della qualità del vino da parte dell'industria enologica, anche se in senso negativo. Di conseguenza, la misura dell'acidità volatile è ancora importante nelle normative del vino della maggior parte dei paesi, anche se i componenti dell'acidità volatile non rappresentano una minaccia per la salute e la quantità di acidità volatile tollerata varierà con lo stile del vino e l'individuo. Il contenuto massimo legale di acidità volatile nei vini australiani, esclusa la SO_2 ed espressa in acido acetico, è di 1,5 g/L. L'acidità volatile è una misura degli acidi grassi a basso peso molecolare, o distillabili a vapore, nel vino, con l'acido di gran lunga principale che è l'acido acetico (>93%). Tuttavia, altri fattori che contribuiscono alla misura chimica dell'AV includono l'acido carbonico (dal biossido di carbonio), l'acido

solforoso (da SO_2), così come gli acidi lattico, formico, butirrico e propionico. Si noti che l'acido sorbico è anche distillabile a vapore e dovrebbe essere preso in considerazione se è stato aggiunto al vino (di solito come sorbato di potassio).

Generalmente percepito come l'odore di aceto, acidità volatile o acido acetico ha una soglia aromatica segnalata nel vino di appena 0,2 g/L, a seconda dello stile del vino e dell'individuo. Tuttavia, la concentrazione alla quale l'acido è considerato dannoso è generalmente superiore a 0,7 g/L. L'acidità volatile è più facilmente rilevabile se è presente anche una piccola quantità di acetato di etile, e in alcuni casi può prevalere l'aroma di acetato di etile.

Durante la fermentazione alcolica, il lievito produce piccole quantità di acido acetico e il VA di un vino sano subito dopo la fermentazione è solitamente compreso tra 0,1 e 0,4 g/L. Tuttavia, lieviti nativi o selvaggi come *Hansenula* e *Kloeckera* possono produrre alte concentrazioni di acido acetico prima e durante le prime fasi della fermentazione. Inoltre, *Brettanomyces* può produrre livelli elevati di VA se coltivato in condizioni aerobiche. Alcuni ceppi di *Saccharomyces* possono anche produrre grandi quantità di acido acetico quando sottoposti a stress, cioè durante fermentazioni a bassa o alta temperatura, durante la fermentazione di mosti ad alto contenuto zuccherino, quando l'azoto disponibile è basso o quando il pH è basso.

L’acido acetico nelle tesi considerate è risultato oltre la soglia di rilevabilità sensoriale. Per quanto riguarda l’acido succinico anche questo viene prodotto in maggior quantità in presenza di temperature di 20°C rispetto a quelle di 16°C. Il glutatione (Figura 30), peptide solforato, è sempre stato sotto il limite di rilevabilità, o comunque ha raggiunto livelli molto bassi, tali da non permettere l’espletamento delle sue proprietà antiossidanti. Dalla bibliografia si conosce che il suo contenuto medio nel vino finito si attesta nell’ordine dei 3-20 mg/L [78].

5.6 Analisi microbiologiche

Dalle analisi microbiologiche eseguite inizialmente su mosto, poi ad un terzo della fermentazione ed infine alla fine della stessa per ogni ceppo fermentato è stato possibile ricostruire la popolazione microbica presente durante tutto l'intero processo. Dopo aver quantificato le cellule mediante conta microbica i dati sono stati inseriti in tabella differenziandoli sulla base del terreno di coltura e del momento di campionamento. Tutti i dati sono espressi in forma logaritmica.

I dati microbiologici (Tabella 3) permettono di confermare che, ad un terzo della fermentazione, sia essa condotta a 20°C che a 16°C, i lieviti in fermentazione hanno preso il sopravvento, non permettendo ad altre specie microbiche di svilupparsi e anzi, portando la carica dei lieviti indigeni non-Saccharomyces al di sotto del limite di rilevabilità del metodo (< 10 UFC/mL).

I dati risultanti dalle conte dei batteri lattici totali e della specie *Oenococcus oeni* sono confrontabili tra loro, questo fa pensare ad un presenza di soli *Oenococcus oeni* all'interno del sistema in fermentazione.

*Tabella 3 Risultati delle analisi microbiologiche delle fermentazioni condotte a 20 e 16 °C. Dati espressi in Log UFC/mL; *, UFC/mL.*

Campionamento a 1/3 di fermentazione

	20°C					**16°C**				
Ceppo	*Saccharomyces spp.*	*non-Saccaromyces spp.*	Lieviti totali	LAB	*Oenococcus oeni*	*Saccharomyces spp.*	*Non-Saccharomyces spp.*	Lieviti totali	LAB	*Oenococcus oeni*
91,2	7,80 ± 0,08	<10*	7,79 ±0,12	3,70 ±0,01	4,16 ±0,01	8,69 ± 0,05	<10*	8,76 ± 0,03	3,37 ± 0,00	3,57 ± 0,05
64,6	7,90 ± 0,18	<10*	7,86 ±0,09	3,02 ±0,02	3,69 ±0,03	8,57 ± 0,13	<10*	8,74 ± 0,06	4,13 ± 0,05	4,34 ± 0,21
109,9	7,61 ± 0,03	<10*	7,43 ±0,05	4,23 ±0,03	4,41 ±0,02	8,56 ± 0,01	<10*	7,95 ± 0,82	3,89 ± 0,04	4,40 ± 0,23
80,8	8,47±0,68	<10*	8,08 ±1,19	3,80 ±0,13	3,99 ±0,15	9,00 ± 0,27	<10*	8,08 ± 1,19	3,78 ± 0,19	3,97 ± 0,07

Campionamento a fine fermentazione

	20°C					**16°C**				
Ceppo	*Saccharomyces spp.*	*non-Saccaromyces spp.*	Lieviti totali	LAB	*Oenococcus oeni*	*Saccharomyces spp.*	*Non-Saccharomyces spp.*	Lieviti totali	LAB	*Oenococcus oeni*
91,2	8,53 ± 0,18	<10*	8,72 ± 0,15	<1*	<1*	6,80 ± 0,19	<10*	6,79 ± 0,21	<1*	<1*
64,6	8,85 ± 0,04	<10*	8,89 ± 0,04	<1*	<1*	8,57 ± 0,39	<10*	8,73 ± 0,46	<1*	<1*
109,9	4,56 ± 0,24	<10*	4,99 ± 0,61	4,30 ± 0,22	4,38 ± 0,29	6,32 ± 0,12	<10*	6,29 ± 0,03	<1*	<1*
80,8	7,75 ± 0,02	<10*	7,75 ± 0,04	<1*	<1*	8,63 ± 0,20	<10*	8,48 ± 0,21	<1*	<1*

La popolazione presente nel vino al termine della fermentazione si costituisce di lieviti appartenenti al solo genere *Saccharomyces*. *Oenococcus oeni* e LAB sono via via diminuiti con il procedere della fermentazione, a causa delle crescente biomassa di lievito e quindi dalla carenza nutrizionale nel mezzo. I ceppi 91,2 e 109,9 a fine fermentazione a 16 °C mostrano conte microbiche di 2 Log inferiori rispetto a quanto osservato per gli altri due ceppi. Ciò può spiegare il motivo del rallentamento della fermentazione e la differenza della minor produzione di EtOH finale, per queste due tesi, che mostrano valori di EtOH inferiori di circa 1,3 – 1,4 % v/vol.

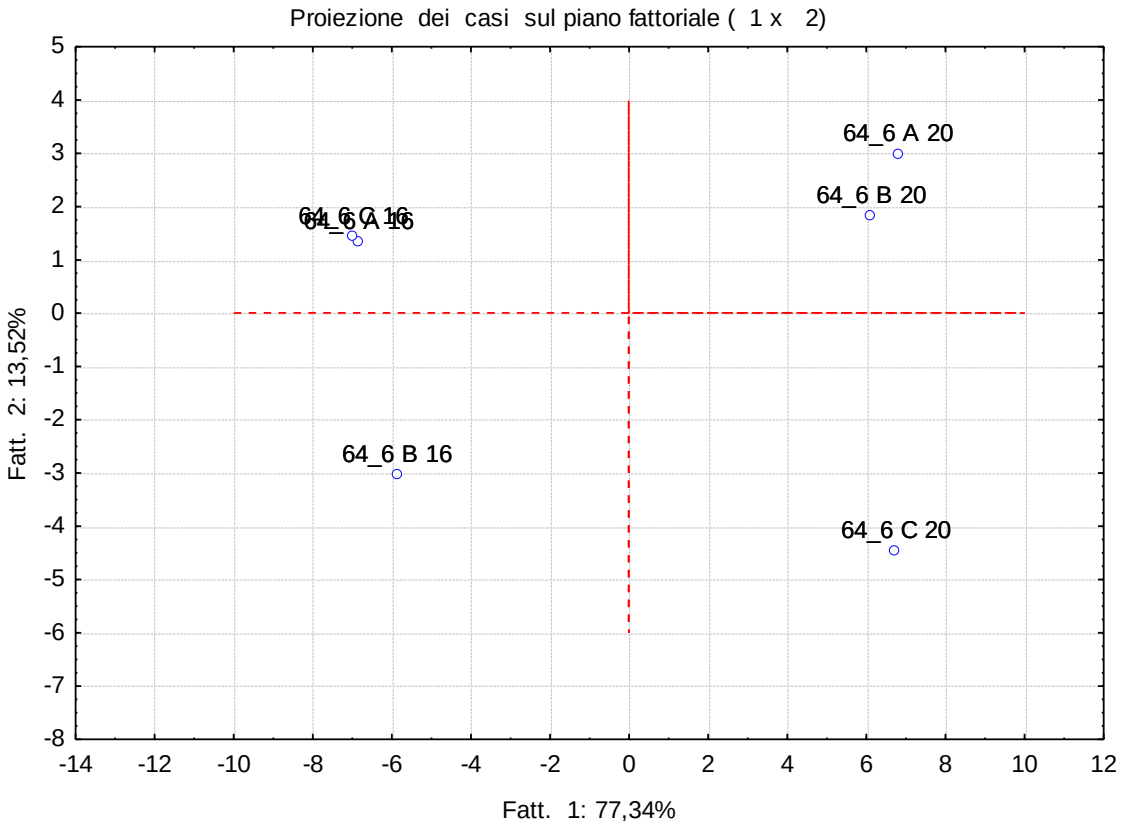
Lo studio "Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae" di Torjia et. al. (2003) mostra infatti come a fermentazioni condotte ad una temperature stabile di 15°C la massima popolazione venga raggiunta al sesto giorno mentre se la fermentazione viene condotta ad una temperatura di 20°C il maximum si abbia a 3 giorni dall'inizio, rimanendo nello stesso ordine di grandezza di 10^8 UFC/ml. Nonostante questa disparità in entrambi i casi le fermentazioni giungono al termine con le medesime tempistiche.

È possibile confrontare i dati ottenuti con quelli mostrati da Albertin et al. (2011). In tale lavoro si è valutata, tra le varie cose, la dinamica di popolazione di ceppi *Saccharomyces* in mosto sintetico. È interessante vedere come i ceppi di derivazione enologica e fermentati su mosto d'uva a 22 °C abbiano una popolazione massima di $7,15 \pm 2,02 \times 10^7$ cellule/ml, con un ordine di grandezza in più rispetto a quello raggiunto ad ⅓ della fermentazione a 20 °C ed un ordine di grandezza in meno rispetto a quello della popolazione raggiunta a tutti gli altri momenti di campionamento ($t_{1/3}$ 16°C, t_f 20°C, t_f 16°C). Considerando 20 ore, invece, come ⅓ della fermentazione i dati relativi alla conta microbica sono molto più vicini a quelli ottenuti dal presente studio, sempre nell'ordine di 10^7 cellule/ml. Questo può essere interpretato come in una buona capacità iniziale dei *Saccharomyces* in genere di stabilizzarsi nel mezzo e prendere il sopravvento fin dalle prime fasi di fermentazione, la loro capacità di moltiplicarsi più o meno velocemente è data invece dalle condizioni del mezzo in cui si trovano. Possiamo

quindi, proprio su queste basi, giustificare i dati sopra riportati in quanto la concentrazione zuccherina e l'APA contenuti nel mosto dello studio di Albertin et al. e del presente siano, rispettivamente, di 220 g/l (zucchero) e 315 mg/l (APA) contro 239,8 g/l (zucchero) e 150 mg/l (APA).

5.7 Risultati analisi aromi fermentativi

Com'è possibile osservare dall'analisi PCA delle componenti aromatiche rilevate nelle fermentazioni a 16 e 20 °C del ceppo 64,6 (monitorate in triplo) i profili dei vini ottenuti si differenziano molto bene nei due piani di sx e dx. Risulta evidente che la fermentazione a 16 °C è più ricca di prodotti secondari (composti volatili) e si caratterizza particolarmente per la presenza di alcoli ed esteri etilici, mentre le fermentazioni a 20 °C sono maggiormente caratterizzate dalla presenza di esteri acetici.



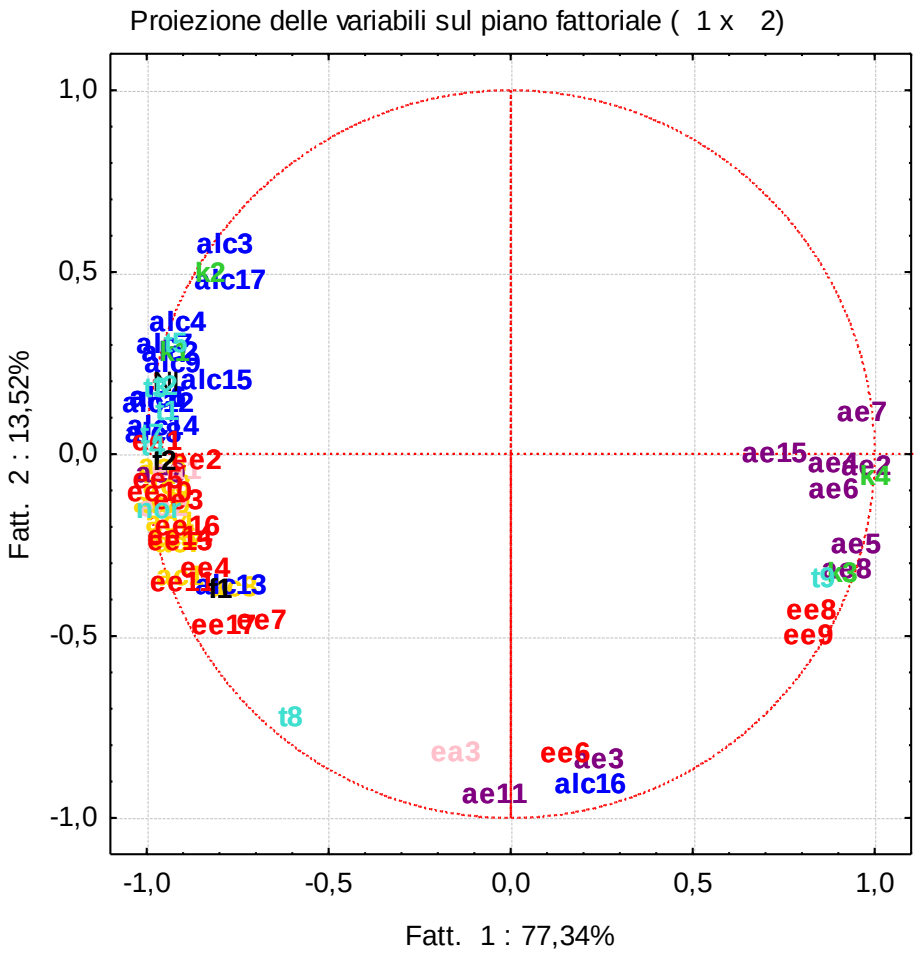


Figura 31 Risultati dell' analisi PCA relativa ai composti aromatici rilevanti nelle tre repliche delle fermentazioni del ceppo 64,6 a 16 e 20 °C.

Legenda: ee, esteri etilici;
ea, esteri acetici;
ae, altri esteri;
ac, acidi;
alc, alcoli;
t, terpeni;
k, chetoni;
f, fenoli;
nor, norisoprenoidi;
ald, aldeidi;
NI composti non identificati.

La fermentazione dei vini bianchi, tra cui il Sauvignon Blanc, viene generalmente condotta a temperature considerate basse ossia tra i 14 e i 16°C. Questo è utile al mantenimento del profilo aromatico del prodotto finito anche se questa affermazione può essere vera solo per alcune specifiche classi di composti. Dai risultati ottenuti emerge infatti come la concentrazione di esteri acetici sia superiore rispetto a quella degli esteri etilici nella tesi a 20°C. Come sappiamo la loro presenza si deve al contenuto di fonti carboniose e azotate presenti nel mosto ma anche alla complessa attività enzimatica che ne determina la produzione. Si potrebbe pensare, essendo le reazioni mediante da enzimi temperatura-dipendenti, ad una maggiore produzione di questi composti nella tesi a 20°C anche se la loro concentrazione sul prodotto finito fa presupporre una loro successiva perdita per evaporazione. Differente è invece il discorso per gli esteri acetici per i quali, in accordo con la bibliografia [79], si registra un aumento nella concentrazione nella tesi a 20°C piuttosto che in quella a 16°C. Ciò non toglie che allo stesso modo gli esteri acetici potrebbero venir persi per vaporizzazione trattandosi comunque di composti volatili ma probabilmente alcune loro caratteristiche intrinseche, tra cui il calore utile per vincere le forze di attrazione che tengono uniti gli atomi di quella molecola, potrebbero diminuire l'incidenza che si verifichi questo processo. Lo stesso studio di Gamero et. al (2013) mostra come in fermentazioni condotte a 12°C e 28°C la concentrazione maggiore di esteri acetici si registri a temperature più elevate, contrapponendosi a quelle più basse in cui invece c'è una presenza maggiore in esteri etilici. Per quanto concerne gli alcoli superiori sappiamo invece come la loro presenza sia importante quanto pericolosa, a concentrazioni eccessivamente elevate risultano sgradevoli danneggiando il profilo organolettico del vino. Nel presente studio, analogamente a quanto registrato da Gamero et. al (2013), il loro contenuto risulta inferiori nelle tesi a temperature maggiori.

6 Conclusioni

I caratteri su cui si può basare la selezione di un lievito sono molteplici, la scelta di quali effettivamente impiegare si fonda sulle necessità che emergono e a cui bisogna rispondere nel momento in cui viene eseguito il lavoro. Ad oggi la ricerca si pone due concetti come punti cardine: il ritorno, l'appartenenza, ad un territorio e la sostenibilità delle produzioni. Tale studio, di fatto, risponde ad entrambe le tematiche. L'appartenenza al territorio si ha con l'isolamento dei ceppi a partire dalle uve di uno specifico territorio, mentre il concetto di sostenibilità emerge quando, gli stessi, hanno la possibilità di eseguire fermentazioni a basso impiego di frigorie. Per comprovare la bontà dei ceppi selezionati si stanno eseguendo una serie di analisi chimiche utili alla definizione del profilo chimico, aromatico ed organolettico dei prodotti ottenuti, con attenzione particolare alle differenze, o analogie, tra le due temperature considerate.

Questo lavoro corrisponde solo ad una piccola parte di un grande processo di screening il quale proseguirà testando tutti gli altri ceppi isolati con le medesime modalità e selezionandoli poi con gli stessi criteri.

7 Bibliografia

[1] Ranieri, S.; Zambonelli, C.; Kaneko, Y. Saccharomyces sensu stricto: systematics, genetic diversity and evolution. *National Library of Medicine.* 2003.

[2] Kurtzman, C.P; Robnett, C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *National Library of Medicine.* 2003.

[3] Borneman, A.R.; Pretorius, I.S. Genomic Insights into the Saccharomyces sensu stricto Complex. *Genetics.* 2015.

[4] Goffeau A.; Barrel G.B.; Bussey H.; Davis B.D.R.W.; Feldmann H.; Galibert F.; Hoheisel J.D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S. G. Life with 6000 genes. *Science.* 1996.

[5] A. Hagman A.; Säll, T.; Compagno, C.; Piskur, J. Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. *PLoS One.* 2013.

[6] Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A.; Trattato di Enologia. Microbiologia del vino e vinificazioni; quarta edizione italiana; Edagricole, Bologna. 2017; Vol.1.

[7] Pfeiffer, T.; Morley, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in molecular biosciences.*2014.

[8] Barnett, K. E. J.A. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005, pp. 835-894.

[9] Cavalieri, D.; McGovern, P. E.; Hartl, D. L.; Mortimer, R.; Polsinelli, M. Evidence for S. cerevisiae fermentation in ancient wine. *Journal of molecular evolution.* 2003.

[10] Kraus, G. R. J.C. V. J. K. Levures sèches actives de vinification. lre partie : fabrication et caractéristiques. *Connaissance de la vigne et du vin.* 1983, vol. 17, n. 2, pp. 93-103,.

[11] Mina, M.; Tsaltas, D. Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour in *Yeast - Industrial Application.* 2017, pp. 117 - 134.

[12] Sumby, K. M.; Grbin, P. R.; Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry.* 2010, vol. CXXI, pp. 1 - 16.

[13] Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F. F. Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology and biotechnology.* 2011, vol. IX, pp. 1145 - 1159.

[14] Rosi, I.; Vinella, M.; Domizio, P.«Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *The journal of applied bacteriology.* 1994, vol. V, pp. 519 - 527.

[15] Mateo, J.; Stefano, R. D. Description of theβ-glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology.* 1997, vol. XIV, pp. 583 - 591.

[16] Chaudhry, R.; Varacallo, M. Biochemistry, Glycolysis. StatPearls Publishing. 2022.

[17] Walker, G. M.; Walkerx, R. S.; Enhancing Yeast Alcoholic. 2018, pp. 2-5.

[18] Sharf, R.; Margalith, P. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European journal of applied microbiology and biotechnology.* 1983, pp. 311-313,.

[19] Williams, L. A. Heat release in alcoholic fermentation: a critical reappraisal. *American journal of enology and viticulture.* 1982, pp. 149-153.

[20] Zamora, F. *Biochemistry of Alcoholic Fermentation in Wine Chemistry and Biochemistry;* Springer: New York, NY, 2009, pp. 3-26.

[21] Torija, J.; Rozès, N.; Poblet, M.; Guillamòn, J. M.; Mas, A. Effects of fermentation temperature on the strain. *International Journal of Food Microbiology,* 2001, pp. 47-53.

[22] Suutari, M.; Liukkonen, K.; Laakso, S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of General Microbiology.* 1990, pp. 1469-1474,

[23] Alexandre, H.; Rousseaux, I.; Charpentier, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid Composition and plasma membrane fluidity in Saccharomyces cerevisiae and Kloeckera apiculata. *FEMS Microbiology Letters.* 1994, pp. 17-22,.

[24] Cao-Hoang, L.; Dumont, F.; Marechal, P.A.; Thanh, M. L. Rates of chilling to 0 degrees C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2008, pp. 1379-1387.

[25] Bloch, K. Sterol structure and membrane function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2014, pp. 47-92,.

[26] Sablayrolles, J. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International.* 2008.

[27] Haloui, N.; Picque, D.; Corrieu, G. Alcoholic Fermentation in Winemaking: On-Line Measurement of Density and Carbon Dioxide Evolution. *Journal of Food Engineering.* 1988.

[28] Bisson, L. F. Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1998.

[29] Alexandre, H.; Charpentier, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology volume.* 1998.

[30] Sharf, R.; Margalith, P. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European journal of applied microbiology and biotechnology.* 1983 pp. 311-313.

[31] Suutari, M.; Liukkonen, K.; Laakso, S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of general microbiology.* 1990, pp. 1469-1474.

[32] Muccilli, S.; Restuccia, C. Bioprotective Role of Yeasts. 2015.

[33] Medina, K.; Carrau, F.; Gioia, O.; Bracesco, N. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 1997.

[34] Becker, J. V.; Armstrong, G. O.; van der Merwe, M. J.; Lambrechts, M. G.; Vivier, M. A.; Pretorius, I. S. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research.* 2003.pp. 79-85.

[35] Bisson, L. F. Diagnosis and Rectification of Arrested Fermentations. 2005.

[36] Ciani, M.; Capece, A.; Comitini, F.; Canonico, L. Yeast Interactions in Inoculated Wine. *Frontiers in Microbiology.* 2016, pp. 1-7.

[37] Drysdale, G.; Fleet, G. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology.* 1989, pp. 471-481.

[38] O.I.V., «RESOLUTION OIV-OENO 370-2012 - GUIDELINES FOR THE CHARACTERIZATION OF WINE YEASTS OF THE GENUS SACCHAROMYCES ISOLATED FROM VITIVINICULTURAL ENVIRONMENTS,» in *RESOLUTION OIV-OENO*, IZMIR, 2012.

[39] Nobile, M. D.; D'Amato, D.; Altieri, C.; Corbo, M.; Sinigaglia, M. Modeling the Yeast Growth-Cycle in a Model Wine System. *Food Microbiology and Safety.* 2003,vol. LXVIII, n. 6, pp. 2080 - 2085.

[40] Gadd, G. Interaction of Fungi with toxic metals. Plenum Press. New York , 1994.

[41] Stohs, S.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med,* 1995, pp. 321-336.

[42] Ruttkay-Nedecky, B.; Nejdl, L.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Adam, V.; Kizek, R. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013, pp. 6044-6066.

[43] Adamo, G. M. L. M. T. M. J. B. S. Amplification of the CUP1 gene is associated with evolution of copper tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology.* 2012, pp. 2325-2335.

[44] Peña, M. M. O.; Puig, S.; Thiele, D. J. Characterization of the Saccharomyces cerevisiae High Affinity Copper Transporter Ctr3. *The journal of biological chemistry.* 2000, pp. 33244-33251.

[45] Schimz, K.-L.; Holzer, H. Rapid Decrease of ATP Content in Intact Cells of Saccharomyces cerevisiae After Incubation with Low Concentrations of Sulfite. *Archives of Microbiology.* 1979, pp. 225-229.

[46] Stratford, M.; Rose, A. H. Transport of Sulphur Dioxide by Saccharomyces cerevisiae. *Journal of General Microbiology.* 1986, pp. 1-6.

[47] Divol, B.; du Toit, M.; Duckitt, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology Biotechnology.* 201, pp. 601-613.

[48] Maier, K.; Hinze, H.; Leuschel, L. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of Saccharomyces cerevisiae. *Biochimica et Biophysiea Acta.* 1986, pp. 120-130.

[49] Park, H.; Bakalinsky, A. T. SSU1 mediates sulphite efflux in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast.* 2000, pp. 881-888,.

[50] Thomas, D.; Surdin-Kerjan, Y. Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997, pp. 503-352.

[51] Bakker, J.; Clarke, R. J. *Wine: Flavour Chemistry. 2nd ed.;* Wiley - Blackwell: New Jersey, USA, 2011;

[52] Saerens, S. M. G.; Delvaux, F. R.; Verstrepen, K. J.; Thevelein, J. M. Production and biological function of volatile esters in Saccharomyces cerevisiae. *Microbial biotechnology .* 2010, vol. II, pp. 165 - 177.

[53] Moreno-Arribas, M. V.; Polo, M. C. *Wine Chemistry and Biochemistry,* Springer: Madrid, 2009.

[54] Hazelwood, L. A.; Daran, J.M.; van Maris, A. J. A.; Pronk, J. T.; Dickinson, J. R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on Saccharomyces cerevisiae Metabolism. *Applied and enviromental microbiology.* 2008, pp. 2259 - 2266.

[55] Tominaga, T.; Niclass, Y.; Frérot, E.; Dubourdieu, D. Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from Vitis vinifera (Var. Sauvignon Blanc and Semillon). *Journal of agricultural and food chemistry.* pp. 2006, 7251 - 7255.

[56] Swiegers, J. H.; Kievit, R. L.; Siebert, T.; Lattey, K. A.; Bramley, B. R.; Francis, I. L.; King, E. S.; Pretorius, I. S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology.* 2009, pp. 204 - 2011.

[57] Baudouin-Cornu, P.; Lagniel, G.; Kumar, C.; Huang, M.E.; Labarre, J. Glutathione Degradation Is a Key Determinant of Glutathione Homeostasis. *Journal of biological chemistry.* 2012, pp. 4552 - 4561,.

[58] Fernàndez-Gonzalez, M.; Stefano, R. D.; Briones, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiology.* 2003, pp. 35 - 41.

[59] Klis, F.K.; Mol, P.; Hellingwerf, K; Brul, S. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiologgy Reviews.* 2002, pp. 239 - 256.

[60] Liu, H.; Li, Y.; Shi, A.; Hu, H.; Sheng, X.; Liu, L.; Wang, Q.; Adhikari, B. Rheological characteristics and chain conformation of mannans obtained from Saccharomyces cerevisiae. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018, pp. 2404 - 2411.

[61] Caridi, A. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leewuenhoek.* 2006, pp. 417 - 422.

[62] Guadalupe, Z.; Martínez, L.; Ayestarán, B. Yeast Mannoproteins in Red Winemaking: Effect on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition. *American Journal of Enologgy and Viticolture.* 2010, pp. 191 - 200.

[63] Aguilar-Uscagna, B.; François, J. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology.* 2003, pp. 268 - 274.

[64] Gonzalez-Ramos, D.; Cebollero, E.; Gonzalez, R. A Recombinant Saccharomyces cerevisiae Strain Overproducing Mannoproteins Stabilizes Wine against Protein Haze. *Applied and Environmental Microbiology.* 2008, pp. 5533 - 5540.

[65] Todd, B. Aspects of yeast autolysis in sparkling wine production; *Proceedings of the Ninth Australian Wine Industry Technical Conference*, Adelaide. 1996, pp. 33 - 38.

[66] Feuillat, M.; Escot, S.; Charpentier, C.; Dulau, L. Élevage des vins rouges sur lies fines- Inérêt des interactions entre plysaccharides de levures et polyphénols du vin. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques.* 2001, pp. 17 - 18.

[67] Sàez, A. B.; Navascues, E.; Calderòn, F.; Benito, S. Refrigeration in Winemaking Industry in *Refrigeration.* IntechOpen: London, 2017; p. 154.

[68] Lòpez, A.; Secanell, P. A simple mathematical empirical model for estimating the rate of heat generation during fermentation in white-wine making. *International Journal of Refrigeration.* 1992, vol. 15, n. 5, pp. 276-280.

[69] De Vita, P.; De Vita, G. *Manuale di meccanica enologica*, 2° ed.; Hoepli: Trento, 2011;

[70] Flanzy, C.; Enología : *fundamentos scientíficos y tecnológicos*, 2° ed.; Mundi Prensa Libros: Madrid, 2003;

[71] Nardin, G.; Gaudio, A.; Antonel, G.; Simeoni, P. *Impiantistica enologica*, 1° ed.; Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl: Bologna, 2006;

[72] Grangeteau, C.; David, V.; Hervé, A.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S. The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could

explain lower yeast biodiversity in organic vineyards. *FEMS Yeast Research.* 2017, pp. 1-7.

[73] Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2001, pp. 232 - 260.

[74] Tananai, M. BIOEFFICACY OF ACTI-DIONE (RNA AND PROTEIN SYNTHESIS INHIBITOR) ON SURVIVAL, DEVELOPMENT AND PHASE TRANSITION OF SCHISTOCERCA GREGARIA (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE). *Journal of Biomedical Science.* 2019.

[75] Werner, M.; Rauhut, D.; Cottereau, P. Produzione di solfiti da parte del lievito. *InfoWine.* 2013.

[76] Dott, W.; Heinzel, M.; Trüper, H. G. Sulfite formation by wine yeast. *Archives of Microbiology.* 1977, pp. 283 - 285.

[77] Liu, M.; Yang, K.; Qi, Y.; Zhang, J.; Fan, M. Fermentation temperature and the phenolic and aroma profile of persimmon wine. *Insitute of Brewing and Distilling ,* 2018.

[78] Fraccassetti, D.;Tirelli, A. Evoluzione del Glutatione durante la fermentazione. Infowine. 2011.

[79] Gamero, A.; Tronchoni, J.; Querol, A.; Belloch, C. Production of aroma compounds by cryotolerant Saccharomyces species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology.* 2013, pp. 1405 - 1414.

[80] Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry.* 1987, pp. 111-180.