

# Microbiologia enologica

## **COLLANA EDAGRICOLE UNIVERSITÀ & FORMAZIONE**

Agricoltura sostenibile [a cura di Michele Pisante]  
Microbiologia enologica [a cura di Giovanna Suzzi e Rosanna Tofalo]  
Igiene degli alimenti [a cura di Maria Schirone e Pierina Visciano]  
L'acqua in agricoltura [a cura di Marcello Mastrorilli]  
Difesa sostenibile in agricoltura [a cura di Paola Battilani]  
Fertilizzazione sostenibile [a cura di Carlo Grignani]  
Agricoltura di precisione [a cura di Raffaele Casa]  
Malattie delle piante ornamentali  
[Angelo Garibaldi, Domenico Bertetti, Stefano Rapetti, M. Lodovica Gullino]  
Biotecnologie Sostenibili  
[a cura di Massimo Galbiati, Alessandra Gentile, Stefano La Malfa, Chiara Tonelli]  
Oli e grassi [a cura di Giuliano Mosca]  
Gestione della qualità e conservazione dei prodotti ortofrutticoli [Giancarlo Colelli e Paolo Inglese]  
Politica agraria e di sviluppo rurale [a cura di Angelo Frascarelli]

### **DIRETTORE SCIENTIFICO**

Michele Pisante

### **COMITATO SCIENTIFICO**

Marco Acutis, Aniello Anastasio, Paolo Balsari, Paola Battilani, Marco Bindi, Raffaele Casa, Luisella Celi, Riccardo D'Andria, Guido D'Urso, Stefania De Pascale, Rosa Draisci, Angelo Frascarelli, Dario Frisio, Massimo Galbiati, Alessandra Gentile, Carlo Grignani, Maria Lodovica Gullino, Paolo Inglese, Stefano La Malfa, Rosalba Lanciotti, Marcello Mastrorilli, Fabio Molinari, Giuliano Mosca, Erasmo Neviani, Michele Perniola, Maria Schirone, Fabio Stagnari, Giovanna Suzzi, Rosanna Tofalo, Chiara Tonelli, Sandra Torriani, Giovanni Vannacci, Pierina Visciano

# Microbiologia enologica

a cura di  
Giovanna Suzzi e Rosanna Tofalo

*Seconda edizione*



1ª edizione: ottobre 2014  
2ª edizione: settembre 2018



© Copyright 2018 by «Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media srl»  
via Eritrea 21 – 20157 Milano  
Redazione: Piazza G. Galilei, 6 – 40123 Bologna

Vendite: tel. 051/6575833; fax 051/6575999  
email: libri.edagricole@newbusinessmedia.it – www.edagricole.it

5557

Proprietà letteraria riservata – printed in Italy

*La riproduzione con qualsiasi processo di duplicazione delle pubblicazioni tutelate dal diritto d'autore è vietata e penalmente perseguibile (art. II della legge 22 aprile 1941, n. 633). Quest'opera è protetta ai sensi della legge sul diritto d'autore e delle Convenzioni internazionali per la protezione del diritto d'autore (Convenzione di Berna, Convenzione di Ginevra). Nessuna parte di questa pubblicazione può quindi essere riprodotta, memorizzata o trasmessa con qualsiasi mezzo e in qualsiasi forma (fotomeccanica, fotocopia, elettronica, ecc.) senza l'autorizzazione scritta dell'editore. In ogni caso di riproduzione abusiva si procederà d'ufficio a norma di legge.*

Realizzazione grafica: Emmegi Group, via F. Confalonieri, 36 – 20124 Milano  
Impianti e stampa: Rotolito S.p.A. via Sondrio, 3 – 20096 Seggiano di Pioltello (MI)  
Finito di stampare nel settembre 2018

ISBN 978-88-506-5557-1

# Prefazione

Questa seconda edizione del libro di Microbiologia enologica dopo pochi anni dall'uscita della prima riflette il grande interesse che la ricerca e la innovazione nel settore enologico ha sviluppato sia a livello internazionale sia nazionale in questi ultimi anni. Le nuove sfide per questa innovazione, così rapida, possono riassumersi nella competizione internazionale per quanto riguarda il mercato, le nuove tecnologie di fermentazione e la sostenibilità ambientale per ottenere vini eccellenti e anche nuovi prodotti che possano soddisfare le richieste del consumatore.

Fino a circa quarant'anni fa, il contributo dei lieviti alla produzione di vino era considerato minoritario rispetto alle applicazioni tecnologiche. L'innovazione nei processi di vinificazione, tuttavia, si è realizzata di pari passo con lo sviluppo della moderna microbiologia. Nel tempo è risultato evidente che la produzione di vini di buona qualità è un processo complesso che vede il coinvolgimento di specie microbiche diverse, non solo di lieviti, ma anche funghi, batteri lattici, batteri acetici. *Saccharomyces cerevisiae* rimane sempre il lievito con le maggiori capacità fermentative che domina, nella maggior parte dei casi, tutte le fermentazioni naturali o spontanee e fornisce le principali caratteristiche aromatiche al vino. Inoltre, è ormai generalmente accettato il contributo di lieviti non-*Saccharomyces* alla diversità e complessità dei vini, in accordo con le ultime ricerche scientifiche. Pertanto, questa nuova edizione si basa sull'aggiornamento della microbiologia enologica per quanto riguarda l'ecologia microbica, la biochimica e la tecnologia di vinificazione. Inoltre sono stati aggiunti tre nuovi capitoli, due riguardanti altre bevande alcoliche prodotte da *S. cerevisiae* (Cap. 14 e 15, grappa e birra, rispettivamente). Questa scelta è stata fatta in quanto questo testo è ricco di informazioni sulle caratteristiche generali dello sviluppo, metabolismo e fisiologia di *Saccharomyces*, la cui conoscenza rende pertanto possibile e facile allargare l'argomento del testo dal vino fino alla birra. Tale approccio è stato pensato per favorire lo studio nelle Scuole di Enologia, Istituti Agrari e nei corsi di laurea di Viticoltura ed Enologia, anche in accordo con le nuove tendenze del mercato.



# Gli autori

**Gianluca Bleve**

Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche

**Marilena Budroni**

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

**Angela Capece**

Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata

**Duccio Cavalieri**

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze

**Maurizio Ciani**

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche

**Luca Cocolin**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino

**Giuseppe Comi**

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine

**Francesca Comitini**

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche

**Giovanna Felis**

Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

**Fausto Gardini**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* Università di Bologna

**Francesco Grieco**

Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche

**Maria Gullo**

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

**Lucilla Iacumin**

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine

**Rosalba Lanciotti**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* Università di Bologna

**Ilaria Mannazzu**

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

**Marisa Manzano**

Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine

## **Gli autori**

### **Francesca Patrignani**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* Università di Bologna

### **Giorgia Perpetuini**

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo

### **Kalliopi Rantsiou**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino

### **Patrizia Romano**

Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata

### **Diana Isabella Serrazanetti**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* Università di Bologna

### **Giovanna Suzzi**

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi di Teramo

### **Rosanna Tofalo**

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi di Teramo

### **Sandra Torriani**

Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

### **Giacomo Zara**

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

### **Severino Zara**

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

# Indice generale

<b>1. La fermentazione spontanea</b> (Patrizia Romano e Angela Capece) .....	Pag.	1
1.1 Introduzione .....	"	1
1.2 Origine dei lieviti vinari .....	"	2
1.3 I lieviti dell'uva .....	"	2
1.3.1 Fattori che influenzano la crescita microbica sulla superficie degli acini d'uva .....	"	3
1.3.2 Fattori che determinano la predominanza di specie non- <i>Saccharomyces</i> sugli acini d'uva .....	"	4
1.4 Lieviti del mosto d'uva .....	"	4
1.4.1 Fattori che influenzano il microbiota indigeno del mosto d'uva .....	"	5
1.5 Evoluzione dei lieviti nella fermentazione spontanea .....	"	5
1.5.1 Fattori che influenzano l'evoluzione dei lieviti in vinificazione .....	"	7
1.5.1.1 Fattori di natura chimica .....	"	9
1.5.1.2 Fattori di natura fisica .....	"	10
1.5.1.3 Fattori di natura biologica .....	"	10
1.6 Conclusioni .....	"	12
Bibliografia .....	"	12
<b>2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> (Giovanna Suzzi, Rosanna Tofalo e Duccio Cavalieri) .....	"	15
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , principale attore della fermentazione .....	"	15
2.2 Il mosto come substrato di sviluppo .....	"	16
2.3 Tassonomia del genere <i>Saccharomyces</i> .....	"	17
2.4 I lieviti del genere <i>Saccharomyces</i> in enologia .....	"	21
2.5 Storia evolutiva, ecologia e biogeografia dei ceppi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vinari .....	"	22
2.6 La cellula .....	"	25
2.6.1 La parete cellulare .....	"	25
2.6.2 La membrana plasmatica .....	"	27
2.6.3 Citoplasma e citoscheletro .....	"	28
2.6.4 Reticolo endoplasmatico e vacuoli .....	"	28
2.6.5 Mitocondri e perossisomi .....	"	28
2.6.6 Il nucleo .....	"	29
2.7 Il pan-genoma di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	"	29
2.8 I lieviti killer .....	"	32
2.9 Sviluppo e ciclo vitale di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	"	33
2.10 Trealosio e glicogeno non solo prodotti di riserva .....	"	35
2.11 Risposta di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ai cambiamenti ambientali .....	"	37
Bibliografia .....	"	38
Sitografia .....	"	40
<b>3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: metabolismo primario e produzione di aromi nel vino</b> (Rosalba Lanciotti e Fausto Gardini) .....	"	41

## Indice generale

3.1	Metabolismo degli zuccheri .....	Pag.	41
3.1.1	Glicolisi e fermentazione alcolica .....	"	43
3.1.2	Regolazione della fermentazione alcolica e della respirazione .....	"	43
3.1.3	Deviazioni della fermentazione alcolica .....	"	45
3.1.4	Fermentazione glicerol-piruvica .....	"	45
3.1.5	Prodotti secondari della fermentazione glicerol-piruvica .....	"	47
3.1.6	Formazione di acido succinico .....	"	47
3.1.7	Formazione di acetico .....	"	49
3.1.8	Formazione di diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo .....	"	51
3.1.9	Formazione di acido lattico .....	"	51
3.1.10	Formazione di altri composti minoritari di fermentazione .....	"	51
3.2	Metabolismo degli acidi organici .....	"	51
3.3	Produzione di composti di aroma .....	"	52
3.3.1	Esteri .....	"	53
3.3.2	Alcoli superiori .....	"	54
3.3.3	Terpeni volatili .....	"	55
3.3.4	Composti solforati .....	"	56
3.4	Metabolismo dell'azoto .....	"	60
	Bibliografia .....	"	61
<b>4.</b>	<b>Cinetica della fermentazione alcolica e problematiche relative agli arresti di fermentazione</b> (Francesca Patrignani, Diana I. Serrazanetti e Rosalba Lanciotti) .....	"	63
4.1	Introduzione .....	"	63
4.2	Cinetica della fermentazione alcolica .....	"	64
4.3	Principali cause degli arresti o dei rallentamenti di fermentazione .....	"	66
4.3.1	Problematiche caratterizzanti le uve e il mosto .....	"	66
4.3.2	Problematiche riguardanti il ceppo utilizzato .....	"	70
4.3.3	Problematiche riguardanti il ceppo/parametri di processo .....	"	73
4.4	Conclusioni .....	"	75
	Bibliografia .....	"	75
<b>5.</b>	<b>La rifermentazione dei vini</b> (Giovanna Suzzi, Giorgia Perpetuini e Rosanna Tofalo) .....	"	77
5.1	Introduzione .....	"	77
5.2	La produzione di vino spumante .....	"	77
5.3	I lieviti dei vini spumanti .....	"	79
5.3.1	La flocculazione e capacità adesive in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	"	80
5.4	Meccanismo della flocculazione .....	"	80
5.5	Basi genetiche della flocculazione .....	"	82
5.6	I lieviti immobilizzati .....	"	84
5.7	Autolisi .....	"	85
5.8	Miglioramento della spumantizzazione .....	"	86
5.9	La schiuma .....	"	88
	Bibliografia .....	"	89
<b>6.</b>	<b>I vini ad invecchiamento biologico</b> (Marilena Budroni, Severino Zara e Giacomo Zara) .....	"	91
6.1	Introduzione .....	"	91
6.2	I vini affinati biologicamente .....	"	91
6.2.1	Sherry fino .....	"	91
6.2.2	Vernaccia di Oristano .....	"	92
6.2.3	Vin Jaune .....	"	92
6.2.4	Il metabolismo dei lieviti flor .....	"	93
6.2.4.1	La fase pelagica: il metabolismo fermentativo .....	"	93
6.2.4.2	La fase flor: il metabolismo ossidativo .....	"	94
6.2.5	Caratteristiche genetiche dei lieviti flor .....	"	95

6.2.6	Perché i lieviti flor risalgono in superficie? .....	Pag.	95
6.2.7	Ecologia dei lieviti flor.....	"	95
6.3	I vini invecchiati biologicamente .....	"	96
6.3.1	Vin Santo .....	"	97
	6.3.1.1 Tecnologia di produzione .....	"	98
	6.3.1.2 Fermentazione spontanea e fermentazione guidata .....	"	98
	6.3.1.3 Invecchiamento .....	"	99
6.3.2	Vini affinati sulle fecce .....	"	99
	6.3.2.1 Aspetti sensoriali .....	"	99
	6.3.2.2 Aspetti salutistici .....	"	100
	Bibliografia .....	"	100
<b>7.</b>	<b>I lieviti non-Saccharomyces</b> (Luca Cocolin e Maurizio Ciani) .....	"	101
7.1	Ecologia dei lieviti non-Saccharomyces .....	"	101
7.2	Analisi microbiologica dei lieviti non-Saccharomyces .....	"	102
7.3	I principali generi di lieviti non-Saccharomyces .....	"	103
	7.3.1 <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> .....	"	103
	7.3.2 <i>Metschnikowia</i> .....	"	105
	7.3.3 <i>Candida/Starmerella</i> .....	"	105
	7.3.4 <i>Pichia</i> .....	"	107
	7.3.5 <i>Wickerhamomyces</i> .....	"	108
	7.3.6 <i>Saccharomycodes</i> .....	"	108
	7.3.7 <i>Torulaspota</i> .....	"	108
	7.3.8 <i>Zygosaccharomyces</i> .....	"	109
	7.3.9 <i>Lachancea/Kluyveromyces</i> .....	"	110
	7.3.10 <i>Schizosaccharomyces</i> .....	"	111
	7.3.11 <i>Dekkera/Brettanomyces</i> .....	"	111
7.4	Applicazioni biotecnologiche di lieviti non-Saccharomyces .....	"	114
	7.4.1 Fermentazioni miste .....	"	114
7.5	I lieviti non-Saccharomyces nel controllo dei lieviti alterativi .....	"	115
	Bibliografia .....	"	116
<b>8.</b>	<b>Batteri lattici nel vino</b> (Sandra Torriani e Giovanna Felis) .....	"	119
8.1	Caratteristiche generali .....	"	119
8.2	Tassonomia .....	"	120
	8.2.1 Genere <i>Lactobacillus</i> .....	"	120
	8.2.2 Genere <i>Pediococcus</i> .....	"	121
	8.2.3 Genere <i>Leuconostoc</i> .....	"	121
	8.2.4 Genere <i>Oenococcus</i> e la specie <i>Oenococcus oeni</i> .....	"	121
8.3	Identificazione e tipizzazione molecolare .....	"	122
	8.3.1 Metodi tradizionali .....	"	122
	8.3.2 Metodi molecolari .....	"	122
	8.3.2.1 Identificazione .....	"	122
	8.3.2.2 Tipizzazione .....	"	122
8.4	Ecologia ed evoluzione dei batteri lattici durante la vinificazione .....	"	124
8.5	Metabolismo .....	"	125
	8.5.1 Metabolismo dei carboidrati .....	"	125
	8.5.2 Metabolismo dei composti azotati .....	"	127
	8.5.3 Metabolismo degli acidi organici .....	"	128
	8.5.3.1 Trasformazione dell'acido malico .....	"	128
	8.5.3.2 Trasformazione dell'acido citrico .....	"	129
8.6	La fermentazione malolattica nel vino .....	"	129
	8.6.1 Fattori che influenzano la FML .....	"	129
	8.6.1.1 Temperatura .....	"	130
	8.6.1.2 Acidità .....	"	130

## Indice generale

8.6.1.3 Etanolo .....	Pag.	130
8.6.1.4 Solfitazione .....	"	130
8.6.1.5 Interazioni microbiche .....	"	131
8.6.2 Uso di <i>starter</i> .....	"	131
8.6.3 Contributo alle proprietà sensoriali dei vini .....	"	132
8.7 Caratteri addizionali .....	"	133
8.7.1 Produzione di amine biogene .....	"	133
8.7.2 Produzione di etilcarbammato .....	"	134
8.7.3 Produzione di batteriocine .....	"	135
8.7.4 Batteriofagi .....	"	135
8.8 "Malattie" del vino .....	"	136
8.8.1 I LAB di alterazione .....	"	136
8.8.2 Metodi di controllo .....	"	137
Bibliografia .....	"	137
<b>9. I batteri acetici (Maria Gullo) .....</b>	"	139
9.1 I batteri acetici: caratteristiche fenotipiche e tassonomia .....	"	139
9.2 I bersagli del catabolismo .....	"	143
9.2.1 Etanolo .....	"	143
9.2.2 Zuccheri .....	"	143
9.2.3 Polioli .....	"	144
9.2.4 Acidi organici .....	"	145
9.3 Ecologia, isolamento e coltivazione .....	"	145
9.4 Batteri acetici e produzione di vino .....	"	146
9.4.1 Origine dei batteri acetici del vino .....	"	147
9.4.2 Batteri acetici ed ossigeno .....	"	148
9.4.3 Batteri acetici ed etanolo .....	"	148
9.4.4 Batteri acetici e temperatura .....	"	148
9.4.5 Batteri acetici ed anidride solforosa .....	"	149
9.5 Considerazioni generali sul controllo dei batteri acetici in enologia .....	"	149
9.6 La produzione di aceto .....	"	149
9.7 La fermentazione acetica .....	"	152
9.7.1 Sistema statico superficiale .....	"	152
9.7.2 Sistema sommerso .....	"	153
9.7.3 Fermentazione in stato solido .....	"	153
Bibliografia .....	"	154
Sitografia .....	"	154
<b>10. Ricerca, identificazione e caratterizzazione dei lieviti vinari</b>		
(Rosanna Tofalo e Kalliopi Rantsiou) .....	"	155
10.1 Introduzione .....	"	155
10.2 Isolamento dei lieviti .....	"	155
10.3 Identificazione fenotipica .....	"	157
10.4 Metodi molecolari per l'identificazione dei lieviti vinari .....	"	159
10.4.1 Analisi delle sequenze ribosomiali .....	"	159
10.4.2 Analisi di sequenza del dominio D1/D2 del 26S rRNA .....	"	161
10.4.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (PCR-RFLP) .....	"	161
10.5 Tecniche di caratterizzazione genotipica .....	"	162
10.5.1 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) .....	"	162
10.5.2 <i>Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (mtDNA-RFLP) .....	"	162
10.5.3 Metodi di tipizzazione basati sulla PCR .....	"	163
10.5.3.1 <i>Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR</i> (RAPD-PCR) .....	"	163
10.5.3.2 <i>Amplification Fragment Length Polymorphism</i> (AFLP) .....	"	163
10.5.3.3 Analisi delle regioni delta ( $\delta$ ) .....	"	164

10.5.3.4	Analisi dei microsatelliti .....	Pag.	164
10.5.3.5	<i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST) .....	"	164
10.5.3.6	Genomica comparativa .....	"	165
10.6	Metodi coltura-indipendenti .....	"	165
10.6.1	Metodi basati sulla microscopia .....	"	167
10.6.1.1	Colorazione con blu di metilene .....	"	167
10.6.1.2	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (FISH) .....	"	167
10.6.1.3	<i>Direct Epifluorescence Filter Technique</i> (DEFT) .....	"	167
10.6.2	Metodi basati sull'analisi di acidi nucleici .....	"	168
10.6.2.1	<i>PCR- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (PCR-DGGE) .....	"	168
10.6.2.2	PCR quantitativa .....	"	168
10.6.2.3	<i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) .....	"	171
10.7	Sistema CRISPR-Cas9 .....	"	171
10.8	Conclusioni .....	"	172
	Bibliografia .....	"	173
	Sitografia .....	"	174
<b>11.</b>	<b>Uso di colture starter e impiego di lieviti e batteri lattici in cantina</b> (Gianluca Bleve e Francesco Grieco) .....	"	175
11.1	Introduzione .....	"	175
11.2	Lieviti starter: .....	"	175
11.2.1	Isolamento e selezione di lieviti starter .....	"	176
11.2.2	Produzione di biomasse di lievito .....	"	180
11.3	Selezione di batteri malolattici (LABM) .....	"	184
11.3.1	Preparazioni di starter malolattici .....	"	187
11.3.1.1	Coltura starter batterica congelata .....	"	187
11.3.1.2	Coltura starter batterica liquida .....	"	187
11.3.1.3	Coltura starter batterica liofilizzata da riattivare (standard o tradizionale) ....	"	187
11.3.1.4	Coltura starter batterica liofilizzata per inoculo diretto rapido .....	"	188
11.3.2	Produzione di biomasse di starter malolattici .....	"	188
11.3.3	Metodi di impiego: controllo e conservazione delle colture starter .....	"	189
11.3.4	Metodi innovativi per la conduzione della fermentazione malolattica .....	"	189
11.3.5	Quando inoculare .....	"	189
11.4	Innovazioni nelle procedure di inoculo .....	"	191
11.4.1	Colture starter non- <i>Saccharomyces</i> .....	"	191
11.4.2	Co-inoculo di batteri lattici e di lievito .....	"	191
11.4.3	Immobilizzazione di lieviti e batteri lattici .....	"	192
11.5	Strategie per il miglioramento genetico dei lieviti .....	"	193
11.5.1	Selezione di varianti: deriva genetica .....	"	193
11.5.1.1	Selezione di varianti: <i>genome renewal</i> .....	"	193
11.5.1.2	Mutagenesi e selezione .....	"	193
11.5.1.3	Ibridazione .....	"	195
11.5.1.4	Coniugazione rara ( <i>rare-mating</i> ) .....	"	195
11.5.1.5	Citoduzione .....	"	195
11.5.1.6	Fusione di sferoplasti .....	"	195
11.5.1.7	Ibridazioni tra specie del genere <i>Saccharomyces</i> .....	"	195
11.5.1.8	Evoluzione adattativa in coltura continua .....	"	196
11.6	Tecniche molecolari per il miglioramento genetico di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	"	196
11.7	Vini prodotti mediante lieviti geneticamente modificati (GM) .....	"	198
11.8	Conclusioni .....	"	200
	Bibliografia .....	"	200
	Sitografia .....	"	201
<b>12.</b>	<b><i>Botrytis cinerea</i>, marciume nobile e marciume grigio</b> (Giuseppe Comi, Marisa Manzano e Lucilla Iacumin) .....	"	203

## Indice generale

12.1	Introduzione .....	Pag.	203
12.2	<i>Botrytis cinerea</i> .....	"	203
12.3	Marciume nobile.....	"	204
12.4	Cambiamenti chimici nella bacca e nel mosto causati da <i>B. cinerea</i> .....	"	205
12.5	Metabolismo degli zuccheri .....	"	206
12.6	Metabolismo degli acidi organici .....	"	207
12.7	Evoluzione delle sostanze azotate .....	"	207
12.8	Evoluzione dei composti fenolici .....	"	207
12.9	Le sostanze aromatiche e le sostanze ad azione antibiotica .....	"	208
12.10	Produzione di vino con uve affette da marciume nobile .....	"	209
12.11	Fattori che influenzano il marciume nobile .....	"	211
12.12	Il marciume grigio .....	"	213
12.13	Il marciume acido o "comune" .....	"	215
12.14	Salubrità dei vini bottrizzati - amine biogene e ocratossina A .....	"	216
12.15	Vini italiani ottenuti con uve appassite e bottrizzate: Vin Santo, Picolit e passiti .....	"	216
12.16	Altri vini europei prodotti con uve affette da marciume nobile .....	"	218
	Bibliografia .....	"	218
	Sitografia .....	"	219
<b>13.</b>	<b>Gli enzimi dei lieviti influenzanti l'aroma dei vini</b> (Giuseppe Comi e Lucilla Iacumin) .....	"	221
13.1	Introduzione .....	"	221
13.2	Glicosidasi .....	"	222
13.3	Carbonio-zolfo liasi .....	"	225
13.4	Esterasi .....	"	228
13.5	Conclusioni .....	"	229
	Bibliografia .....	"	230

## PARTE SPECIALE

<b>14.</b>	<b>La grappa e le acqueviti</b> (Giuseppe Comi e Lucilla Iacumin) .....	"	233
14.1	Introduzione .....	"	233
14.2	La grappa .....	"	234
	14.2.1 Raccolta e stoccaggio delle vinacce .....	"	235
	14.2.2 Fermentazione .....	"	237
	14.2.3 Distillazione .....	"	241
	14.2.4 Maturazione/invecchiamento .....	"	244
	14.2.5 Stabilizzazione e imbottigliamento .....	"	245
14.3	Grappe aromatizzate .....	"	245
14.4	Altri Distillati .....	"	246
	14.4.1 Cognac .....	"	246
	14.4.2 Armagnac .....	"	246
	14.4.3 Brandy .....	"	247
	14.4.4 Acquavite d'uva .....	"	247
	14.4.5 Acquavite di frutta (ciliegie, mele, pere, susine) .....	"	247
	14.4.6 Whisky .....	"	248
	14.4.7 Gin .....	"	249
	14.4.8 Vodka .....	"	249
	14.4.9 Rum .....	"	250
	Bibliografia .....	"	251
	Sitografia .....	"	251
<b>15.</b>	<b>Microbiologia della birra</b> (Giacomo Zara, Maurizio Ciani, Francesca Comitini, Ilaria Mannazzu e Marilena Budroni) .....	"	253
15.1	La birra .....	"	253

15.2	Ecologia microbica dell'orzo .....	Pag.	254
	15.2.1 Struttura della cariosside e modalità di sviluppo dei microrganismi .....	"	254
	15.2.2 Comunità microbiche dell'orzo .....	"	255
15.3	La maltazione .....	"	255
	15.3.1 Evoluzione delle popolazioni microbiche durante la maltazione .....	"	256
15.4	Impatto dei microrganismi sulla qualità del malto e della birra .....	"	257
	15.4.1 In campo e in malteria .....	"	257
	15.4.2 La flocculazione prematura e il <i>gushing</i> .....	"	258
	15.4.3 Le micotossine .....	"	258
	15.4.4 Utilizzo di microrganismi per migliorare le qualità del malto .....	"	258
15.5	La fermentazione primaria e la rifermentazione .....	"	259
15.6	I lieviti birrari .....	"	260
	15.6.1 Esigenze nutrizionali dei lieviti birrari .....	"	261
	15.6.2 Produzione di aromi .....	"	262
	15.6.3 Miglioramento genetico dei lieviti birrari .....	"	263
15.7	Impiego delle colture <i>starter</i> .....	"	264
	15.7.1 Conservazione delle colture <i>starter</i> per il <i>repitching</i> .....	"	265
15.8	Lieviti non-convenzionali .....	"	265
15.9	Fermentazioni spontanee .....	"	267
15.10	Birre innovative e funzionali .....	"	269
	15.10.1 Birre <i>light</i> e <i>alcohol-free</i> .....	"	269
	15.10.2 Birre funzionali, probiotiche e <i>gluten-free</i> .....	"	270
	Bibliografia .....	"	271
	<b>Indice analitico</b> .....	"	273



# 1 La fermentazione spontanea

Patrizia Romano e Angela Capece

## 1.1 Introduzione

Il semplice processo biochimico di conversione del mosto d'uva in vino fu descritto da Louis Pasteur nel 1872 come un processo attraverso il quale i lieviti fermentano spontaneamente gli zuccheri dell'uva a etanolo, anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) ed altri metaboliti.

Gli studi successivi hanno evidenziato che in realtà si tratta di un processo molto più complesso, che dipende, oltre che dalla composizione chimica del mosto, dall'intervento simultaneo di microrganismi fisiologicamente e biochimicamente differenti, rappresentati da lieviti, muffe, batteri (principalmente lattici e acetici). Di tutti questi microrganismi, in conseguenza delle caratteristiche chimico-fisiche del mosto, i lieviti sono i principali responsabili della fermentazione. Quindi, le fermentazioni alcoliche spontanee sono quelle ottenute per mezzo dei lieviti già presenti sull'uva e/o nell'ambiente di vinificazione, noti come lieviti naturali o indigeni. Tali microrganismi vengono anche spesso indicati come lieviti selvaggi, poiché non vengono sottoposti ad alcuna tecnica microbiologica di selezione e/o miglioramento.

In conseguenza di ciò, è possibile concludere che l'andamento fermentativo e il risultato del processo sono dipendenti da tre fattori principali:

- composizione del mosto,
- corredo enzimatico dei lieviti,
- condizioni ambientali nelle quali i lieviti operano.

È necessario tuttavia precisare che durante il processo di trasformazione del mosto in vino, sebbene la fermentazione alcolica rappresenti l'evento fondamentale, si svolgono altre reazioni biochimiche, che nel loro insieme vanno a costituire la cosiddetta "fermentazione vinaria" e il cui contributo alla definizione delle caratteristiche organolettiche del vino non è certamente trascurabile.

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

- per la presenza di ceppi di *Saccharomyces* enologicamente validi, la fermentazione si completava con l'esaurimento degli zuccheri;
- a causa della bassa temperatura e nonostante la presenza di ottimi ceppi o, più semplicemente, per la mancanza di ceppi dotati di elevato potere fermentativo, la fermentazione non giungeva a termine, lasciando un residuo di zuccheri più o meno abbondante;
- in un qualunque momento, si osservava lo sviluppo significativo anche di altri lieviti, quali *Schizosaccharomyces* e *Brettanomyces* con risultati indesiderati, a seguito della formazione di sostanze aromatiche non gradevoli.

Il caso più frequente era il secondo e cioè la produzione di un vino contenente ancora zuccheri fermentescibili, instabile dal punto di vista microbiologico.

La vinificazione spontanea, malgrado l'evidente imprevedibilità del suo esito finale e il rischio dell'insorgenza di problemi di natura microbiologica, è oggi ancora assai diffusa, specialmente in Italia e in particolare nella produzione di alcuni vini di pregio. I sostenitori della vinificazione spontanea

## 1. La fermentazione spontanea

attribuiscono ai prodotti ottenuti per tale via una forte distinzione stilistica, frutto di una maggiore complessità di aroma, gusto e struttura, rispetto ai prodotti ottenuti mediante inoculo di ceppi selezionati, che, viceversa, sarebbero responsabili di un “effetto appiattimento” delle differenze.

### 1.2 Origine dei lieviti vinari

Sebbene i lieviti siano abbondantemente diffusi in natura, la loro distribuzione non è casuale, ma si ritrovano in specifici habitat, dove le diverse specie formano le comunità. Le diverse specie ritrovate in un habitat possono essere classificate come “autotone” (ovvero le specie che costituiscono componenti essenziali di una comunità) o “alloctone” (le specie che sono casualmente presenti). All'interno delle comunità, la distribuzione delle specie è, inoltre, influenzata dalle cosiddette “nicchie”, ovvero quei fattori fisici, chimici e biotici che permettono ai lieviti di sopravvivere e svilupparsi. I lieviti ritrovati in nicchie differenti vengono definiti “generalisti” (nicchie estese), mentre quelli ritrovati in habitat unici vengono definiti “specialisti” (nicchie limitate). Nell'ambiente vitivinicolo (habitat), la vigna (superficie delle uve) e la cantina (superficie delle attrezzature e mosto) possono essere considerate nicchie specialistiche, dove i lieviti vinari formano delle comunità ampiamente variabili in funzione di numerosi parametri. Ad esempio, il grado di maturazione dell'acino o l'impiego di pesticidi influenzano la composizione del microbiota dell'uva, la composizione del mosto d'uva influenza significativamente i lieviti presenti nel mosto, mentre il livello di igiene della cantina gioca un ruolo fondamentale sulla composizione di questa “nicchia”.

In conclusione, due sono le fonti principali da cui derivano i lieviti responsabili della fermentazione spontanea: la vigna e la cantina.

### 1.3 I lieviti dell'uva

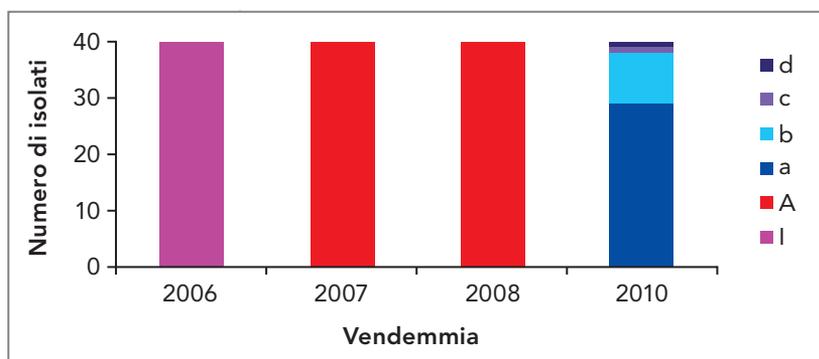
L'ecologia microbica delle uve è stata ampiamente studiata, sebbene la sua composizione non sia ancora completamente nota, a seguito dell'influenza significativa da essa esercitata sulla qualità finale del vino. Infatti, l'uva è la principale fonte di microrganismi per la produzione di vino e si stima che sulla superficie dei grappoli la popolazione microbica raggiunga valori di  $10^3$ - $10^5$  UFC/g, composta principalmente da lieviti, ma anche da batteri e funghi filamentosi.

In generale, la concentrazione cellulare dei lieviti riscontrati sugli acini immaturi è piuttosto bassa ( $10$ - $10^3$  UFC/g), ma con il progredire della maturazione la popolazione raggiunge  $10^4$ - $10^6$  UFC/g. Sui grappoli immaturi predominano i generi *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium*, *Rhodospiridium* che sono presenti in generale nel vigneto (suolo, foglie, cortecchia). In alcuni casi, specie di *Aureobasidium* sono predominanti sulle uve, e sono persistenti fino alla fase di raccolta. È molto importante capire il ruolo svolto, nell'ambito dell'ecologia microbica del grappolo d'uva, dalle specie di *Aureobasidium*. Sebbene questi lieviti non abbiano alcun ruolo in vinificazione, a causa della loro incapacità di fermentare gli zuccheri e di sopravvivere nel vino, essi costituiscono il “microbiota” residente sui chicchi d'uva. La dominanza di *Aureobasidium pullulans* sulla superficie delle uve è stata correlata a diversi fattori, come la resistenza di questo microrganismo ai fungicidi, la capacità di svolgere azione detossificante nei confronti del solfato di rame e la capacità di competere con altri funghi. Infatti, è ben nota l'attività antagonistica svolta da *A. pullulans* nei confronti di altri lieviti e funghi e quest'attività potrebbe influenzare significativamente la popolazione microbica delle uve. Inoltre, in diversi studi è stato proposto l'impiego di questo lievito per il controllo di microrganismi indesiderati, come *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* e *Botrytis cinerea*.

Sui grappoli maturi *Hanseniaspora spp.* (e la sua forma imperfetta *Kloeckera*) e *Metschnikowia spp.* sono i lieviti predominanti, rappresentando il 50-75% circa della popolazione blastomietica totale. Numericamente meno prevalenti di questi lieviti sono le specie di *Candida* (*C. zemplinina*), *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*.

Il principale agente della fermentazione, *S. cerevisiae*, invece, è assente o presente in concentrazioni molto basse. Inoltre, sembra che il ceppo dominante di *S. cerevisiae* in vigneto sia diverso ogni anno. Ed è questo uno dei motivi per cui è scorretto pensare che la fermentazione spontanea, in un dato territorio, sia sistematicamente realizzata ogni anno dagli stessi ceppi. In figura 1.1 sono riportati i risultati di uno studio condotto sulla popolazione di lieviti *S. cerevisiae*, isolati da uno stesso vigneto in successive vendemmie. Solo per due vendemmie consecutive, è stato ritrovato lo stesso ceppo come dominante, mentre nella prima e nell'ultima vendemmia campionata sono stati ritrovati ceppi diversi di *S. cerevisiae*.

Figura 1.1 - Distribuzione di ceppi diversi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati dallo stesso vigneto in quattro vendemmie.



### 1.3.1 Fattori che influenzano la crescita microbica sulla superficie degli acini d'uva

I parametri che influenzano la composizione della microflora epifitica delle uve sono numerosi, i principali sono rappresentati dalle condizioni climatiche, i trattamenti al vigneto e i fattori biotici.

Diversi studi riportano che la composizione della popolazione microbica dipende da condizioni climatiche, come la temperatura, l'esposizione ai raggi UV, la pioggia, la luce solare e il vento. Bisogna anche considerare le differenze microclimatiche esistenti sia tra le diverse vigne che all'interno dello stesso vigneto. Ad esempio, la posizione della pianta all'interno della vigna determina delle differenze nel livello d'irradiazione solare che raggiunge i grappoli d'uva, influenzando non solo la presenza, ma anche la prevalenza numerica di lieviti pigmentati, come quelli appartenenti ai generi *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Rhodosporidium*. Studi recenti hanno dimostrato che la variabilità all'interno del vigneto svolge un ruolo significativo, e, talvolta maggiore, delle differenze esistenti tra i diversi vigneti.

Sebbene siano disponibili dati scientifici, i risultati riportati sono spesso contrastanti. Alcuni studi riportano che le piogge abbondanti determinano un incremento della popolazione microbica del grappolo, probabilmente in seguito all'aumento della disponibilità di nutrienti. Infatti, grazie ai fenomeni di esosmosi, l'acqua presente sulle superfici della pianta induce il rilascio di piccole quantità di nutrienti e altre sostanze. Anche l'aumento di volume dell'acino porta al rilascio di soluzione zuccherina in seguito a lacerazioni e al distacco delle zone di giunzione, come quella tra peduncolo e acino.

Al contrario, altre ricerche hanno trovato popolazioni microbiche molto più basse (fino a 10 volte inferiori) in annate con abbondanti piogge, mentre altre cariche microbiche elevate in stagioni calde e secche. Le pratiche agronomiche (fertilizzazione, irriga-

zione e gestione del vigneto) e l'impiego di prodotti chimici, quali fungicidi e insetticidi, influenzano sia il numero che la biodiversità del microbiota delle uve, sebbene, anche in questo caso, i risultati ottenuti non sono univoci. In genere, sembra che la persistenza dei fungicidi sulle uve possa influenzare negativamente l'ecologia delle comunità dei lieviti coinvolti nella fermentazione.

Ricerche recenti, indirizzate a valutare le differenze nella popolazione microbica delle uve provenienti da sistemi di coltivazione convenzionali e biologici, hanno dimostrato l'esistenza di una maggiore biodiversità in caso di coltivazione biologica, sia per *S. cerevisiae* che per i lieviti non-*Saccharomyces*.

È ben noto che gli insetti influenzano il microbiota dell'uva mediante diversi meccanismi. In primo luogo, attaccando gli acini e causando la fuoriuscita del succo, determinano un incremento della popolazione microbica. Inoltre, gli insetti (in particolare *Drosophila* o moscerino della frutta) fungono anche da vettori di microrganismi, sia di lieviti (apiculati, *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens*, *Metschnikowia pulcherrima* e altri) che batteri (lattici ed acetici). Recentemente, nel becco e nella parte iniziale del tratto digestivo di uccelli sono stati ritrovati diversi lieviti frequentemente associati alle uve, come *Hanseniaspora uvarum*.

I meccanismi di interazione tra la popolazione microbica residente sulle uve, quali la produzione di tossine killer, sostanze ad attività antibiotica e molecole coinvolte nei meccanismi di *quorum sensing*, sembrano influenzare la diversità di queste popolazioni.

Altri fattori, quali la varietà e il grado di maturazione dell'uva; la posizione dell'acino nel grappolo; lo spessore e la composizione dello strato ceroso presente sugli acini influenzano la composizione del microbiota delle uve.

La superficie dell'acino è ricoperta da uno strato di pruina che incide sull'adesione dei microrganismi e sulla loro capacità di colonizzare la superficie. Studi

## 1. La fermentazione spontanea

effettuati per valutare la distribuzione dei lieviti sulla superficie della bacca e nel grappolo hanno messo in evidenza che la zona vicino al peduncolo costituisce un substrato favorevole per i lieviti, e gli acini che circondano quest'area ospitano una popolazione da 10 a 100 volte più alta di quella presente nella parte centrale e inferiore del grappolo. Inoltre, ricerche condotte con l'ausilio del microscopio elettronico a scansione hanno evidenziato che la concentrazione dei lieviti è maggiore in quelle zone dell'acino dove il succo può fuoriuscire più facilmente.

Le attrezzature, i macchinari e i contenitori utilizzati durante la raccolta dell'uva, non adeguatamente puliti, possono rappresentare delle fonti e dei siti di proliferazione di molte specie di lievito. Di conseguenza, i grappoli ed il succo possono essere contaminati prima di raggiungere le cantine.

### 1.3.2 Fattori che determinano la predominanza di specie non-*Saccharomyces* sugli acini d'uva

Non sono ancora del tutto note le ragioni per cui alcune specie di lievito (ad esempio *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia*) siano predominanti sulle uve, mentre altre (come *S. cerevisiae*) siano assenti o ritrovate con frequenze molto basse. I fattori che potrebbero spiegare la diversa frequenza delle specie sono rappresentati da:

- compatibilità per fattori di tipo fisiologico e biochimico delle diverse specie con la composizione chimica della superficie delle uve (ad esempio l'adesione alla superficie delle uve e la capacità di metabolizzare i composti presenti);
- tolleranza nei confronti di stress ambientali, come la temperatura, l'irradiazione, la luce solare, la siccità;
- tolleranza verso sostanze inibitorie di natura chimica, provenienti dal grappolo stesso oppure ritrovate in seguito all'impiego di composti chimici in agricoltura;
- fenomeni di interazione con altre specie (lieviti, batteri e funghi filamentosi). Anche le interazioni lievito-lievito potrebbero svolgere un ruolo importante, sebbene i meccanismi alla base di questo tipo di interazione non siano stati finora chiariti. Alcuni studi riportano che il lievito *M. pulcherrima*, molto frequente sulle uve, svolge un'azione inibitrice nei confronti di numerosi microrganismi, quali funghi filamentosi, lieviti e batteri, a seguito della produzione di un pigmento insolubile (pulcherrimina), che impoverisce il mezzo di ferro. Studi recenti hanno dimostrato che quest'attività antimicrobica di *M. pulcherrima* non

viene esercitata su *S. cerevisiae*, probabilmente in seguito alla presenza di fattori trascrizionali che aumentano il livello di espressione dei geni regolatori per il ferro.

## 1.4 Lieviti del mosto d'uva

La composizione dei lieviti presenti nel mosto d'uva è direttamente correlata al microbiota presente sulle uve. Nonostante ciò, nel mosto d'uva si ritrova un numero di specie di lievito maggiore di quello solitamente ritrovato sulle uve, a seguito del contributo esercitato dalle specie di lievito presenti sulle attrezzature e nell'ambiente di cantina. Comunque, le superfici di cantina svolgono un ruolo minore come fonte di lieviti non-*Saccharomyces* rispetto alle uve poiché su queste superfici *S. cerevisiae* rappresenta il lievito dominante. Inoltre, le pratiche di sanificazione utilizzate nelle moderne aziende vinicole dovrebbero mirare alla massima riduzione della contaminazione del mosto ad opera della cosiddetta "microflora residente della cantina". In conseguenza di ciò, nel mosto ci si aspetta di ritrovare, come microflora dominante, la stessa presente sulle uve.

I lieviti non-*Saccharomyces* presenti nel mosto e di cui si parlerà estesamente nel capitolo 7 possono essere suddivisi in tre categorie principali:

- lieviti dotati di metabolismo ossidativo; tra questi ricordiamo *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *M. pulcherrima* e *Cryptococcus albidus*;
- i lieviti apiculati, caratterizzati da una debole attività fermentativa, come *K. apiculata* (*H. uvarum*);
- lieviti caratterizzati da metabolismo fermentativo, come *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora* spp. e *Zygosaccharomyces* spp..

I lieviti non-*Saccharomyces* isolati dalle superfici delle cantine appartengono alle specie *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranifaciens*, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e, meno frequentemente, *Rhodotorula* spp., *A. pullulans*, *Trichosporon cutaneum*, *Debaryomyces hansenii*, *K. apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii* e *M. pulcherrima*. Studi hanno dimostrato che sia la quantità che la tipologia di lieviti ritrovati sulle attrezzature di cantina sono correlati alla tipologia di prodotti impiegati per la sanificazione. È comunque importante sottolineare che la sanificazione della cantina prima del conferimento delle uve non elimina del tutto i lieviti presenti, per cui questi lieviti "residenti" possono entrare a far parte del processo di vinificazione. Alcuni di essi

(ad esempio *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii*, *A. pullulans*) sono aerobi obbligati, per cui non riescono a svilupparsi durante la fermentazione. Altre specie, caratterizzate da un metabolismo aerobico o da una debole attività fermentativa (ad esempio *P. membranifaciens*, *W. anomalus* e *Candida* spp.) è ben noto che, se non vengono utilizzate procedure atte ad impedirne lo sviluppo (un livello di solfitazione insufficiente), possono non solo prendere parte al processo fermentativo, ma anche determinare delle alterazioni della qualità finale del vino (formazione di film sulla superficie del vino finito). Per quanto riguarda *Saccharomyces*, è ben noto che sia sulle uve che sul mosto questi lieviti sono presenti con cariche molto basse e in basse frequenza.

#### 1.4.1 Fattori che influenzano il microbiota indigeno del mosto d'uva

Il mosto d'uva è un mezzo nutritivo molto ricco e adatto allo sviluppo dei lieviti in genere, poiché contiene tutti gli elementi necessari alla crescita di questi microrganismi e in forma utilizzabile (zuccheri monosaccaridi facilmente fermentescibili, quali il glucosio e il fruttosio, in quantità piuttosto elevata; fosfati, solfati, composti del potassio, del magnesio, del calcio; fattori di accrescimento, cioè vitamine idrosolubili, quali la biotina, acido pantotenico, piridossina, tiamina, ecc.). Nonostante questo substrato costituisca un mezzo nutritivo relativamente completo, alcune sue caratteristiche chimico-fisiche, come il basso valore di pH (3-3,5), l'elevata concentrazione di zuccheri (rappresentati da una miscela equimolare di glucosio e fruttosio) esercitano una forte pressione selettiva sui microrganismi. Di conseguenza, solo poche specie di lieviti e batteri possono proliferare. Inoltre, l'aggiunta di anidride solforosa svolge un'ulteriore azione selettiva, inibendo

in particolar modo i microrganismi ossidativi indesiderati.

I fattori che influenzano la composizione del microbiota del mosto sono direttamente correlati a quelli che influenzano il microbiota autoctono dell'uva e della cantina; a questi fattori se ne aggiungono altri, rappresentati da:

- il metodo di raccolta delle uve (manuale o meccanica);
- il trasporto dell'uva dal vigneto alla cantina (distanza/tempo, temperatura iniziale dell'uva, temperatura atmosferica, aggiunta di solfiti);
- le caratteristiche iniziali dell'uva; in questo contesto assumono notevole importanza le condizioni in cui viene mantenuta l'uva prima della pigiatura (tempo di sosta e temperatura a cui viene conservata, eventuale aggiunta di solfiti);
- i pretrattamenti che vengono effettuati sul mosto (aerazione, trattamento con enzimi, addizione di solfito, metodo di chiarificazione, temperatura, inoculo di colture *starter*).

## 1.5 Evoluzione dei lieviti nella fermentazione spontanea

La trasformazione del mosto in vino è un processo polimicrobico in cui le diverse specie di lievito, presenti prima sull'uva e poi nel mosto si sviluppano contemporaneamente o si susseguono durante il processo fermentativo. La figura 1.2 riporta immagini al microscopio di un campione di mosto nelle prime fasi della fermentazione spontanea, da cui si nota la presenza di lieviti con diverse morfologie cellulari.

La conoscenza dell'evoluzione dei lieviti nel corso

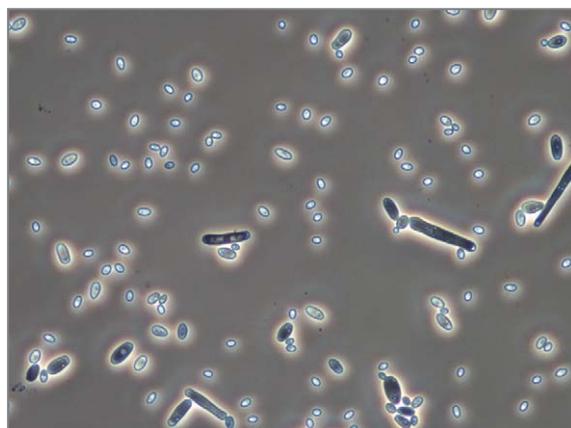
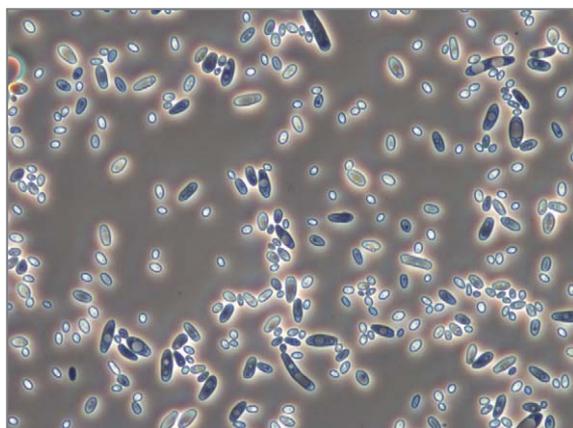


Figura 1.2 - Immagini al microscopio di cellule di lievito presenti in un campione di mosto in fermentazione (fase iniziale).

## 1. La fermentazione spontanea

della fermentazione alcolica è importante per il controllo della fermentazione stessa e per garantire un prodotto finito di qualità.

Ecologicamente l'intero processo prevede lo sviluppo sequenziale di alcune specie di lieviti, che verranno man mano sostituite con altre più adatte alle condizioni che si vanno creando, fino a quando non saranno raggiunte delle condizioni tali da permettere lo sviluppo solo di poche specie, in prevalenza *S. cerevisiae*.

Nelle prime fasi della fermentazione alcolica predominano lieviti caratterizzati da una debole attività fermentativa, appartenenti ai generi *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. Nella maggior parte dei casi, i lieviti apiculati (*H. uvarum*) e *C. stellata* sono quelli ritrovati con maggior frequenza all'inizio della fermentazione. In figura 1.3 si osserva l'evoluzione delle specie *H. uvarum*, *C. stellata* e *S. cerevisiae* durante la fermentazione spontanea di mosto Nero d'Avola. Come atteso, con il procedere della fermentazione si assiste alla diminuzione dei lieviti non-*Saccharomyces*, con la predominanza di *S. cerevisiae* al termine del processo.

In alcuni casi, quali fermentazioni condotte utilizzando mosto con un'elevata concentrazione zuccherina (situazione che si può verificare nel caso siano impiegate uve molto mature), altri lieviti apiculati, come *Hanseniaspora osmophila*, sono risultati prevalenti su *H. uvarum* e *C. stellata*.

In questa fase, queste specie di lievito hanno utilizzato parte degli zuccheri ed aminoacidi del mosto, in quantità sufficienti per produrre una serie di composti secondari, che influenzano fortemente la qualità finale del vino. I lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono in maniera significativa alla fermentazione, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a  $10^6$ - $10^7$  cellule/ml. Si pensa che queste alte popolazioni influenzino la composizione del vino così come lo sviluppo di *Saccharomyces*, dal momento che i cambiamenti chimici del vino prodotti dai lieviti non-*Saccharomyces* influenzano sia la cinetica di crescita che il metabolismo dei lieviti *Saccharomyces*.

Con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consenten-

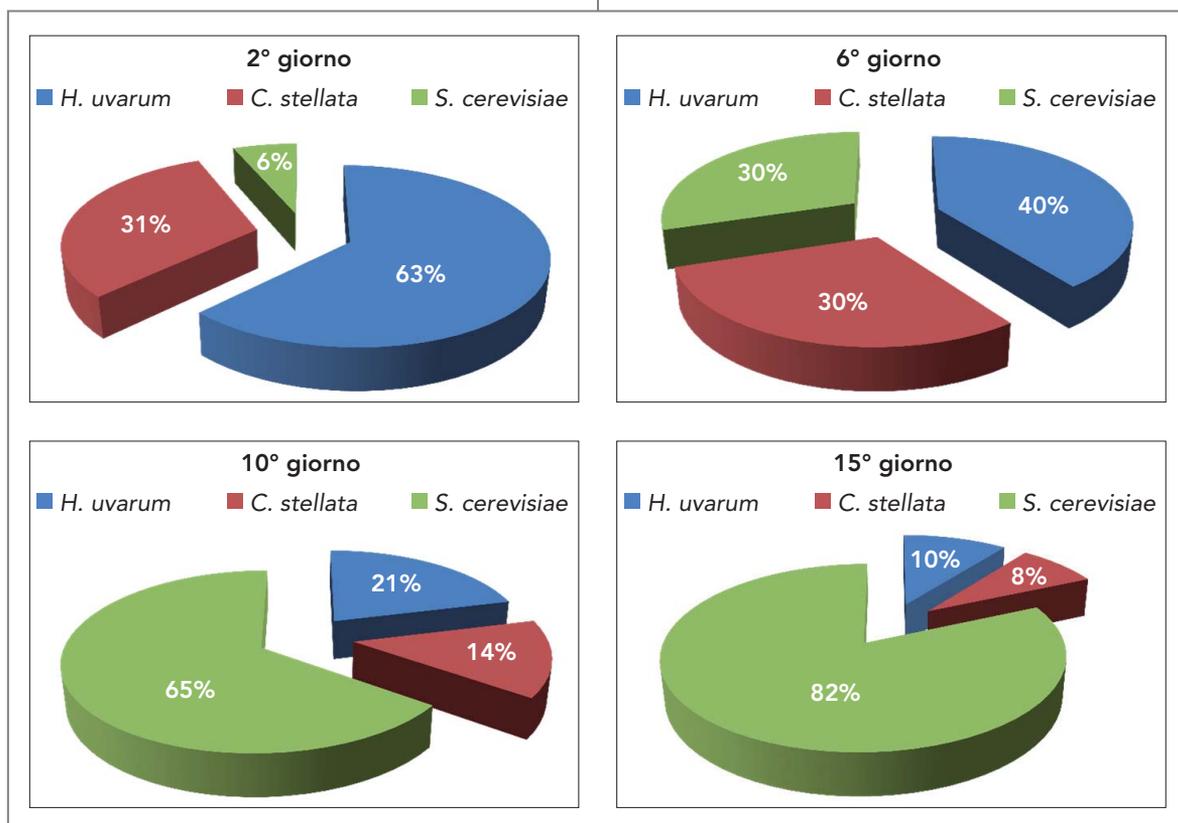


Figura 1.3 - Evoluzione delle specie *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata* e *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentazione spontanea di mosto Nero d'Avola.

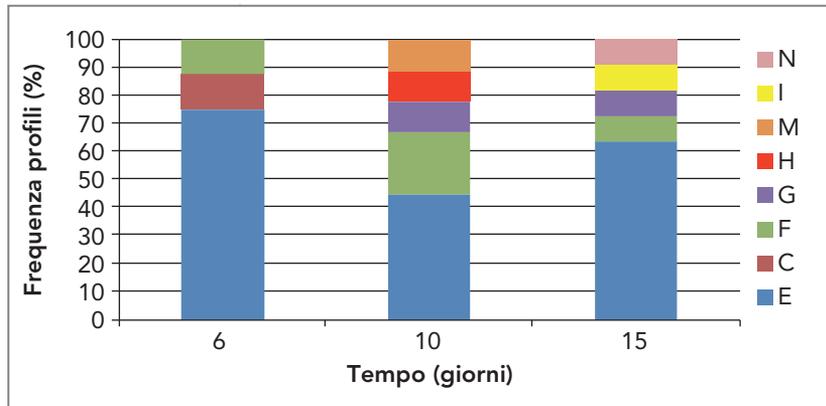


Figura 1.4 - Distribuzione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* nelle diverse fasi di una fermentazione spontanea.

do in tal modo ai lieviti *Saccharomyces*, dotati di un maggiore potere alcoligeno, di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo. I lieviti più alcoligeni sono quelli sporigeni e fra questi, in particolare, i ceppi vinari della specie *S. cerevisiae*, che per la maggior parte esibiscono potere fermentativo superiore a 14% di etanolo.

Oltre a *S. cerevisiae*, poche altre specie hanno la possibilità di intervenire nelle ultime fasi della fermentazione e in quelle centrali, in quanto dotate di un discreto potere alcoligeno; si tratta di *Torulaspora delbrueckii* e *Z. bailii* e varie specie del genere *Schizosaccharomyces* (*Schiz. pombe*, *Schiz. japonicus*). Inoltre, è stato dimostrato da diversi autori che *C. stellata* può tollerare una concentrazione di etanolo fino al 12%, fattore che spiega la significativa partecipazione di questa specie al processo fermentativo. Altri lieviti non rari, ma il cui intervento è del tutto marginale, sono rappresentati da *Saccharomyces ludwigii*, *M. pulcherrima* e alcune specie del genere *Brettanomyces*.

Al termine della fermentazione poi, se non viene impedito in qualche modo il contatto con l'aria, è inevitabile lo sviluppo dei lieviti della fioretta, rappresentati principalmente da *P. membranifaciens* e *Candida vini*; questi, come è ben noto, sono privi di attività fermentativa, formano veli superficiali spessi e fragili, si moltiplicano respirando l'alcol etilico e provocano una netta diminuzione del grado alcolico.

Bisogna sottolineare che durante la fermentazione si assiste ad uno sviluppo sequenziale non solo di diverse specie di lievito, ma anche, all'interno delle varie specie, di diversi ceppi. Questo sviluppo sequenziale di diversi ceppi è stato messo in evidenza grazie alla disponibilità di tecniche molecolari, che permettono di differenziare e riconoscere i diversi ceppi. Infatti, in una singola fermentazione sono stati ritrovati fino a dieci ed oltre ceppi di

*S. cerevisiae*. La figura 1.4 evidenzia l'esistenza di ceppi diversi di *S. cerevisiae* nelle diverse fasi di una fermentazione spontanea, con la comparsa di ceppi diversi nelle fasi finali della fermentazione. Risultati simili sono stati riscontrati anche per alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces*.

L'aumento della concentrazione di etanolo durante la fermentazione alcolica è uno dei fattori principali che determina lo sviluppo sequenziale dei diversi ceppi appartenenti alla stessa specie. Esiste una notevole variabilità nel livello di tolleranza all'etanolo tra ceppi di *S. cerevisiae* (Fig. 1.5), così come anche tra specie non-*Saccharomyces*, i ceppi caratterizzati dal maggior livello di tolleranza all'etanolo è molto probabile che predominino nelle fasi finali della fermentazione alcolica, piuttosto che all'inizio del processo.

Il quadro microbiologico sopra delineato presenta, in realtà, innumerevoli varianti, soprattutto sotto il profilo quantitativo, in quanto lo sviluppo e l'attività di ogni specie dipendono da numerosi fattori di natura chimica, fisica e biologica, che interagiscono tra loro. È dunque facile intuire che la tipologia delle specie presenti e la loro abbondanza all'inizio del processo fermentativo, la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna popolazione siano tutti elementi in grado di incidere, anche fortemente, sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finale.

### 1.5.1 Fattori che influenzano l'evoluzione dei lieviti in vinificazione

I fattori che influenzano la presenza e lo sviluppo dei lieviti durante la fermentazione alcolica sono numerosi. Tra questi ricordiamo la composizione iniziale della popolazione e la variabilità di specie, presenti nel mosto d'uva; l'inoculo del mosto con colture *starter* selezionate; la composizione chimica

## 1. La fermentazione spontanea

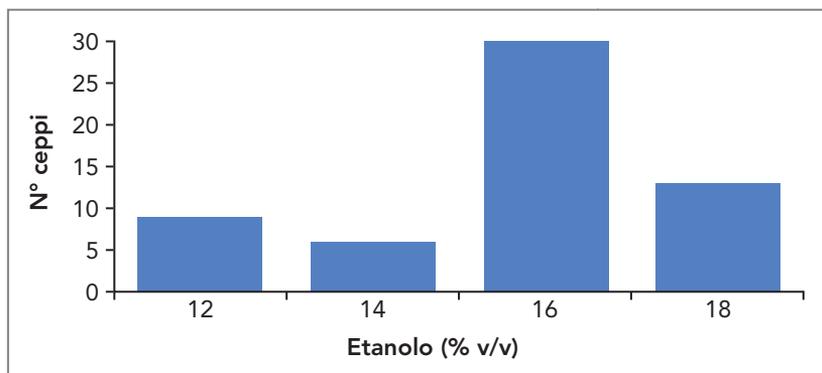


Figura 1.5 - Tolleranza all'etanolo (% v/v) in ceppi indigeni di *Saccharomyces cerevisiae*.

del mosto (presenza di residui di fungicidi/pesticidi); parametri correlati alla tecnologia di vinificazione, tra cui l'aggiunta di anidride solforosa e la temperatura di vinificazione, le interazioni esistenti tra i lieviti, sia tra le diverse specie che tra i diversi ceppi. Le caratteristiche tecnologiche sono alla base del meccanismo di successione dei diversi generi, ma anche delle specie e dei ceppi di lievito. Va rilevato che i lieviti vinari delle diverse specie sono dotati delle stesse caratteristiche, ma ciò che li differenzia in modo sostanziale è il livello di espressione dello stesso parametro.

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

- fattori di natura chimica: nutrienti, zuccheri, anidride solforosa, composti dell'azoto, ossigeno, vitamine, elementi minerali, acidi organici, metaboliti, etanolo, CO<sub>2</sub>, acidi organici;
- fattori di natura fisica: temperatura, pressione osmotica;
- fattori di natura biologica: composizione della popolazione iniziale, interazioni con altri microrganismi.

La tabella 1.1 riassume la distribuzione dei diversi lieviti dell'uva e della fermentazione spontanea, con indicazione dei gruppi principali coinvolti e dei fattori che ne influenzano l'evoluzione.

Tabella 1.1 - Lieviti dell'uva e della fermentazione spontanea: gruppi principali e fattori che ne influenzano l'evoluzione.

Habitat	Principali lieviti presenti	Fattori principali
Grappolo	<i>Torulopsis, Cryptococcus, Rhodotorula, Candida, Aureobasidium, Sporobolomyces, Filobasidium, Rhodosporidium, Hanseniaspora, Metschnikowia, Debaryomyces, Dekkera, Issatchenkia, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Sporidiobolus, Torulaspora, Zygosaccharomyces</i>	Condizioni climatiche, trattamenti al vigneto, fattori biotici (insetti, interazioni tra popolazioni microbiche), grado di maturazione dell'uva, posizione dell'acino, igiene delle attrezzature di raccolta.
Mosto d'uva	<i>Hanseniaspora, Pichia, Debaryomyces, Rhodotorula, Candida, Cryptococcus, Kluyveromyces, Torulaspora, Zygosaccharomyces, Metschnikowia</i>	Metodo di raccolta delle uve, trasporto dell'uva, caratteristiche iniziali dell'uva, pre-trattamenti al mosto (aerazione, trattamento con enzimi, addizione di solfiti, metodo di chiarificazione, temperatura, inoculo di colture starter).
Fermentazione spontanea	<i>Candida, Hanseniaspora, Pichia, Rhodotorula, Issatchenkia, Kluyveromyces, Saccharomyces, Torulaspora, Zygosaccharomyces, Schizosaccharomyces</i>	Fattori di natura chimica: nutrienti, anidride solforosa, ossigeno, acidi organici, metaboliti, etanolo, anidride carbonica. Fattori di natura fisica: temperatura, pressione osmotica. Fattori di natura biologica: composizione della popolazione iniziale, interazioni con altri microrganismi.

### 1.5.1.1 Fattori di natura chimica

**Etanolo.** La dinamica di popolazione nella fermentazione spontanea ha come carattere tecnologico selettivo principale l'alcol-tolleranza; infatti, è largamente riconosciuto che la successione dei lieviti che si sviluppano nel corso della fermentazione è fortemente correlata alla bassa tolleranza all'etanolo dei lieviti non-*Saccharomyces*. La produzione di etanolo da parte delle diverse specie vinarie è molto variabile ed è legata principalmente alla loro tolleranza nei confronti di questo composto. La produzione di etanolo ad opera di *S. cerevisiae* è il fattore principale che condiziona lo sviluppo e l'influenza dei lieviti non-*Saccharomyces* durante la fermentazione. In genere, le specie di *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia*, predominanti nel mosto d'uva, non sono in grado di tollerare concentrazioni di etanolo superiori al 5-7%, per cui non riescono a svilupparsi nelle fasi centrali e finali della fermentazione, quando la concentrazione di etanolo supera questi livelli. Sembra che le basse temperature diminuiscano la sensibilità di queste specie all'etanolo, per cui, in fermentazioni vinarie condotte a temperature inferiori a 15-20 °C (10-15 °C) le specie di *Hanseniaspora* e *Candida* potrebbero influenzare maggiormente il processo fermentativo. In queste condizioni, infatti, queste specie possono essere ritrovate anche al termine della fermentazione, insieme a *S. cerevisiae*, esercitando così un'importante influenza sull'aroma del vino.

**Ossigeno.** Un altro parametro che svolge un ruolo di primaria importanza nell'evoluzione delle diverse specie di lievito è rappresentato dall'ossigeno. Durante la fermentazione alcolica del vino, nel mosto vengono a crearsi condizioni di bassissime concentrazioni di ossigeno. Alcuni studi hanno dimostrato che *S. cerevisiae* è in grado di svilupparsi rapidamente anche in condizioni anaerobiche, mentre altre specie, come *Hanseniaspora* e *Torulaspora*, crescono molto lentamente in assenza di ossigeno. Tali evidenze hanno portato a pensare che la successione dei lieviti durante la fermentazione sia correlata, oltre che alla bassa resistenza all'etanolo dei lieviti non-*Saccharomyces*, anche alla scarsa tolleranza mostrata da questi lieviti nei confronti delle basse concentrazioni di ossigeno, presenti nel mezzo di crescita. La rimozione di ossigeno dal mosto in fermentazione, dovuta al vigoroso sviluppo di *S. cerevisiae*, potrebbe contribuire alla rapida scomparsa dei lieviti non-*Saccharomyces*. Questa ipotesi sarebbe, inoltre, supportata da risultati ottenuti da fermentazioni allestite inoculando il mosto con una coltura starter mista di *Hanseniaspora valbyensis* e *S. cerevisiae*. Tali

studi hanno dimostrato che, durante la fermentazione mista, l'ossigeno è in grado di incrementare il periodo di coesistenza fra *H. valbyensis* e *S. cerevisiae*, riducendo la velocità di morte di *H. valbyensis*.

**Anidride solforosa (SO<sub>2</sub>).** La composizione del microbiota presente durante la fermentazione spontanea può essere controllata mediante l'aggiunta di SO<sub>2</sub> al mosto d'uva. La SO<sub>2</sub> è un composto altamente tossico per la maggior parte dei lieviti non-*Saccharomyces* presenti nelle fasi iniziali della fermentazione, mentre la tolleranza di *S. cerevisiae* nei confronti di questo composto è piuttosto elevata. Il livello di sensibilità delle diverse specie a questa sostanza antimicrobica è abbastanza variabile. In genere, *H. uvarum* viene inibita da concentrazioni inferiori a 5 mg/l di SO<sub>2</sub> libera, mentre specie di *Candida* e *Zygosaccharomyces* possono tollerare concentrazioni fino a dieci volte maggiori di questa.

**Composti dell'azoto.** Al contrario degli zuccheri, le sostanze azotate sono presenti in quantità estremamente variabile, in funzione di fattori legati all'ambiente, al vitigno, alla conduzione del vigneto e alla tecnologia di ammostatura e di eventuale chiarifica del mosto. Frequentemente il contenuto in azoto del mosto è insufficiente a sostenere il fabbisogno delle cellule di lievito. L'azoto è indispensabile in alcuni fondamentali processi biosintetici, in particolar modo durante la moltiplicazione cellulare e la biosintesi di proteine in cellule non in attiva crescita (vedi capitolo 4). La carenza di azoto è un fattore limitante che induce un prematuro arresto della moltiplicazione e della fermentazione, in seguito all'arresto del trasporto degli zuccheri attraverso la membrana cellulare, per cui è necessario tenere conto del reale fabbisogno del lievito ed effettuare eventuali integrazioni, che devono essere calibrate, sia in termini quantitativi che qualitativi, per evitare inconvenienti quali:

- produzione di sostanze indesiderate (come il carbammato di etile);
- un'eccessiva accelerazione della fermentazione nelle fasi precoci, con rischio di rallentamento nelle fasi tardive.

**Nutrienti.** La disponibilità di nutrienti, o la loro carenza, rappresentano fattori che possono influenzare l'ecologia dei lieviti durante la fermentazione, poiché alcuni lieviti possono produrre o utilizzare sostanze nutritive che sono fondamentali per lo sviluppo di altri lieviti. I lieviti non-*Saccharomyces* che sviluppano nelle prime fasi della fermentazione possono utilizzare gli aminoacidi e le vitamine presenti

## 1. La fermentazione spontanea

nel mosto d'uva, determinando un impoverimento del mezzo di fermentazione, che potrebbe rallentare il successivo sviluppo di *S. cerevisiae*. Diversi studi riportano che *K. apiculata* consuma la tiamina e altri micronutrienti presenti nel mosto d'uva, causando un rallentamento nello sviluppo di *S. cerevisiae*. Al contrario, l'attività proteolitica di cui sono in possesso alcune specie non-*Saccharomyces*, come *K. apiculata* e *M. pulcherrima*, può rendere disponibili nel mosto alcuni aminoacidi, che possono essere utilizzati da *S. cerevisiae*. La morte di questi lieviti nelle prime fasi di fermentazione, seguita dalla loro attività di autolisi, rappresentano un'ulteriore fonte di sostanze nutritive per lo sviluppo di *S. cerevisiae* e dei lieviti contaminanti del vino.

**Elementi minerali.** Il fosforo è normalmente assimilato sotto forma di fosfati e generalmente è presente nei mosti d'uva in quantità sufficiente; comunque, un apporto in fosfati determina un incremento dell'attività fermentativa. Altro elemento importante è il potassio, che, se presente in quantità adeguate, può dare origine a cellule con una migliore vitalità e una maggior resistenza all'etanolo, mentre la sua carenza, associata a un basso pH, causa arresti di fermentazione. Il magnesio svolge un ruolo centrale nel catabolismo degli zuccheri, è necessario per la crescita cellulare e incrementa la produzione di etanolo. Inoltre, migliora la vitalità e la resistenza delle cellule a condizioni di stress ambientali (elevate concentrazioni di etanolo, pressione osmotica, alte temperature, azione tossica di metalli pesanti). I microelementi (zinco, manganese, rame) sono importanti come cofattori di enzimi, mentre ad alte concentrazioni possono risultare tossici.

**Anidride carbonica (CO<sub>2</sub>).** È un gas particolarmente solubile nelle soluzioni acquose per cui nel corso della vinificazione si osserva una rapida saturazione del mosto in fermentazione. Lo sviluppo di CO<sub>2</sub> inibisce il dissolvimento nel mosto dell'ossigeno dell'aria, causando il rapido instaurarsi della condizione di anaerobiosi già ad inizio fermentazione. Nelle fasi finali del processo (produzione lenta di CO<sub>2</sub>), si osserva un aumento dell'ossigeno disciolto. Durante il processo di fermentazione, una sovraturazione (anche minima) di CO<sub>2</sub> induce nei lieviti:

- inibizione della crescita cellulare;
- perdita di vitalità;
- diminuzione del tasso di fermentazione.

### 1.5.1.2 Fattori di natura fisica

**Temperatura.** Il tasso di crescita dei lieviti aumen-

ta all'aumentare della temperatura fino a circa 30 °C, dopodiché si osserva una brusca inversione di tendenza e a circa 35 °C si verifica il blocco delle divisioni cellulari. In fermentazione, all'aumentare della temperatura il processo è più rapido, ma oltre i 35 °C si ha:

- rallentamento della fermentazione;
- riduzione della concentrazione di etanolo prodotto;
- aumento della concentrazione di metaboliti secondari (glicerolo, in particolare).

La temperatura, insieme con l'aggiunta di SO<sub>2</sub>, rappresentano i due fattori che influenzano maggiormente l'attività dei lieviti non-*Saccharomyces*. Alcuni di questi lieviti sono inibiti a temperature superiori a 25 °C, per cui la diminuzione della temperatura può determinare una maggiore partecipazione delle specie non-*Saccharomyces*, quali ad esempio *K. apiculata* che fermenta meglio a 10 °C, anziché a 25 °C. Il maggiore contributo di questi lieviti al processo fermentativo influenzerà, di conseguenza, la concentrazione di composti aromatici, con notevole impatto sulla qualità finale del vino.

**Pressione osmotica.** La concentrazione degli zuccheri fermentescibili del mosto d'uva è compresa tra 125 e 250 g/l. La concentrazione iniziale di glucosio e fruttosio influenza la composizione della popolazione di lieviti che sviluppa durante la fermentazione. In seguito ai cambiamenti climatici, si è osservato un aumento della concentrazione di glucosio e fruttosio del mosto. Mosti con concentrazioni zuccherine elevate causano fermentazioni stentate o che non vengono portate a termine, con produzione di vino contenente un residuo zuccherino, a causa dello stress iperosmotico a cui sono sottoposte le cellule in queste condizioni.

### 1.5.1.3 Fattori di natura biologica

**Composizione della popolazione iniziale.** Un altro fattore che influisce sull'andamento della fermentazione spontanea è il rapporto numerico esistente, al momento del riempimento finale dei vasi vinari, tra lieviti non-*Saccharomyces* e lieviti *Saccharomyces*. Tale parametro influenza principalmente la durata dell'intervallo di tempo necessario ai lieviti *Saccharomyces* per assumere il controllo della fermentazione e diventare dominanti. Tale intervallo risulterà tanto maggiore quanto più elevato è il rapporto fra lieviti non-*Saccharomyces* e lieviti *Saccharomyces*.

Tra i fattori che influenzano la percentuale di dominanza tra *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*,

la tipologia di cantina potrebbe giocare un ruolo importante. Infatti, in uno studio condotto analizzando per sei anni consecutivi l'evoluzione della popolazione di lieviti durante fermentazioni vinarie condotte in una cantina di nuova costruzione, è stata osservata una variazione nella composizione della flora microbica nel corso degli anni. Nelle prime 3-4 vendemmie, le specie non-*Saccharomyces* sopravvivevano per 2-6 giorni, riuscendo a competere con i ceppi di *Saccharomyces*. Dopo la quarta vendemmia, la presenza dei lieviti non-*Saccharomyces* si era significativamente ridotta e la loro dominanza era limitata solo ai primi giorni di fermentazione. Secondo gli autori dello studio, le motivazioni per spiegare queste variazioni sono molteplici. Innanzitutto, si trattava di una cantina di nuova costruzione, per cui nei primi anni in cui è stato condotto lo studio né in cantina né sulle attrezzature impiegate era presente la cosiddetta "microflora residente", costituita da quei microrganismi che dopo diverse vendemmie e, quindi fermentazioni, permangono sia sulle attrezzature che sulle pareti della cantina, adattandosi all'ambiente. Tra questa microflora residente, predominano ceppi diversi di *Saccharomyces*, che prendono il sopravvento sul microbiota del mosto d'uva, avviando e guidando il processo fermentativo. In secondo luogo, nelle diverse vendemmie in cantina erano stati utilizzati come *starter* diversi ceppi commerciali di *Saccharomyces*. È ben noto che gli *starter* sono ceppi selezionati, ben adattati alle condizioni di vinificazione, per cui la presenza di questi ceppi selezionati che permangono in cantina da un anno all'altro potrebbe spiegare la rapida predominanza di *Saccharomyces* sui lieviti non-*Saccharomyces*, osservata dopo il quarto anno. In conclusione, la presenza di ceppi di *Saccharomyces*, sia indigeni che commerciali, residenti nell'ambiente di cantina, potrebbe spiegare la rapida predominanza di questi lieviti già dalle prime fasi della fermentazione, osservata a partire dalla quarta vendemmia.

**Interazioni con altri microrganismi.** Lo sviluppo di diverse specie di lieviti durante la fermentazione alcolica spontanea è modulato dalle interazioni che si possono instaurare tra i diversi microrganismi (batteri e lieviti).

Per quanto riguarda l'interazione lieviti-batteri, l'elevata competitività dei lieviti nel mosto d'uva determina l'inibizione quasi completa della crescita batterica durante la fermentazione. Durante la fase stazionaria dei lieviti, a seguito dell'impovertimento nutrizionale del fermentato e all'accumulo di metaboliti tossici, come etanolo e acidi grassi a media catena, si potrebbero verificare dei problemi dovuti

allo sviluppo dei batteri. Inoltre, lo sviluppo dei batteri è stimolato dalla lisi delle cellule di lievito, con liberazione di fattori nutrizionali utili per i batteri, come vitamine e sostanze azotate.

In questo caso, in assenza di fattori per il controllo dei batteri (basso pH,  $\text{SO}_2$  o, nel caso dei batteri aerobi come i batteri acetici, l'anaerobiosi), ci potrebbe essere sopravvento dei batteri ed inibizione dei lieviti, con arresto o rallentamento della fermentazione e accelerazione della fase di morte dei lieviti.

Nel caso di elevata concentrazione di batteri nel mosto, ci potrebbe essere l'inibizione sui lieviti anche in fase di crescita. Va rilevato che diversi batteri (acetici, batteri contaminanti) producono fattori di inibizione del lievito.

Durante la fermentazione i lieviti producono alcuni composti che possono svolgere un'azione inibitrice nei confronti di altre specie o altri ceppi di lievito. Oltre all'etanolo, altri metaboliti come gli acidi grassi a catena corta o media (tra cui gli acidi acetico, esanoico, ottanoico e decanoico) possono raggiungere concentrazioni tali da determinare la morte cellulare di alcune specie di lievito, tra cui anche alcuni ceppi di *S. cerevisiae*. Altri composti prodotti dai lieviti ad attività antimicrobica sono rappresentati da proteine, glicoproteine, acido acetico, acetaldeide,  $\text{SO}_2$ , tossine killer. Infatti, un altro meccanismo di inibizione che si può verificare durante la fermentazione vinaria è la cosiddetta attività killer dei lieviti. Questo fenomeno è dovuto alla produzione di specifiche glicoproteine extracellulari da parte di alcuni ceppi di lievito (detti ceppi killer) in grado di causare la morte di altri ceppi di lievito (detti ceppi sensibili). Ceppi in possesso dell'attività killer sono stati identificati all'interno di diversi generi di lieviti associati alla vinificazione, tra cui ricordiamo *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia* e *Cryptococcus*. Benché sia ampiamente dimostrato che molti parametri tecnologici correlati al processo di vinificazione possono influenzare l'espressione dei fenotipi correlati all'attività killer o alla sensibilità alla proteina killer, numerosi dati confermano che questi fenomeni esercitano una notevole influenza sull'evoluzione delle specie, e dei ceppi, di lievito durante la fermentazione. Ceppi killer di *S. cerevisiae* a volte sono risultati dominanti al termine del processo fermentativo, suggerendo che essi hanno esercitato la loro attività killer nei confronti degli altri lieviti, portando a termine la fermentazione (vedi par. 2.8 e 7.5).

Mentre ognuno di questi singoli fattori di inibizione può avere un'influenza variabile sullo sviluppo dei lieviti, la loro combinazione e soprattutto i mecca-

## 1. La fermentazione spontanea

nismi di interazione sinergica, possono svolgere un importante ruolo nell'inibizione di alcuni lieviti.

Alcuni studi riportano che altri fenomeni di interazione che influenzano la composizione del microbiota presente nella fermentazione spontanea del mosto d'uva sono dovuti alla presenza di molecole correlate ai fenomeni di *quorum sensing*. Questo meccanismo, che è stato ampiamente studiato nelle comunità batteriche, dove le cellule microbiche comunicano tra di loro e sono in grado di adattare la crescita della popolazione microbica, sembra che giochi un ruolo fondamentale anche nelle interazioni tra i lieviti durante la fermentazione vinaria. Sebbene sia stato ritrovato che nei lieviti alcune molecole, come l'acetaldeide e i cationi ammonio, siano coinvolte nei meccanismi di comunicazione tra i lieviti, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire il loro ruolo durante la fermentazione alcolica del mosto.

Recentemente è stato ritrovato che anche i meccanismi legati al contatto "cellula-cellula" sarebbero coinvolti nelle interazioni tra lieviti. Infatti, alcuni studiosi hanno ritrovato che concentrazioni elevate di cellule vitali di *S. cerevisiae* potrebbero svolgere un'azione inibitrice nei confronti di *T. delbrueckii*, determinando la rapida scomparsa di questa specie, attraverso meccanismi di contatto "cellula-cellula".

Altri ricercatori hanno ritrovato che quando un ceppo di *H. uvarum* era fatto sviluppare a stretto contatto con cellule vitali di *S. cerevisiae*, si osservava un rallentamento nello sviluppo del ceppo non-*Saccharomyces*, suggerendo ancora una volta l'esistenza di meccanismi di contatto "cellula-cellula".

In conclusione, diversi meccanismi sono stati finora suggeriti per spiegare i fenomeni di interazione tra lieviti, dalla competizione per il substrato (glucosio o ossigeno) fino alle ricerche più recenti, che suggeriscono l'esistenza dei meccanismi di contatto "cellula-cellula", ma l'importanza effettiva di questi diversi meccanismi nelle condizioni che si creano durante la vinificazione, va ancora chiarita completamente.

### 1.6 Conclusioni

Il vino è un prodotto complesso, frutto di numerose interazioni tra diversi microrganismi, ognuno dei quali apporta il proprio contributo alle caratteristiche finali del prodotto. Le interazioni iniziano nella vigna e continuano durante tutto il processo fermentativo e la conservazione del vino, influenzando sia in modo positivo che negativo l'aroma del vino. Il significato e il contributo dei lieviti indige-

ni alla qualità e all'efficienza del processo fermentativo richiederebbero una maggiore attenzione sia dal mondo della ricerca che dal mondo degli operatori del settore vitivinicolo. Inoltre, bisogna considerare le nuove problematiche insorte nel settore ambientale. L'uso continuo di composti fitosanitari in vigna non è più sostenibile, così i cambiamenti climatici avranno un effetto "a cascata" sulla coltivazione della vite, sulla composizione del mosto d'uva, influenzando considerevolmente l'ecologia dei lieviti coinvolti nella fermentazione spontanea, con conseguente effetto sulle cinetiche di fermentazione e sulle caratteristiche del vino.

In quest'ottica, la fermentazione spontanea, nonostante subisca cambiamenti correlati alle condizioni ambientali, rappresenta sempre una fonte di biodiversità microbica, nell'ambito della quale possono essere individuati i ceppi in possesso delle caratteristiche migliori.

## Bibliografia

BARATA A., MALFEITO-FERREIRA M., LOUREIRO V. (2012) – The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 243-259.

CAPECE A., FIORE C., MARAZ A., ROMANO P. (2005) – Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 136-144.

CAPECE A., SIESTO G., ROMANIELLO R., LAGRECA V.M., PIETRAFESA R., CALABRETTI A., ROMANO P. (2013) – Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT - Food Science and Technology*, 54: 485-492.

FLEET G. H. (2003) – Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11-22.

FRANCESCA N., CANALE D.E., SETTANNI L., MOSCHETTI G. (2012) – Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1): 105-112.

JOLLY N.P., AUGUSTYN O.P.H., PRETORIUS I.S. (2006) – The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1): 15-39.

MARTINS G., VALLANCE J., MERCIER A., ALBERTIN W., STAMATOPOULOS P., REY P., LONVAUD A., MASNEUF-POMARÈDE I. (2014) – Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177: 21-28.

OCÓN E., GUTIÉRREZ A.R., GARIJO P., LÓPEZ R., SANTAMARÍA P. (2010) – Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cel-

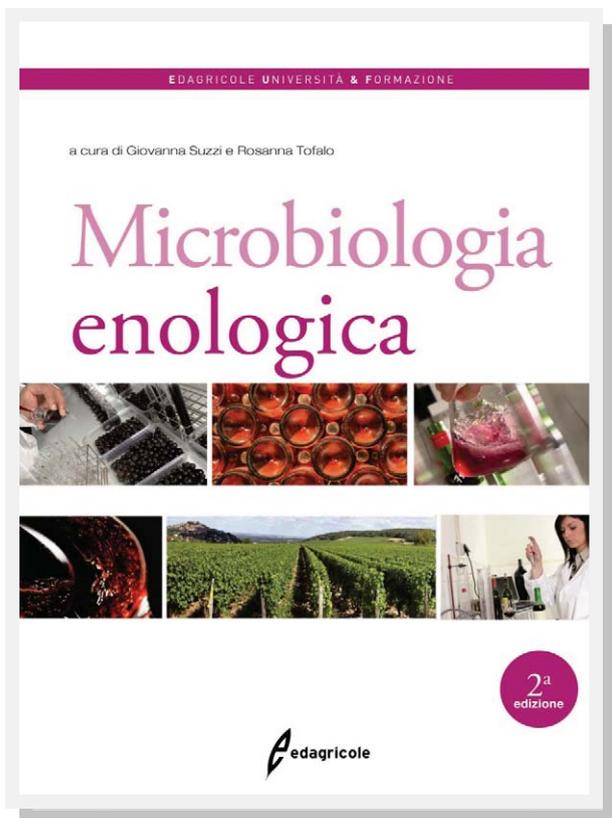
lar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*, 27: 1023-1027.

PRETORIUS I.S. (2000) – Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675-729.

ROMANO P., FIORE C., PARAGGIO M., CARUSO M., CAPECE

A. (2003) – Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169-180.

TOFALO R., SCHIRONE M., TELERA G.C., MANETTA A.C., CORSETTI A., SUZZI G. (2011) – Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Annals of Microbiology*, 61: 57-66.



**Clicca QUI per  
ACQUISTARE il libro ONLINE**

**Clicca QUI per scoprire tutti i  
LIBRI del catalogo EDAGRICOLE**

**Clicca QUI per avere maggiori  
INFORMAZIONI**