Consorzio Tuscania - Del. CIPE 35/2004-
Relazione scientifica 2008-2010

Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego di inoculi misti

linea di ricerca - B2

Paola Domizio, Livio Lencioni,
Cristina Romani
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
Sez. Tecnologie Alimentari
Università degli Studi di Firenze
Via Donizetti 6, 50144 Firenze

Maurizio Ciani, Francesca Comitini,
Mirko Gobbi
Dipartimento S.A.I.F.E.T.
Sez. Microbiologia Alimentare,
Industriale e Ambientale
Università Politecnica delle Marche
Via Brecce Bianche, 60131 Ancona

Ilaria Mannazzu
Dipartimento di Scienze Ambientali,
Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari,
Università degli Studi di Sassari
Viale Italia 39, 07100 Sassari

6 dicembre 2010

Indice generale

1. Stato dell'arte 4

1.1. Bibliografia 8

2. Obiettivo del programma di ricerca 14

3. Metodiche analitiche 15

4. Schema delle prove e risultati 20

4.1. I anno di ricerca 21
4.1.1. Reperimento ceppi e loro definizione tassonomica 21
4.1.2. Valutazione di alcuni caratteri enologici dei ceppi di lievito non-Saccharomyces 23
4.1.3. Valutazione dell'attitudine enologica dei ceppi di lievito mediante micro fermentazioni 27
4.1.4. Figure e tabelle I anno di ricerca 37
4.1.5. Conclusioni I anno sperimentazione 78
4.2. II anno di ricerca 81
4.2.1. Valutazione dell'attitudine enologica di 16 ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* inoculati in fermentazioni miste con lieviti *Saccharomyces*, mediante microfermentazioni su scala di laboratorio 81
4.2.2. Valutazione dell'attitudine enologica di 7 combinazioni di lieviti, mediante microvinificazioni su scala pilota 106
4.2.3. Figure e tabelle II anno di sperimentazione 110
4.2.4. Conclusioni II anno di sperimentazione 196
4.3. III anno di ricerca 201
4.3.1. Messa a punto di strumenti per il monitoraggio molecolare dei lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazione 201
4.3.2. Valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste su scala di laboratorio. 207

4.3.3. Valutazione dell'influenza della temperatura sulle fermentazioni miste condotte con i 2 ceppi di lievito selezionati.....213
4.3.4. Prove di vinificazione su scala semi-industriale 217
4.3.5. Figure e tabelle III anno di sperimentazione.....222
5. Conclusioni.....261
6. Pubblicazioni prodotte.....266

1. Stato dell'arte

E' noto che la qualità del vino è fortemente dipendente da quel complesso di sostanze che derivano dall'uva e dal metabolismo dei lieviti e batteri e che vanno a costituire il flavour del prodotto.
Molte vie di formazione del flavour del vino operano nello stesso tempo: processi chimici, attività enzimatiche dell'uva e quelle presenti nei lieviti e batteri modificano le sostanze (precursori) presenti nell'uva, fornendo flavour complessi che sono in grado di condizionare le caratteristiche percepibili dei vini. La possibilità di intervenire in modo specifico nella formazione del flavour, con azioni mirate e soprattutto salvaguardando il patrimonio compositivo dei vini, diventa per i produttori di vini un'esigenza fondamentale per il raggiungimento e mantenimento delle peculiarità dei propri prodotti. E' ormai noto che l'utilizzo di sostanze quali enzimi commerciali, agenti chiarificanti, etc. e di trattamenti termici come la stabilizzazione a freddo, usati per migliorare e stabilizzare le caratteristiche dei vini, possono determinare, oltre agli effetti voluti, altre modificazioni indesiderate. Queste ultime si traducono in perdita dei caratteri di peculiarità e in appiattimento dei prodotti. A tale proposito, interventi più specifici e mirati, come ad esempio l'impiego di starter di fermentazione con peculiari attività enzimatiche e differenti modalità di fermentazione, costituiscono strumenti innovativi per conseguire e salvaguardare la qualità dei vini.
Per migliorare le caratteristiche sensoriali del vino ed evitare allo stesso tempo la proliferazione di lieviti alterativi, è d'altra parte indispensabile il controllo della crescita microbica durante il processo di vinificazione. Attualmente, il pronto avvio della fermentazione alcolica e la produzione di vini che garantiscano nel tempo la costanza qualitativa si ottengono mediante l'addizione di SO_2 e il

successivo utilizzo di colture selezionate di *Saccharomyces cerevisiae*.

L'uso ormai costante e generalizzato negli ultimi anni di colture selezionate di *S. cerevisiae,* se da una parte rende sufficientemente sicuro il decorso fermentativo, dall'altra provoca l'inibizione di tutti quei microrganismi che potrebbero, in misura differente, contribuire ad aumentare la complessità del prodotto finale. L'insediamento del lievito selezionato consente, infatti, di inibire o controllare lo sviluppo della flora spontanea del mosto che comprende anche quei ceppi di lievito ritenuti, spesso senza alcuna discriminazione, responsabili dell'insorgenza di difetti nei vini o di problemi legati al processo fermentativo.

Molteplici studi ecologici, condotti nelle diverse aree vitivinicole per valutare la microflora associata alla fermentazione naturale del mosto d'uva, hanno messo in evidenza, rispetto al decorso fermentativo, che i lieviti apiculati (*Hanseniaspora/Kloeckera*) dominano le prime fasi del processo fermentativo, per essere poi sostituiti dai lieviti ellittici che proseguono e portano a termine la fermentazione (Amerine *et al.*, 1980; Fleet, 2003; Mendoza *et al.*, 2007; Povhe Jemec *et al.*, 2001). Durante le varie fasi del processo spesso possono essere rinvenuti altri lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti ai generi *Candida, Torulaspora, Kluyveromyces*, Zygo*saccharomyces* e *Metschnikowia* (Fleet *et al.*, 1984; Heard and Fleet, 1985; Pardo *et al.*, 1989). Studi quantitativi condotti sulla microflora dei mosti in fermentazione hanno messo in evidenza la partecipazione, anche a livelli significativi nelle varie fasi del processo, di lieviti non-*Saccharomyces* (Fleet *et al.*, 1984; Pardo *et al.*, 1989). La presenza di lieviti non-*Saccharomyces* è stata rilevata non solo nelle fermentazioni naturali ma anche in vinificazioni inoculate con colture selezionate (Mora *et al.*, 1990; Ciani e Rosini, 1993).

In seguito a queste ricerche è stato rivalutato il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario (Fleet and

Heard, 1993; Ciani, 1997). La presenza e la persistenza di questi lieviti, durante vinificazioni inoculate e non inoculate, sono ben documentate, così come il loro contributo alla composizione analitica e alle caratteristiche sensoriali del vino (Romano *et al.*, 1992; Shütz and Gafner, 1993; Herraiz *et al.*, 1990; Egli *et al.*, 1998, Ciani and Maccarelli, 1998). Molti studi, infatti, hanno rilevato che i lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono a rendere più complesso l'aroma dei vini e quindi a migliorarne la qualità (Romano *et al.*, 1997a, 1997b; Egli *et al.*, 1998; Ciani and Maccarelli, 1998; Henick-Kling *et al.*, 1998, Domizio et al., 2007).
Oltre a tali considerazioni, i lieviti non-*Saccharomyces* sono risultati interessanti per la loro applicazione nell'industria enologica anche per le loro attività enzimatiche. Numerose ricerche condotte negli ultimi anni hanno messo in evidenza che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario sono in grado di secernere enzimi quali proteasi, esterasi e beta-glucosidasi che influiscono positivamente sull'aspetto qualitativo del vino (Fernandez *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2001; Ferriera *et al.*, 2001; Zohre and Erten, 2002; Rosi *et al.*, 1994). A tale proposito questi studi, sottolineando il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* nel migliorare il profilo aromatico e sensoriale dei vini, hanno ipotizzato il loro uso in fermentazioni miste controllate.
Il processo fermentativo naturale, infatti, anche se è preferito da taluni proprio per migliorare le caratteristiche analitico - sensoriali e rendere più complesso il futuro vino, rimane un processo incontrollato con la successione indefinita di varie specie di lieviti. Questo tipo di processo quindi, lasciando al caso la presenza quali-quantitativa della microflora, può portare a dei clamorosi insuccessi.
L'uso controllato di inoculi misti è da tempo stato proposto in letteratura. Da molto tempo l'uso della specie *Schizosaccharomyces pombe* in combinazione con *S. cerevisiae* è stato proposto per la disacidificazione dei mosti (Snow e Gallender, 1973; Yokotsuka *et al.*, 1993).

Altri autori (Ciani e Ferraro, 1996; Ciani, 2001) hanno evidenziato la possibilità di incrementare e raggiungere livelli elevati di glicerolo, composto che conferisce maggiore morbidezza al vino, utilizzando ceppi di lievito appartenenti alla specie *Candida zemplinina*.
Inoltre, alcuni studi sono stati condotti per determinare l'impatto di questi lieviti sulla composizione e sulle proprietà sensoriali del vino (Swiegers *et al.*, 2005;. Renouf *et al.*, 2007; Domizio *et al.*, 2007; Fleet, 2008).
L'ecologia dei lieviti nel processo di fermentazione risulta quindi alquanto complessa e le specie di lieviti non-*Saccharomyces* giocano un ruolo rilevante sulla complessità aromatica del prodotto finale.
Per queste ragioni, è stata valutata la possibilità di utilizzare inoculi misti controllati usando, insieme alla coltura starter di *S. cerevisiae,* specie non-*Saccharomyces* di ambito vinario, con potenziali caratteristiche applicative. Tale tipo di processo fermentativo potrebbe essere una valida alternativa all'inoculo con il solo ceppo di *Saccharomyces*.
L'inoculo di colture miste prevede quindi, oltre al ceppo di *S. cerevisiae* selezionato, l'ulteriore aggiunta di ceppi non-*Saccharomyces* anch'essi opportunamente selezionati. D'altra parte è ormai noto che esiste all'interno del genere *Saccharomyces* un'ampia variabilità tra i ceppi per la produzione di differenti composti secondari. Allo stesso modo anche all'interno delle specie di non-*Saccharomyces* di ambito vinario è stata rilevata un'ampia variabilità per i principali caratteri legati alla vinificazione sui quali effettuare operazioni di selezione (Ciani e Maccarelli, 1998; Romano, 2002). Pertanto, così come negli ultimi anni la selezione operata tra i lieviti *Saccharomyces* ha consentito l'ottenimento di ceppi con caratteristiche peculiari, un'analoga operazione di selezione sui lieviti non-*Saccharomyces* potrà consentire di individuare ceppi con caratteristiche idonee al processo di vinificazione. In tale prospettiva di utilizzazione, questi ceppi potrebbero

interagire positivamente con i *Saccharomyces* selezionati, consentendo di ottenere prodotti con caratteristiche originali. In questo contesto, i numerosi studi che negli ultimi anni sono stati pubblicati sui diversi aspetti sopra considerati (Kapsopoulou *et al.*, 2005; Ciani *et al.*, 2005), alcuni dei quali specificatamente su inoculi misti con lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* (Hermle *et al.,* 2005; Languet *et al.,* 2005; Ciani e Comitini, 2006; Pérez-Nevado *et al.,* 2006; Kapsopoulou *et al.*, 2007; Ciani *et al.,* 2010), danno conto del rinnovato interesse per questa prospettiva di gestione delle diverse fermentazioni vinarie.

1.1.Bibliografia

1. Amerine, M. A., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L. and Webb, A.D. 1980. The technology of Wine Making. 2th edn., AVI Publishing, Westport.
2. Ciani, M., Rosini, G. 1993 Vinificazioni industriali in purezza microbiologica. Industrie delle Bevande. 22, 202-206.
3. Ciani, M. 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. In Recent Res. Develop. Microbiol. Vol. 1, ed. S. G. Pandalai., Research Signpost, Kerala, India., pp. 317-331.
4. Ciani, M. and Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 199-203.
5. Ciani, M. and Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilized *Candida zemplinina* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. J. Appl. Microbiol. 85, 247-254.
6. Ciani, M. 2001. Allestimento di starter con colture microbiche miste. Industrie delle Bevande. 30, 35-39.
7. Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter

wine yeast fermentations. Int. J. Food Microbiol. 108, 239-245.
8. Ciani, M. and Comitini, F. 2006. Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida zemplinina* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. World J. Microbiol. Biotechnol. 22 (6),619-623.
9. Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res. 10,123-33.
10. Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C. & Sabatelli, M.P. 2007 Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. Int. J. Food. Microbiol. 115, 281-289.
11. Egli, C. M., Ediger, W. D., Mitrakul, C. M. and Henick-Kling, T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. J. Appl. Microbiol. 85, 779-789.
12. Farkas, G., Rezessy-Szabo, J.M., Zakany, F., Hoschke, A. 2005. Interaction of *Saccharomyces* and non-*Sacharomyces* yeast strains in an alcoholic fermentation process. Acta Alimentaria. 34 (1), 81-90.
13. Fernandez, M., Ubeda, J. F., Briones, A. I. 2000. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. Int. J. Food Microbiol. 59, 29-36.
14. Ferreira, A.M., Climaco, M.C., Faia, A.M., 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study. J. Appl. Microbiol. 91, 67-71.
15. Fleet, G. H. and Heard, G. M. 1993. Yeasts-growth during fermentation. In Wine Microbiology and

Biotechnology, ed G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland., pp. 27-54.
16. Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1034-1038.
17. Fleet, G.H. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. 8, 979-995.
18. Heard, G. M. and Fleet, G. H. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 727-728.
19. Henick-Kling, T., Ediger, W. D., Daniel, P. And Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84, 865-876.
20. Hermle, S., Calmonte, S., Frei, A., Hoffmann-Boller, P., Gafner, J., Schütz, M. 2005. Populationsdynamik von Weinhefe-Mischkulturen. Schweiz. Z. Obst-Weinbau, 141 (8), 7-9.
21. Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J. And Cabezudo, M. 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. Am. J. Enol. Vitic. 41, 313-318.
22. Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H. and Pretorius, I.S. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. S. Afr. J. Enol. Vitic. 27, 15-38.
23. Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H. 2005. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. World J. Microbiol. Biotechnol. 21 (8-9), 1599-1602.
24. Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces*

thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae*. World J. Microbiol. Biotechnol. 23 (5), 735-739.

25. Languet, P., Aguera, E., Samson, A., Ortiz-Julien, A., Salmon, J.M. 2005. Valorization aromatique des mouts par l'utilisation séquentielle des levures d'espécies non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. Rev. Oenolog. 117, 31-33.
26. Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L. 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some compounds of Albarino wine aroma. Am. J. Enol. Vitic. 47, 206-216.
27. Mendoza, L.M., Manca de Nadra, M.C., Farías, M.E. 2007. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of Kloeckera apiculata and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. Biotechnology Letters, 29, 1057-1063.
28. Mora, J., Barbas, J. I. and Mulet, A. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. 41, 156-159.
29. Moreira, N. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 103, 285-290.
30. Pardo, I., Garcìa, M. J., Zuniga, M. and Uruburu, F. 1989. Dynamics of microbial populations during fermentations of wines from the Utiel Requena region of Spain. Appl. Environ. Microbiol. 55, 539-541.
31. Pérez-Nevado, F., Albergarla, H., Hogg, T., Girio, F. 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces* cerevisiae. Int. J. Food Microbiol. 108, 336-345.

32. Renouf, V., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl. Microb. Cell Physiol. 75, 149-164.
33. Romano, P., Suzzi, G., Comi, G. and Zironi, R. J. 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. J. Appl. Bacteriol. 73, 126-130.
34. Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. and Maifreni, M. 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 82, 615-618.
35. Romano, P., Suzzi, G. Domizio, P. Fatichenti, F. 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strain. Antonie van Leeuwenhoek. 71, 239-242.
36. Romano, P. 2002. Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. In: Biodiversity and biotechnology of wine yeasts, ed. Ciani M. Research Signpost, Kerala, India, pp. 99-109.
37. Rosi, I., Domizio, P., Fia, G. 1997. Characterization of esterase activity in wine related yeasts. Book of Abstract 18th ISSY-Yeast Nutrition and natural Habitats- 24-29 August, Bled, Slovenia, (Raspor P.ET AL: EDS.) Published by Biotechnological Faculty, University of Ljubljana, p. P9-03
38. Rosi, I., Vinella, M., Domizio, P. 1994. Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. J. Appl Bacteriol. 77, 519-527.
39. Snow, P.G. & Gallender, J.F. 1979. Deacidification of white table wines through partial fermentation by *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic. 30, 45-48.
40. Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 91, 182-190.

41. Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139-173.
42. Yokotsuka, K. Otaky, A, Naitoh, A. & Tanaka, H. 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. 44, 371-377.

2. Obiettivo del programma di ricerca

L'impiego controllato di inoculi misti con lieviti vinari appartenenti a specie differenti può consentire di migliorare da una parte e tipizzare dall'altra i vini in relazione all'incremento di composti positivi e/o alla riduzione di quelli indesiderati, risultanti delle interazioni tra lieviti di specie differenti.

Una maggiore complessità dei vini dovuta all'azione di più specie di lievito, infatti, è stata spesso evocata dai fautori delle fermentazioni naturali. Nel caso dell'impiego di inoculi misti controllati la maggiore complessità dei vini potrà essere raggiunta evitando i problemi legati al mancato controllo del processo fermentativo che rende spesso incostanti i risultati. La possibilità quindi di "mimare" una fermentazione naturale, mantenendo però il controllo del processo fermentativo e rendendolo quindi ripetibile, è sicuramente un interessante aspetto dell'applicazione di tale approccio fermentativo in vinificazione.

Obiettivo del presente studio è stato pertanto quello di individuare ceppi di lievito non-*Saccharomyces* che, impiegati in fermentazioni miste con ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, consentano sia l'ottenimento di vini con caratteristiche peculiari sia un miglioramento della loro qualità.

3. Metodiche analitiche

Nel corso dei tre anni di sperimentazione sono state applicate diverse metodiche di analisi sia per le indagini microbiologiche che chimiche.

Indagini microbiologiche

- Osservazione macro e microscopica degli isolati
- Analisi di restrizione del rDNA secondo il metodo di Esteve Zarzoso *et al.*, (1999). Il rDNA è una sequenza bersaglio ideale per l'identificazione molecolare dei lieviti e di altri organismi. Infatti, è dotato di elevato polimorfismo interspecifico (in specie diverse) e limitato polimorfismo intraspecifico (all'interno della specie).
  L'analisi del rDNA è avvenuta in 2 fasi. Nel corso della prima fase si è effettuata l'estrazione del DNA totale, seguita da una reazione a catena della polimerasi (PCR) impiegando primer specifici (ITS1 e ITS4) per l'amplificazione di un frammento contenente gli spaziatori ITS1 e ITS2 e il gene 5.8S tra questi compreso. Questa reazione consente di ottenere ampliconi di lunghezza variabile in lieviti di specie diverse. Poiché in alcuni casi non è stato possibile differenziare i lieviti sulla base della lunghezza degli ampliconi, nella seconda fase questi sono stati digeriti con enzimi di restrizione quali *Cfo*I, *Hae*III e *Hinf*I che riconoscono sequenze specifiche sul DNA bersaglio, generando profili di restrizione caratteristici per ogni specie di lievito.
- Sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rDNA. E successiva comparazione della sequenza ottenuta con quelle disponibili in banche dati (GenBank, EMBL) per l'identificazione di ceppi non identificati con metodo molecolare sopra riportato.
- Individuazione e messa a punto di sistema di monitoraggio specie-specifico per il rilevamento del

ceppo inoculato in fermentazione mediante Real Time PCR (RT-PCR) mediante l'uso di primer specifici.

- Saggi fisiologici su piastra:
  - Crescita su terreno Agar Lisina. Gran parte dei lieviti non-*Saccharomyces* di interesse enologico sono in grado di crescere su questo terreno, a differenza del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Tale saggio è stato pertanto impiegato nella fase di screening iniziale per l'individuazione di lieviti non-*Saccharomyces* tra la microflora proveniente da diversi ambiti vinari.
  - Resistenza alla SO_2. La resistenza all'anidride solforosa è stata saggiata valutando la crescita dei ceppi di lievito non-*Saccharomyces* su terreno agarizzato (YPD) tamponato a pH 3, al quale sono state aggiunte dosi crescenti di $K_2S_2O_5$ in modo tale da avere in piastra concentrazioni finali di solforosa pari 10, 20, 40 e 60 ppm. La crescita dei ceppi a ciascuna concentrazione di SO_2 è stata osservata nei 3 giorni successivi all'inoculo.
  - Presenza del carattere killer. Il fenotipo killer è stato evidenziato su terreno agarizzato contenente blu di metilene e tamponato a pH 4,5. Colture di 48h sono state strisciate su piastre contenenti il terreno seminato per inclusione con una sospensione del ceppo sensibile NCYC1006. Le piastre sono state osservate dopo 3-5 gg. La presenza del carattere killer nel ceppo testato viene evidenziata dalla comparsa di un alone di inibizione della crescita del ceppo sensibile, circondato da un alone blu scuro dovuto alla presenza di cellule non vitali.
  - Produzione di idrogeno solforato (H_2S). Colture di 48h sono state inoculate su terreno Biggy agar (Oxoid) contenente solfito di bismuto che reagendo con l'idrogeno solforato prodotto dal lievito dà una colorazione marrone. Le piastre incubate a 26°C sono state osservate dopo 4 gg. L'intensità della

colorazione è in relazione con la quantità di idrogeno solforato prodotto dal lievito. È stata pertanto adottata una scala arbitraria da 0 a 4 per indicare la capacità di produzione di H_2S.

- Attività glicosidasica e β-glucosidasica. La presenza di glicosidasi è stata rilevata su terreno contenente rutina (quercitin-3-rutinoside). Le piastre incubate a 26°C sono state osservate nell'arco di tre settimane per la comparsa di un alone di chiarificazione dovuto all'idrolisi della rutina. La presenza di attività β-glucosidasica è stata rilevata su terreno contenente arbutina (idrochinone-β-D-glucopiranoside) come unica fonte di carbonio. Le piastre, incubate a 26°C sono state osservate nell'arco di 14 giorni per la comparsa di una patina marrone la cui intensità è proporzionale all'attività idrolitica dell'arbutina. Per definire l'intensità del colore è stata adottata una scala arbitraria da 0 a 4.
- Attività β-glucosidasica sul surnatante colturale. La quantità di p-nitrofenolo (pNP) liberato dal p-nitrofenil-β-D-glucopiranoside (pNPG), utilizzato come substrato della reazione, è stata misurata spettrofotometricamente.
- Attività esterasica. Il saggio per la produzione di esterasi è stato effettuato stemperando le cellule in un tampone contenente p-nitrofenilacetato (pNPA). L'attività è stata rilevata osservando la comparsa di una colorazione gialla dovuta all'idrolisi del pNPA e conseguente liberazione del p-nitrofenolo di colore giallo. L'intensità della colorazione è stata definita arbitrariamente con valori da 0 a 2.
- Attività protesica. La presenza di attività proteasica è stata rilevata strisciando le colture su terreno solido contenente caseina di Hammarsten come fonte di azoto. Le piastre incubate a 26°C sono state osservate dopo 7 gg per la comparsa di un alone di

chiarificazione la cui ampiezza è correlata alla quantità di proteasi prodotte. L'attività proteolitica extracellulare è stata anche valutata dosando la tirosina ed il triptofano liberati dal substrato proteico, dopo inoculo dei lieviti in terreno liquido contenente caseina di Hammarsten come fonte di azoto. La concentrazione di tali composti è stata determinata spettrofotometricamente (λ=650 nm).

- Evoluzione delle fermentazioni. Le fermentazioni sono state seguite valutando:
  - la produzione di CO_2, per via gravimetrica, registrando giornalmente la perdita in peso fino a termine della fermentazione (peso costante per tre giorni successivi).
  - la crescita dei lieviti, mediante conta vitale su piastre contenenti terreni differenziali: WL medium (Wallerstein Laboratory) per la rilevazione dei lieviti *S. cerevisiae* e per la conta totale dei lieviti e LA (Lisyn Agar) per la conta dei lieviti non-*Saccharomyces*.

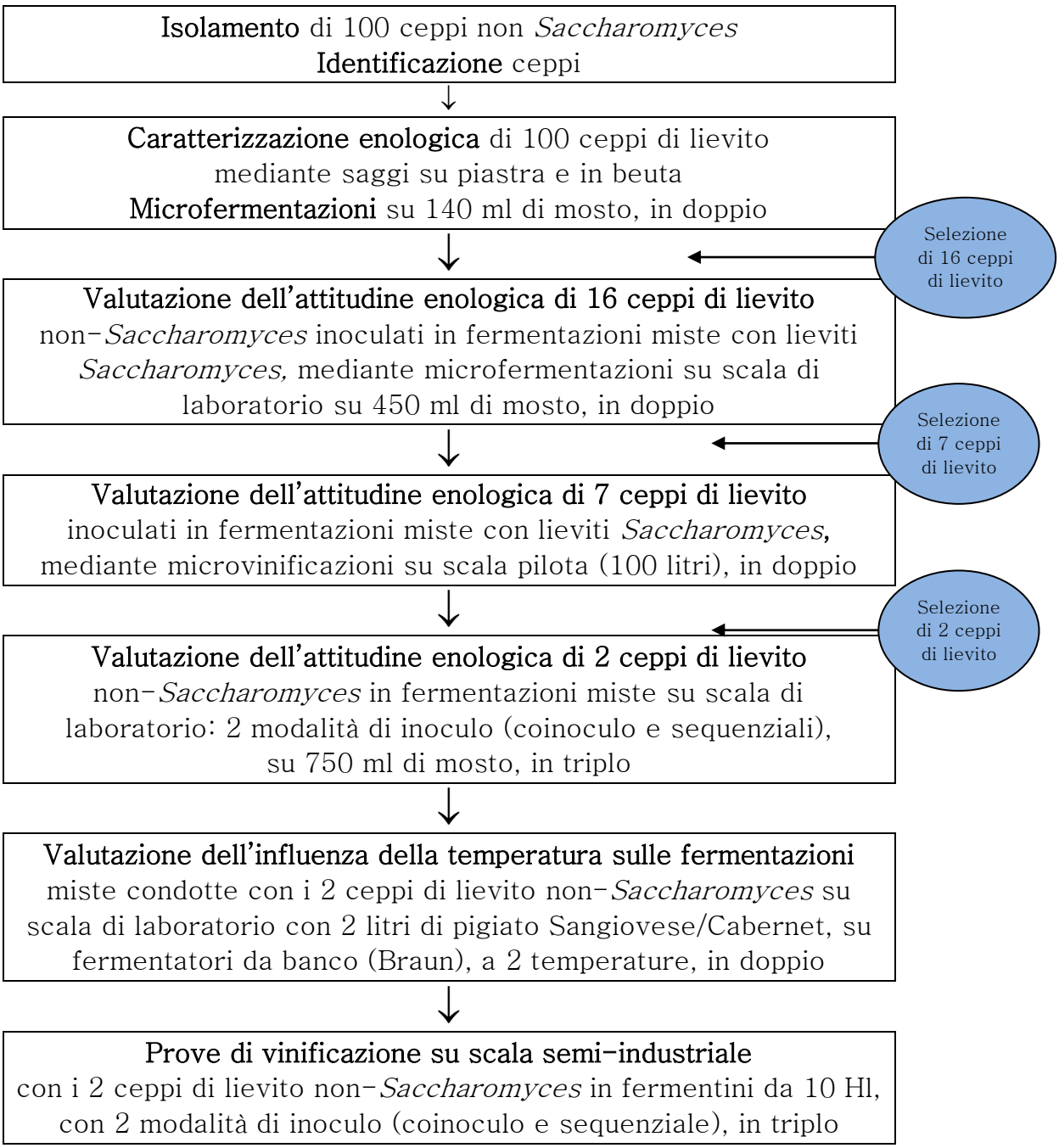
Indagini chimiche

- Acidità totale/volatile, secondo i Metodi Ufficiali per titolazione diretta dei campioni/dei relativi distillati in corrente di vapore.
- Solforosa libera e totale, mediante titolazione iodometrica.
- Etanolo, secondo i Metodi Ufficiali per via densitometrica previa distillazione dei campioni.
- Purezza fermentativa, espressa come rapporto tra acidità volatile e etanolo a fine fermentazione.
- Azoto ammoniacale mediante kit enzimatico (171-UV, Sigma-Aldrich, S. Louis, USA).
- Acidi organici, zuccheri e glicerolo, mediante separazione cromatografica HPLC e rilevazione rifrattometrica. Il calcolo delle concentrazioni è stato

ottenuto mediante retta di taratura, utilizzando concentrazioni diverse per ciascun composto.

- Polisaccaridi totali mediante separazione cromatografica HPLC e rilevazione rifrattometrica. Il calcolo delle concentrazioni è stato ottenuto mediante retta di taratura, utilizzando come standard un preparato di mannani del commercio.
- Volatili maggiori (acetaldeide, etil acetato, etil lattato, metanolo e alcoli superiori) per via gascromatografica iniettando il campione pre-purificato per distillazione ed addizionato di standard interno.
- Altri volatili (composti di esterificazione con l'etanolo, acidi volatili, alcoli, acidi ed acetati degli alcoli superiori) per via gascromatografica, iniettando l'estratto in etere/esano del campione, addizionato di standard interno.
- Acquisizione ed integrazione dei segnali cromatografici HPLC e GC mediante software Galaxie (Varian, Inc).

4. Schema delle prove e risultati



4.1. I anno di ricerca

L'attività di ricerca durante il primo anno di sperimentazione si è articolata nelle fasi di seguito riportate.

4.1.1. Reperimento ceppi e loro definizione tassonomica

In questa prima fase del progetto sono stati reperiti un centinaio di ceppi di lievito non-*Saccharomyces* provenienti da diversi ambiti vinari.
Tutti i ceppi, mediante osservazione macro e microscopica, impiego di saggi fisiologici e metodi molecolari, sono stati identificati a livello di specie. In particolare, l'analisi di restrizione del rDNA secondo il metodo di Esteve Zarzoso *et al*. (1999), ha consentito di ottenere ampliconi di lunghezza variabile nei lieviti delle specie diverse (Fig. 1a). I lieviti sono stati inoltre differenziati dopo digestione degli ampliconi con enzimi di restrizione quali *Cfo*I, *Hae*III e *Hin*fI consentendo di riconoscere sequenze specifiche sul DNA bersaglio, generando profili di restrizione caratteristici per ogni specie di lievito (Fig. 1b).
L'utilizzo di questo metodo ha consentito di identificare i ceppi di lievito oggetto del presente studio (Tab. 1).
Tre ceppi presentavano tuttavia profili di restrizione di difficile interpretazione e sono stati quindi sottoposti a sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rDNA. Il sequenziamento di questa regione (Fig. 2) e la successiva comparazione della sequenza ottenuta con quelle disponibili in banche dati (GenBank, EMBL) ne ha consentito l'identificazione.
In definitiva sono stati identificati 13 ceppi appartenenti al genere *Candida,* 13 al genere *Hanseniaspora/Kloeckera,* 5 al genere *Kluyveromyces,* 1 al genere *Issatchenkia,* 7 al genere *Metschnikowia,* 18 al genere *Pichia,* 12 al genere

Saccharomycodes, 1 al genere *Schizosaccharomyces,* 9 al genere *Torulaspora,* e 18 al genere *Zygosaccharomyces*.
Tra i ceppi (Tab. 1) sottoposti alle analisi sono stati inseriti a confronto anche 3 ceppi di lievito *Saccharomyces* (n. 44, 49 e 102).

4.1.2. Valutazione di alcuni caratteri enologici dei ceppi di lievito non-*Saccharomyces*

I caratteri enologici dei lieviti possono essere suddivisi in due gruppi: quelli di qualità e quelli di importanza tecnologica. I primi influiscono sulla composizione chimica del vino attraverso la produzione di composti secondari della fermentazione e di composti che derivano da modificazione o conversione dei costituenti dei mosti. I secondi influiscono sull'andamento del processo fermentativo e possono rendere competitivo in fermentazione il ceppo non-*Saccharomyces* nei confronti dello starter.

I ceppi sopra identificati sono stati quindi valutati per i seguenti caratteri: resistenza alla SO_2, presenza del carattere killer, produzione di idrogeno solforato (H_2S) e presenza di attività enzimatiche. I risultati sono riportati nelle tabelle 2 e 3. In particolare si è evidenziato che:

- I risultati della **resistenza alla anidride solforosa** da parte dei vari ceppi hanno confermato in generale quanto già riportato in letteratura nei riguardi dei diversi generi. Possono essere considerati poco resistenti tutti quei ceppi che mostrano crescita sino alla concentrazione di 20 mg/l (grado di resistenza 2). Generalmente poco resistenti alle dosi più elevate di SO_2 sono risultati i lieviti apiculati (*Hanseniaspora/Kloeckera*) con qualche eccezione (ceppi n. 24 e 27, *H. vinae* e *H. osmophila* rispettivamente) che resistono alla dose di 40 mg/l (grado di resistenza 3). Tra i ceppi molto resistenti e paragonabili al ceppo commerciale di controllo (*S. cerevisiae* EC1118) possono essere annoverati alcuni lieviti appartenenti ai generi *Pichia, Saccharomycodes*, *Candida, Zygosaccharomyces* e *Torulaspora*. Particolarmente interessanti sono

risultate le colture resistenti alle più alte dosi di solforosa (60 mg/l, grado di resistenza 4), appartenenti alle specie *T. delbrueckii* (n. 33, 35, 38 e 92), *C. beckii* (n. 67), *C. diversa* (n. 10) e *C. montana* (n. 68), specie generalmente poco resistenti a tale antisettico. Per concludere possiamo dire che pur nelle diversità di resistenza alla solforosa delle varie specie di non-*Saccharomyces* saggiate sono state rilevate delle differenze a livello intraspecifico che possono essere utili ai fini della scelta dei ceppi da selezionare per la successiva fase della ricerca.

- Il carattere killer è risultato poco diffuso tra i diversi ceppi esaminati appartenenti ai diversi generi. In particolare tale carattere è risultato presente nella specie *P. anomala* (n. 9) mentre è risultato più ampiamente diffuso tra i ceppi della specie *M. pulcherrima*.

- Il test relativo alla valutazione semiquantitativa di idrogeno solforato ha evidenziato un'ampia differenziazione tra le diverse colture saggiate. Anche per tale carattere le distinzioni possono essere rilevate a livello di ceppo e non a livello di specie e può essere un carattere importante per l'esclusione o l'inserimento di colture alla successiva fase di selezione.

- L'interesse a ricercare la presenza di enzimi idrolitici, come le glicosidasi e β-glucosidasi, in lieviti non-*Saccharomyces* si basa sulla potenzialità di tali enzimi di incrementare l'aroma varietale e quindi la tipicità di un vino. Tra gli aromi varietali, i terpenoli o alcol terpenici sono presenti nei mosti e nei vini prevalentemente legati agli zuccheri con i quali formano complessi glicosidici privi di odore. La

liberazione di questi precursori aromatici può avvenire ad opera di enzimi idrolitici come le glicosidasi e β-glucosidasi. I ceppi con attività β-glucosidasica più elevata sono stati ulteriormente valutati attraverso prove di fermentazione in beuta. A tale scopo i lieviti sono stati coltivati in terreno liquido e l'attività β-glucosidasica è stata dosata sul surnatante colturale. L'attività β-glucosidasica è risultata abbastanza diffusa tra le colture sottoposte a screening, in accordo con i dati della letteratura che hanno rilevato la sua presenza in particolare tra i lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario. La maggiore presenza di tale carattere si può rilevare nel genere *Hanseniaspora/Kloeckera* (9 ceppi) e nel genere *Metschnikowia* (5 ceppi) e, con minor frequenza, nei generi *Kluyveromyces* (3 ceppi), *Torulaspora* (2 ceppi) e *Pichia* (1 ceppo). L'attività glicosidasica, valutata mediante l'idrolisi della rutina, è risultata presente in 5 ceppi, tutti appartenenti alla specie *M. pulcherrima* e quindi sembrerebbe un'attività enzimatica specie-specifica almeno per quanto riguarda i lieviti di ambito vinario. La valutazione quantitativa dell'attività β-glucosidasica extracellulare in liquido (valutata solo nei ceppi che avevano presentato in piastra una più elevata attività β-glucosidasica) ha mostrato un'elevata differenziazione tra le colture che possiedono tale carattere. Interessante è risultata l'attività del ceppo n. 25 appartenente alla specie *H. osmophila* e quella relativa alle specie *K. thermotolerans* (n. 101 e 103) e *T. delbrueckii* (n. 34 e 38).

- Gli esteri rappresentano un importante gruppo di composti volatili sintetizzati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. Essi conferiscono al vino un flavour caratteristico. La capacità quindi di idrolizzare

gli esteri potrebbe incidere negativamente sulla qualità organolettica di un vino. L'attività esterasica, a diversi gradi di intensità, è stata ampiamente ritrovata in tutte i generi saggiati e può essere sicuramente un'attività da prendere in considerazione per la scelta delle colture da utilizzare per la successiva fase della ricerca.

- L'attività peptidasica delle proteasi acide esocellulari esercita una significativa influenza sulla stabilità proteica del vino, favorisce la fermentazione alcolica e malolattica in seguito all'incremento di azoto assimilabile e, inoltre, aumenta il contenuto di precursori di alcuni composti secondari della fermentazione quali esteri ed alcoli superiori. L'attività proteasica è stata rinvenuta solamente tra alcune specie appartenenti ai generi *Pichia*, *Hanseniaspora/Kloeckera* e *Saccharomycodes*. La valutazione quantitativa dell'attività proteolitica in coltura liquida tra le colture microbiche che, tramite il saggio in piastra avevano mostrato attività proteasica più elevata, ha evidenziato differenze sostanziali solo tra i due ceppi di *Saccharomycodes* (n. 55 e 56).

4.1.3. Valutazione dell'attitudine enologica dei ceppi di lievito mediante micro fermentazioni

I ceppi di lievito caratterizzati nelle precedenti fasi sono stati quindi valutati mediante prove di fermentazione. Per ciascuno dei ceppi prescelti sono state allestite, in duplicato, delle fermentazioni in beuta da 200 ml, contenenti 140 ml di mosto biologico del commercio. Dopo aver addizionato glucosio e fruttosio in quantità equimolare, ottenendo una concentrazione zuccherina finale di 26,3%, il mosto è stato pastorizzato a 80°C per 10 minuti e inoculato con il 5% di precoltura, fatta sviluppare a 25°C per 48h nel medesimo substrato.

Nelle figure 3-11, per ciascuno dei ceppi di lievito riuniti nei differenti generi individuati, oltre alle curve di fermentazione, sono riportate le elaborazioni grafiche dei principali dati analitici dei fermentati.

Di seguito i principali risultati osservati nell'ambito dei diversi generi:

- *Candida*

Tra i 13 ceppi di lievito appartenenti al genere *Candida* (Fig. 3), la specie *C. zemplinina* (n. 22) ha mostrato al 4° giorno la più elevata velocità fermentativa (0,48 g CO_2/gg), con una produzione di CO_2 in costante aumento fino al 15° giorno, momento in cui ha raggiunto una quantità di CO_2 pari a 8,7 g, corrispondente a circa il 70% della quantità massima di CO_2 prodotta a fine fermentazione. Buona anche la purezza fermentativa, pari allo 0,1 e la quantità media di etanolo prodotta (~ 7%). Le altre specie di *Candida* hanno mostrato, invece, tutte una minore attività fermentativa e precisamente si distinguono due gruppi: un primo gruppo, rappresentato dai ceppi n. 67, 68, 74, 75 e 76, la cui quantità massima di CO_2 prodotta, dopo ancora 40 giorni di fermentazione, è rimasta al di sotto dei 3 g ed un secondo gruppo (ceppi n. 10, 69, 70, 71, 73, 77 e 79) con una produzione di CO_2 in lento ma costante aumento fino a circa il 21° giorno, momento in cui sono stati raggiunti quantitativi di CO_2 compresi tra 3,5 e 6 g, corrispondenti a circa il 60-70% della loro massima attività fermentativa. In questo ultimo gruppo tuttavia solo i ceppi n. 69, 77 e 79 (Tab. 4), appartenenti rispettivamente a C*. tropicalis, C. apicola* e *C. vinaria*, hanno presentato la migliore resa alcolica, con una produzione media di alcool compresa tra il 4-6%.
Nei fermentati relativi ai ceppi C*. tropicalis, C. apicola, C. bombicola, C. vinaria*, *C. zemplinina e C. cantarelli* (n. 69, 71, 73, 75, 10 e 76) sono stati inoltre riscontrati interessanti concentrazioni di polisaccaridi con quantità comprese tra 190 e 290 mg/l. Una buona concentrazione di polisaccaridi (compresa tra 130 e 160 mg/l) si è comunque registrata nei restanti fermentati ad eccezione del ceppo *C. vinaria* n. 74 (100 mg/l). Tali risultati evidenziano quindi la variabilità esistente anche all'interno dei ceppi della stessa specie.

- *Torulaspora*

I 9 ceppi di lievito *Torulaspora* (Fig. 4), tutti appartenenti alla specie *delbrueckii*, pur con un simile andamento fermentativo, hanno mostrato a fine fermentazione un diverso potere alcoligeno (Tab. 5). Più precisamente, in base alla velocità fermentativa al 4° giorno di fermentazione, si possono distinguere tre gruppi: il primo gruppo, con i ceppi n. 35 e 38, con le più basse velocità fermentative comprese tra 0, 3 e 0,5, il secondo, con i ceppi n. 33, 34, 39 e 40 con velocità comprese tra 0,65 e 0,72 ed, infine, un terzo gruppo con le più alte velocità fermentative, comprese tra 0,9 e 1. Dopo il 16° giorno di fermentazione, raggiunti livelli diversi di CO_2 compresi tra 7 e 12 g, quasi tutti i ceppi hanno iniziato a rallentare più o meno drasticamente la loro attività. I ceppi appartenenti ai primi due gruppi, ossia con velocità fermentative medio – basse, hanno mantenuto tale comportamento fino alla fine della fermentazione, raggiungendo quindi medio – basse gradazioni alcoliche, comprese tra 5 e 6,7%. Fa eccezione il ceppo n. 38, che, pur con una bassa velocità iniziale, ha raggiunto gradazioni alcoliche simili a quelle dei lieviti appartenenti al terzo gruppo (7,5-9%), i quali hanno invece mostrato al 4° giorno di fermentazione le più alte velocità fermentative iniziali.
L'acidità volatile è risultata mediamente bassa in tutti i fermentati e compresa tra 0,3 a 0,5 g/l di acido acetico. In generale, buona anche la purezza fermentativa. La concentrazione di polisaccaridi oscillava tra 160 e 200 mg/l; nel fermentato del ceppo n. 38 la quantità è risultata più alta (~250 mg/l).

- *Kluyveromyces*

Tra i 5 ceppi di lievito del genere *Kluyveromyces* (Fig. 5), tutti appartenenti alla specie *K. thermotolerans,* i ceppi n. 103, 105 e 107 hanno mostrato un simile comportamento

fermentativo, con una produzione di CO_2 in costante aumento fino circa all'11° giorno, (producendo il 70–77% della CO_2 massima raggiunta alla fine della fermentazione) per poi iniziare a diminuire più o meno drasticamente. Il ceppo n. 101 ha mostrato il miglior profilo fermentativo, iniziando a rallentare la sua attività al 16° giorno di fermentazione, dopo aver raggiunto circa l'83% della sua massima capacità fermentativa. Il ceppo n. 93 invece, pur presentando un lento avvio alla fermentazione, ha successivamente mostrato un comportamento fermentativo simile agli altri ceppi.
La resa alcolica per i ceppi n. 93, 101 e 105, si è attestata intorno a livelli paragonabili a quelli di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces,* raggiungendo concentrazioni medie di etanolo tra 6 e 8% (Tab. 6). Solo i ceppi n. 103 e 107 hanno mostrato un più basso potere fermentativo, raggiungendo concentrazioni di etanolo intorno al 4%. Anche la purezza fermentativa è risultata molto buona (0.06–0.1) per tutti e 5 i ceppi in esame. Per quanto riguarda i polisaccaridi il quantitativo riscontrato nei fermentati a fine fermentazione è risultato compreso tra i 160 e 260 mg/l. In particolare i livelli più elevati sono stati riscontrati nei fermentati relativi ai ceppi 93, 103 e 105 (Fig. 5).

- *Metschnikowia*

I sette ceppi di lievito *Metschnikowia*, (Fig. 6), tutti appartenenti alla specie *M. pulcherrima*, hanno mostrato un comportamento fermentativo molto simile, con produzione di bassi quantitativi di CO_2 che, dopo 53 giorni di fermentazione, erano ancora compresi tra i 5 e 6 g.
Le gradazioni alcoliche si sono attestate intorno al 4% (Tab. 7). L'acidità volatile è risultata bassa in tutti i fermentati, con valori compresi tra 0,26 e 0,4 g/l di acido acetico. Anche per quanto riguarda i polisaccaridi, i livelli riscontrati

sono risultati abbastanza simili e compresi tra 130-180 mg/l. In particolare, nei fermentati di tre ceppi (n. 45, 46 e 53) sono state rilevate le concentrazioni più alte (Fig. 6).

- *Hanseniaspora*

Tra i lieviti apiculati (Fig. 7), il ceppo n. 28, appartenente alla specie *H. valbyensis,* e i ceppi n. 27 e 32, entrambi appartenenti alla specie *H. osmophila,* hanno mostrato al 4° giorno di fermentazione le più elevate velocità fermentative, comprese tra 0,8 e 1,4 g CO_2/gg (Tab. 8; Fig. 7). Dopo circa 11 giorni di fermentazione, in corrispondenza del rallentamento della loro attività, questi tre lieviti hanno raggiunto circa il 70-80% della quantità massima di CO_2 prodotta alla fine della fermentazione, ottenendo una gradazione alcolica intorno al 6%. Anche il ceppo n. 25, sempre appartenente alla specie *H. osmophila*, ha presentato un comportamento fermentativo simile ai due ceppi n. 27 e 32 e, se pur con una minore attività, a termine fermentazione ha raggiunto ugualmente gradazioni alcoliche intorno al 5% (Tab. 8). Paragonabile al comportamento fermentativo di questo ultimo lievito è quello del ceppo n. 26, appartenente alla specie *H. valbyensis,* rispetto al quale tuttavia ha notevolmente rallentato dopo l'11° giorno l'attività fermentativa; la massima produzione di alcol è risultata comunque discreta raggiungendo una concentrazione del 4%. I ceppi n. 20 e 24, appartenenti rispettivamente alle specie *H. uvarum* e *H. vinae,* hanno mostrato un lento avvio della fermentazione e una produzione di CO_2 in lento ma costante aumento fino a circa il 24° giorno di fermentazione e, pur raggiungendo al termine della fermentazione quantitativi di CO_2 simile a quelli dei ceppi n. 27 e 28, hanno mostrato un più basso coefficiente di resa alcolica, raggiungendo concentrazioni di etanolo intorno al 3%. I restanti sei lieviti apiculati hanno presentato in generale un basso potere fermentativo. In

particolare, la concentrazione alcolica raggiunta è risultata compresa tra il 3 e il 4% (n. 21, 23, 25 e 30), ad eccezione di due ceppi (n. 29 e 31) per i quali il livello di etanolo raggiunto era di circa l'1%.
La produzione di acidità volatile è risultata compresa tra 0,4-0,5 g/l di ac. acetico per il 55% dei ceppi e tra 0,6-0,8 g/l per il restante 45% e, comunque, con buoni valori di purezza fermentativa (Tab. 8). Per quanto riguarda i polisaccaridi, nel fermentato del ceppo *H. vineae* é stata riscontrata la concentrazione più elevata (323 mg/l); anche nei fermentati dei ceppi *H. uvarum* (n. 20, 23 e 31) e *H. osmophila* (n. 32) la concentrazione era comunque elevata e compresa tra 180 e 240 mg/l. Nei restanti fermentati la concentrazione era compresa tra 120 e 160 mg/l (Fig. 7).

- *Pichia*

Tra i 18 ceppi appartenenti al genere *Pichia* (Fig. 8), quelli relativi alla specie *P. membranifaciens* (n. 8, 12, 15, 17 e 18) hanno presentato una bassissima produzione di CO_2 che, dopo ancora 50 giorni di fermentazione, è risultata < 1 g, ad eccezione del ceppo n. 8 che, se pur bassa, a parità di tempo produceva un quantitativo 5 volte superiore agli altri ceppi della stessa specie. Tutti e 5 i ceppi di *P. membranifaciens* non hanno comunque raggiunto l'1% di etanolo. Un simile andamento fermentativo si è registrato anche per i due ceppi appartenenti alla specie *P. fluxum* (n. 11 e 13). Il ceppo n. 16 di *P. kluyvery* ha invece mostrato un profilo molto simile al ceppo n. 8. I restanti ceppi, pur con andamenti fermentativi simili, hanno mostrato diversi poteri fermentativi. In particolare, tutti e 6 i ceppi appartenenti alla specie *P. fermentans* (n. 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e i due della specie *P. anomala* (n. 9 e 110) hanno mostrato i valori più alti di CO_2 svolta, raggiungendo gradazioni alcoliche comprese tra 4,5-7% (Tab. 9). Solo il ceppo *P. guilliermo*ndi (n. 7) ha presentato un profilo fermentativo

differente, con una produzione di CO_2 in lento ma costante aumento fino circa all'11° giorno, momento in cui sono stati raggiunti quantitativi di CO_2 pari a 3,6 g, (corrispondenti a circa il 60% della sua massima attività fermentativa) per poi iniziare a diminuire drasticamente la sua attività.
Valori tendenzialmente alti di acidità volatile, con valori intorno a 0,7 g/l di acido acetico, sono stati registrati per la gran parte dei ceppi. Bassi valori di acidità volatile sono stati rilevati solo per i ceppi n. 8 e 99, che d'altra parte avevano però presentato una bassissima attività fermentativa (Tab. 9). Per quanto riguarda la produzione di polisaccaridi si è osservata una grande variabilità non solo interspecifica ma anche intraspecifica. Così ad esempio, i ceppi di *P. fermentans,* che hanno presentato tra loro un simile comportamento fermentativo, hanno invece mostrato nei relativi fermentati, livelli molto differenti di polisaccaridi, con valori compresi tra 150 e 300 mg/l. Meno variabile è stata la quantità registrata tra i fermentati dei ceppi appartenenti alla specie *P. membranifaciens* (190 e 260 mg/l). Nei fermentati delle restanti specie si è osservato un elevato livello di polisaccaridi (170-230 mg/l) ad eccezione del fermentato del ceppo 99 *Pichia spp*. (90 mg/l) (Fig. 8).

- *Saccharomycodes*

I 12 ceppi di *Saccharomycodes* (Fig. 9), tutti appartenenti alla specie *S. ludwigii,* hanno mostrato differenti poteri fermentativi. Dopo il 14° giorno di fermentazione, raggiunti livelli di CO_2 compresi tra 5 e 10 g, (44-64% della loro massima attività fermentativa), quasi tutti i ceppi hanno iniziato a rallentare più o meno drasticamente la loro attività. In particolare si possono distinguere due gruppi: uno comprendente i ceppi n. 57, 59, 61, 63, 64, 65 e 66, con una produzione alcolica compresa tra 7,5 e 10% e l'altro, con i ceppi n. 55, 56, 58 e 60, con una più bassa produzione

compresa tra 5,3 e 7,3%. Fa eccezione il ceppo n. 62 che ha iniziato a rallentare la sua attività dopo 28 giorni di fermentazione (80% della sua massima attività fermentativa) raggiungendo una più elevata gradazione alcolica (~11%) rispetto agli altri ceppi (Tab. 10).
L'acidità volatile è risultata mediamente bassa in tutti i fermentati, con valori compresi tra 0,3 e 0,5 g/l di acido acetico. Anche la purezza fermentativa è risultata molto buona per tutti i ceppi in esame. Per quanto riguarda la quantità di polisaccaridi sono stati rilevati valori abbastanza simili con concentrazioni comprese tra 200 e 250 mg/l, ad eccezione dei fermentati dei ceppi 61 e 64 (rispettivamente 280 e 320 mg/l) (Fig. 9).

- *Zygosaccharomyces*

Tra i 18 lieviti appartenenti al genere *Zygosaccharomyces* (Fig. 10) si è evidenziata una notevole variabilità nel comportamento fermentativo. In particolare si possono distinguere tre profili fermentativi: il primo profilo, al quale si possono ascrivere tre ceppi appartenenti alla specie *Z. florentinus* (n. 41, 42 e 43) e uno alla specie *Z. fermentati* (n. 91), è caratterizzato dalle più alte velocità di fermentazione comprese tra 0,9 e 1,1 g CO_2/gg, in costante aumento fino all'11° giorno dopo il quale, raggiunti livelli di CO_2 compresi tra 9,5 e 11 g (70-76% della loro massima attività fermentativa), è iniziato un rallentamento dell'attività. Questi quattro ceppi hanno raggiunto concentrazioni alcoliche comprese tra 7 e 8%. Il secondo profilo fermentativo, nel quale possono essere inclusi quattro ceppi appartenenti alla specie *Z. bailii* (n. 80, 84, 88 e 89) e uno al ceppo *Z. bisporus* (n. 85), pur presentando velocità iniziali più basse rispetto al precedente profilo e comprese tra 0,3 e 0,5 g CO_2/gg, ha mostrato le gradazioni alcoliche più elevate (8,5-10%) (Tab. 11). In un terzo profilo fermentativo possono essere inclusi, anche se con

andamenti fermentativi differenti, tutti i restanti ceppi (n. 82, 83, 86, 87, 90, 96, 97 e 98) che hanno presentato oltre a basse velocità fermentative al 4° giorno di fermentazione, comprese tra 0,1 e 0,3 g CO_2/gg (ad eccezione del ceppo 96 con una velocità di 0,7 g CO_2/gg), anche i più bassi poteri fermentativi, raggiungendo concentrazioni alcoliche comprese tra 5,5 e 7,5%. Il ceppo di *Z. rouxii* (n. 81) ha presentato comunque la più bassa attività fermentativa raggiungendo una gradazione alcolica del 4,5%.
Per quanto riguarda l'acidità volatile, solo sei ceppi presentavano i valori più alti e compresi tra 0,6 e 0,8 g/l di acido acetico; per i restanti ceppi i valori erano mediamente bassi oscillando tra 0,2 e 0,5 g/l di acido acetico. Buona comunque per tutti i ceppi la purezza fermentativa. La quantità di polisaccaridi, elevata in gran parte dei vari fermentati, è risultata comunque eterogenea sia a livello interspecifico che intraspecifico. In particolare, la quantità rilevata oscillava tra 130 e 230 mg/l nei fermentati della specie *Z. bisporus*, tra 160 e 250 mg/l in quelli della specie *Z. bailii* e tra 160 e 240 mg/l in quelli della specie *Z. florentinus.* Nei fermentati delle due uniche specie, *Z. fermentati* e *Z. rouxii*, sono stati riscontrati valori rispettivamente di 200 e 224 mg/l (Fig. 10).

- *Schizosaccharomyces*

Il singolo ceppo esaminato di *Schizosaccharomyces pombe* (n. 95) (Fig. 11) ha presentato un comportamento fermentativo simile a uno (n. 49) dei tre ceppi di *S. cerevisiae,* raggiungendo una gradazione alcolica di 10,4% (Tab. 12). Bassa l'acidità volatile e buona la purezza fermentativa. Il dato più interessante per questo lievito è risultato l'elevato livello di polisaccaridi (712 mg/l), valore che sembra correlato alla particolare composizione della parete cellulare di questo lievito.

- *Issatchenkia*

L'unico ceppo di *Issatchenkia terricola* (n. 14) esaminato ha mostrato una bassa produzione di CO_2 (~4 g) dopo 60 giorni di fermentazione (Fig. 11) e quindi una scarsa produzione di etanolo (~3%) (Tab. 12). La quantità di polisaccaridi rilevata nel fermentato è stata pari a 163 mg/l (Fig. 11).

- *Saccharomyces*

In figura 11 e in tabella 12 sono riportati le cinetiche fermentative e i principali parametri enologici ottenuti dalle fermentazioni con i tre ceppi di *Saccharomyces*, al fine di un confronto con quelli ottenuti dalle fermentazioni con i lieviti non-*Saccharomyces*.

.

4.1.4. Figure e tabelle I anno di ricerca

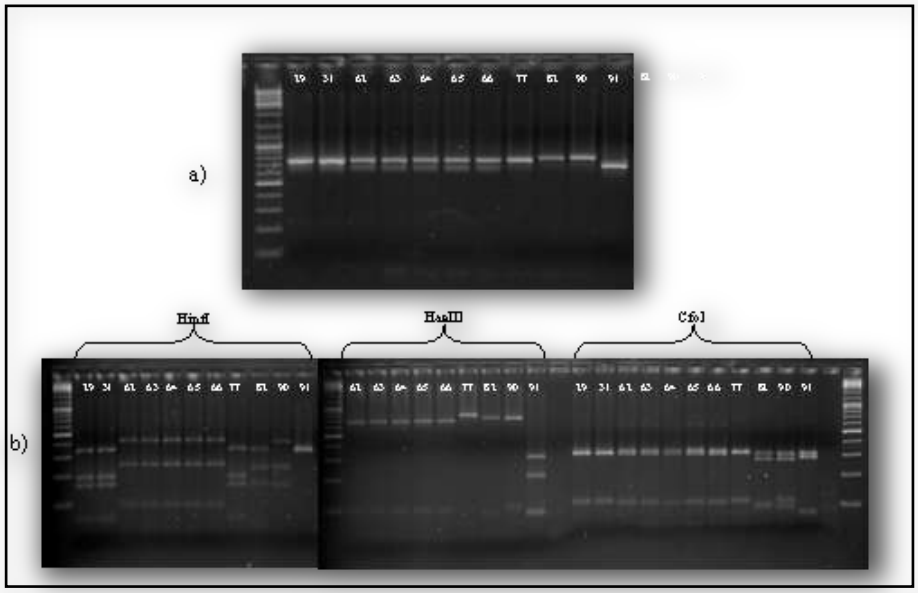


Figura 1: esempi (a) di profili dei prodotti di amplificazione ottenuti da DNA genomico con i primer ITS1 e ITS4 e (b) di profili dei prodotti di digestione ottenuti con gli enzimi HinfI, HaeIII e CfoI sugli amplificati ITS degli isolati di alcuni dei lieviti esaminati

Sequencing Summary

Template	Primer	Status	LeftClip	RightClip	Length
30	NL0		14	491	477
42	NL0		13	628	615
87	NL0		15	629	614

Fasta sequences:

> 30_NL0 -- 14..491 of sequence
ATATCAATAAGCGGAGGAAAGAAACCAACTGGGATTACCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCT
CAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTC
TATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAAAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAG
ACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAA
TATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTG
AAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCC
TCTCGTGGGCTTGGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAG

> 42_NL0 -- 13..628 of sequence
ATATCAATAAGCGGAGGAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTTTTGGGGCCGGTTCTT
GTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTATGGCGAGGACTTGAGCTCCTTGT
AAAGCGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCT
AAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAG
AGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGCGTTTTGCGCCCTTTGC
TCCTTGTGGGCGGAGGAATCTCGCAGCTCGCTGGGCCAGCATCGGTTTTTGCGGCAGCAGAAAACCTAGG
GAACGTAGCTTGTGTCTTTGACTCAAGAACTTATAGCCCTGGGGAATACTGCCAGCGGGGACCGAGGACT
GCGGTGCTTGTCACCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTAACACA

> 87_NL0 -- 15..629 of sequence
ATATCAATAAGCGGAGGAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTCTGGGGCTGGTCCTTG
TCTATGTTCCTTGGAACAGGAAGTCATGGAGGGTGAGAATCCCGTATGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTA
GAGTGCCTTCGAAAAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCACCTCTAAGTGGGGGGGAAATTCCATCTAAAGCTA
AATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGA
GTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGGGTTTTGCGCCCCTCGCC
TCTCGTGGGGGGGGGAATCTCGCAGTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATCCCTGGG
AATGTAGCTCTACCACTTCGTGGCGGACGAACTTATAGTCCAGGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGA
ATGCGACTTTTAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGAAAC

Figura 2: sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rDNA dei ceppi n. 30, 42 e 87

Tabella 1: ceppi di lievito

ceppo	Specie
1	*P. fermentans*
2	*P. fermentans*
3	*P. fermentans*
4	*P. fermentans*
5	*P. fermentans*
6	*P. fermentans*
7	*P. guilliermondii*
8	*P. membranifaciens*
9	*P. anomala*
10	*C. diversa*
11	*P. fluxuum*
12	*P. membranifaciens*
13	*P. fluxuum*
14	*I. terricola*
15	*P. membranifaciens*
16	*P. kluyveri*
17	*P. membranifaciens*
18	*P. membranifaciens*
19	*H uva rum*
20	*H. uva rum*
21	*H. uva rum*
22	*C. zemplinina*
23	*H. uva rum*
24	*H. vineae*
25	*H. osmophila*
26	*H. valbyensis*

ceppo	Specie
54	*M. pulcherrima*
55	*S. ludwigii*
56	*S. ludwigii*
57	*S. ludwigii*
58	*S. ludwigii*
59	*S. ludwigii*
60	*S. ludwigii*
61	*S. ludwigii*
62	*S. ludwigii*
63	*S. ludwigii*
64	*S. ludwigii*
65	*S. ludwigii*
66	*S. ludwigii*
67	*C. beechii*
68	*C. montana*
69	*C. tropicalis*
70	*C. apicola*
71	*C. apicola*
73	*C. bombicola*
74	*C. vinaria*
75	*C. vinaria*
76	*C. canterellii*
77	*C. apicola*
79	*C. vinaria*
80	*Z. bailii*
81	*Z. rouxii*

27	*H. osmophila*	82	*Z. bailii*
28	*H. valbyensis*	83	*Z. bisporus*
29	*H. uvarum*	84	*Z. bailii*
30	*H. uvarum*	85	*Z. bisporus*
31	*H. uvarum*	86	*Z. bisporus*
32	*H. osmophila*	87	*Z. bailii*
33	*T. delbrueckii*	88	*Z. bailii*
34	*T. delbrueckii*	89	*Z. bailii*
35	*T. delbrueckii*	90	*Z. bisporus*
37	*T. delbrueckii*	91	*Z. fermentati*
38	*T. delbrueckii*	92	*T. delbrueckii*
39	*T. delbrueckii*	93	*K. thermotolerans*
40	*T. delbrueckii*	94	*T. delbrueckii*
41	*Z. florentinus*	95	*S. pombe*
42	*Z. florentinus*	96	*Z. florentinus*
43	*Z. florentinus*	97	*Z. bisporus*
44	*S. cerevisiae*	98	*Z. bisporus*
45	*M. pulcherrima*	99	*Pichia spp*
46	*M. pulcherrima*	101	*K. thermotolerans*
47	*M. pulcherrima*	102	*S. cerevisiae*
48	*M. pulcherrima*	103	*K. thermotolerans*
49	*S. cerevisiae*	105	*K. thermotolerans*
52	*M. pulcherrima*	107	*K. thermotolerans*
53	*M. pulcherrima*	110	*P. anomala*

Tabella 2: risultati dei caratteri enologici esaminati mediante saggi su piastra

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Candida	10	4	3	2	0	0	0	0
	22	2	5	0	0	0	0	0
	67	4	2	2	0	0	0	0
	68	4	3	1	0	0	0	0
	69	4	3	1	0	0	0	0
	70	3	3	2	0	0	0	0
	71	3	3	2	0	0	0	0
	73	1	4	1	0	0	0	0
	74	2	3	1	0	0	0	0
	75	2	2	1	0	0	0	0
	76	2	3	1	0	0	0	0
	77	2	3	0	0	0	0	0
	79	3	3	1	0	0	0	0

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Hanseniaspora	19	3	3	2	0	0	0	0
	20	2	3	0	1	0	0	0
	21	2	2	1	1	0	0	0
	23	1	2	0	1	0	1	0
	24	3	5	1	0	0	0	0
	25	2	5	1	1	0	0	0
	26	2	2	1	1	0	0	0
	27	3	4	1	1	0	0	0
	28	2	4	2	1	0	0	0
	29	2	3	1	0	0	0	0
	30	2	2	1	1	0	0	0
	31	2	2	1	1	0	0	0
	32	2	4	1	0	0	0	0

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Kluyvero-myces	93	1	3	0	1	0	0	0
	101	2	3	0	1	0	0	0
	103	1	3	1	1	0	0	0
	105	2	5	0	0	0	0	0
	107	1	4	1	0	0	0	0
Metschnikowia	45	3	2	2	1	1	0	1
	46	2	2	1	1	1	0	1
	47	3	2	0	1	1	0	1
	48	3	3	0	1	1	0	1
	52	2	3	1	1	1	0	1
	53	3	3	1	0	0	0	1
	54	2	3	1	0	0	0	1

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Pichia	1	2	5	2	0	0	0	0
	2	3	5	1	0	0	1	0
	3	3	4	1	0	0	1	0
	4	2	5	1	0	0	0	0
	5	2	5	2	0	0	0	0
	6	2	5	2	0	0	0	0
	7	2	4	2	0	0	0	0
	8	2	3	1	0	0	0	0
	9	2	4	2	0	0	0	1
	11	3	5	2	0	0	0	0
	12	4	2	1	0	0	1	0
	13	2	4	1	0	0	0	0
	15	4	4	2	1	0	1	0
	16	4	4	1	0	0	0	0
	17	4	4	2	0	0	0	0
	18	4	2	1	0	0	1	0
	99	1	3	2	0	0	0	0

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Torulaspora	33	4	3	2	0	0	0	0
	34	0	3	0	1	0	0	0
	35	4	3	0	0	0	0	0
	37	3	4	1	0	0	0	0
	38	4	4	1	1	0	0	0
	39	2	3	1	0	0	0	0
	40	2	3	0	0	0	0	0
	92	4	4	0	0	0	0	0
	94	2	4	0	0	0	0	0

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Saccharomycodes	55	4	3	1	0	0	1	0
	56	4	5	0	0	0	1	0
	57	4	5	0	0	0	0	0
	58	4	4	0	0	0	0	0
	59	4	5	0	0	0	0	0
	60	4	3	0	0	0	0	0
	61	3	5	0	0	0	0	0
	62	4	2	0	0	0	0	0
	63	2	3	0	0	0	0	0
	64	3	5	1	0	0	0	0
	65	3	3	1	0	0	0	0
	66	4	3	0	0	0	0	0

Genere	Ceppo	Resistenza solforosa[1]	Produzione H_2S[2]	Attività esterasica[3]	Attività glucosidasica[4]	Attività glicosidasica[5]	Attività proteasica[6]	Carattere killer[7]
Zygosaccharomyces	41	3	4	1	0	0	0	0
	42	3	4	1	0	0	0	0
	43	3	4	1	0	0	0	0
	80	2	3	2	0	0	0	0
	81	4	5	1	0	0	0	0
	82	2	2	2	0	0	0	0
	83	2	4	2	0	0	0	0
	84	2	3	1	0	0	0	0
	85	2	3	1	0	0	0	0
	86	2	4	1	0	0	0	0
	87	1	2	0	0	0	0	0
	88	2	4	0	0	0	0	0
	89	2	4	1	0	0	0	0
	90	2	4	2	0	0	0	0
	91	2	4	0	0	0	0	0
	96	2	4	1	0	0	0	0
	97	4	3	2	0	0	0	0
	98	4	3	1	0	0	0	0

[1] *Sviluppo in presenza di concentrazioni crescenti di SO_2 ; 1=10 mg/l, 2=20 mg/l, 3=40 mg/l, 4=60 mg/l*

[2] *Valutata in base all' intensità del colore della patina su terreno Biggy. 0=no colore, 5=marrone intenso*

[3] *Valutata sull'intensità della colorazione gialla (da 0 a 2) in seguito all'idrolisi del pNPA.*

[4] *Valutata in base all'imbrunimento della patina dovuta all'idrolisi dell'arbutina. 0=risultato negativo; 4=massimo imbrunimento.*

[5] *Valutata in base formazione di un alone di chiarificazione in seguito all'idrolisi della rutina: 0=assenza, 1=presenza*

[6] *Valutata in base formazione di un alone di chiarificazione dovuto all'idrolisi della caseina: 0=assenza, 1=presenza*

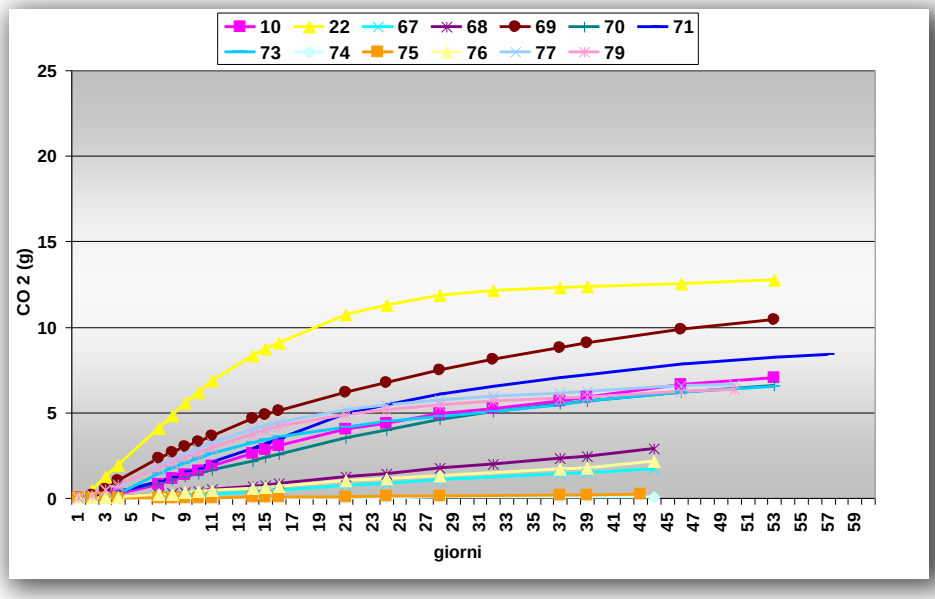
[7] *Valutata come formazione di un alone di inibizione della crescita di un ceppo sensibile: 0=assenza, 1=presenza*

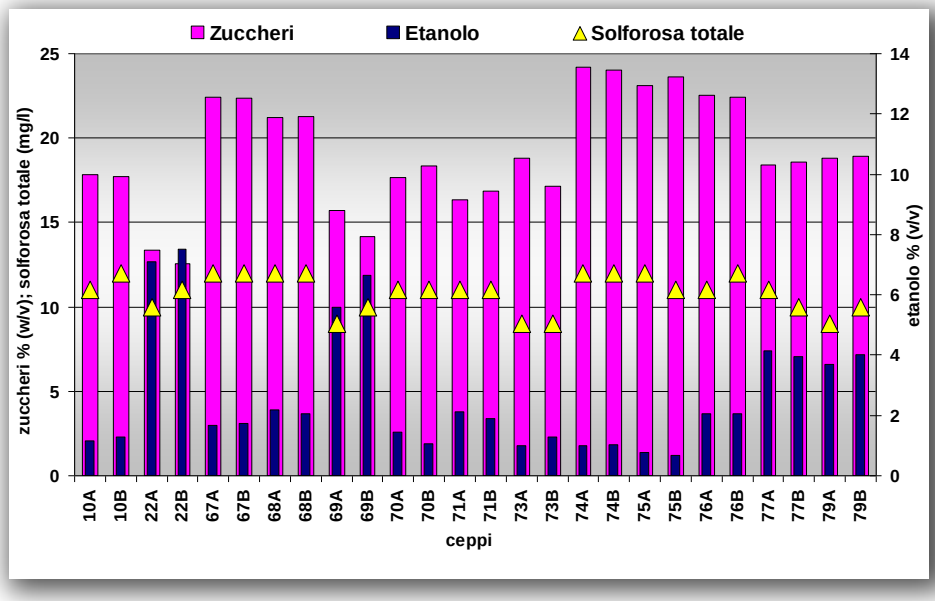
Tabella 3: attività proteolitica e β-glucosidasica condotte in terreno liquido dei ceppi risultati positivi al saggio in piastra

Ceppo	Specie	Attività proteolitica (µ mol/mL)	Attività β-glucosidasica (nmol/mL)
2	*P. fermentans*	1,50	
3	*P. fermentans*	1,80	
12	*P. membranifaciens*	1,90	
15	*P. membranifaciens*	1,77	3,40
18	*P. membranifaciens*	1,54	
19	*H. uvarum*		
20	*H. uvarum*		6,69
21	*H. uvarum*		4,66
23	*H. uvarum*	1,50	7,00
25	*H. osmophila*		8,85
27	*H.osmophila*		4,03
28	*H. valbyensis*		4,81
31	*H. uvarum*		5,43
34	*T. delbrueckii*		5,12
38	*T. delbrueckii*		4,97
45	*M. pulcherrima*		4,19
46	*M. pulcherrima*		2,31
47	*M. pulcherrima*		3,25
48	*M. pulcherrima*		5,12
52	*M. pulcherrima*		6,38
55	*S. ludwigii*	1,32	
56	*S. ludwigii*	0,17	
93	*K. thermotolerans*		3,72
101	*K. thermotolerans*		5,12
103	*K. thermotolerans*		4,66
Saccharomyces cerevisiae (controllo)		0,43	0
Kodamenia laetipori (controllo)		1,35	11,53

Tabella 4: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Candida

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
10	1.22 ±0.08	0.05 ±0.01	0.69 ±0.01	0.57 ±0.03
22	7.30 ±0.30	0.48 ±0.24	0.72 ±0.02	0.10 ±0.00
67	1.71 ±0.04	0.02 ±0.00	0.37 ±0.00	0.22 ±0.01
68	2.11 ±0.10	0.02 ±0.00	0.35 ±0.04	0.17 ±0.01
69	6.12 ±0.76	0.25 ±0.07	0.58 ±0.04	0.09 ±0.01
70	1.26 ±0.28	0.10 ±0.00	0.48 ±0.02	0.39 ±0.10
71	2.00 ±0.17	0.09 ±0.02	0.61 ±0.00	0.31 ±0.03
73	1.14 ±0.20	0.06 ±0.02	0.38 ±0.00	0.34 ±0.06
74	1.01 ±0.01	0.01 ±0.00	0.25 ±0.00	0.25 ±0.00
75	0.72 ±0.06	0.01 ±0.00	0.27 ±0.02	0.37 ±0.00
76	2.04 ±0.00	0.01 ±0.00	0.34 ±0.00	0.17 ±0.00
77	4.05 ±0.13	0.17 ±0.10	0.62 ±0.01	0.15 ±0.01
79	3.85 ±0.24	0.20 ±0.08	0.49 ±0.06	0.13 ±0.01


10
22
67
68
69
70
71
73
74
75
76
77
79
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi
10A
10B
22A
22B
67A
67B
68A
68B
69A
69B
70A
70B
71A
71B
73A
73B
74A
74B
75A
75B
76A
76B
77A
77B
79A
79B

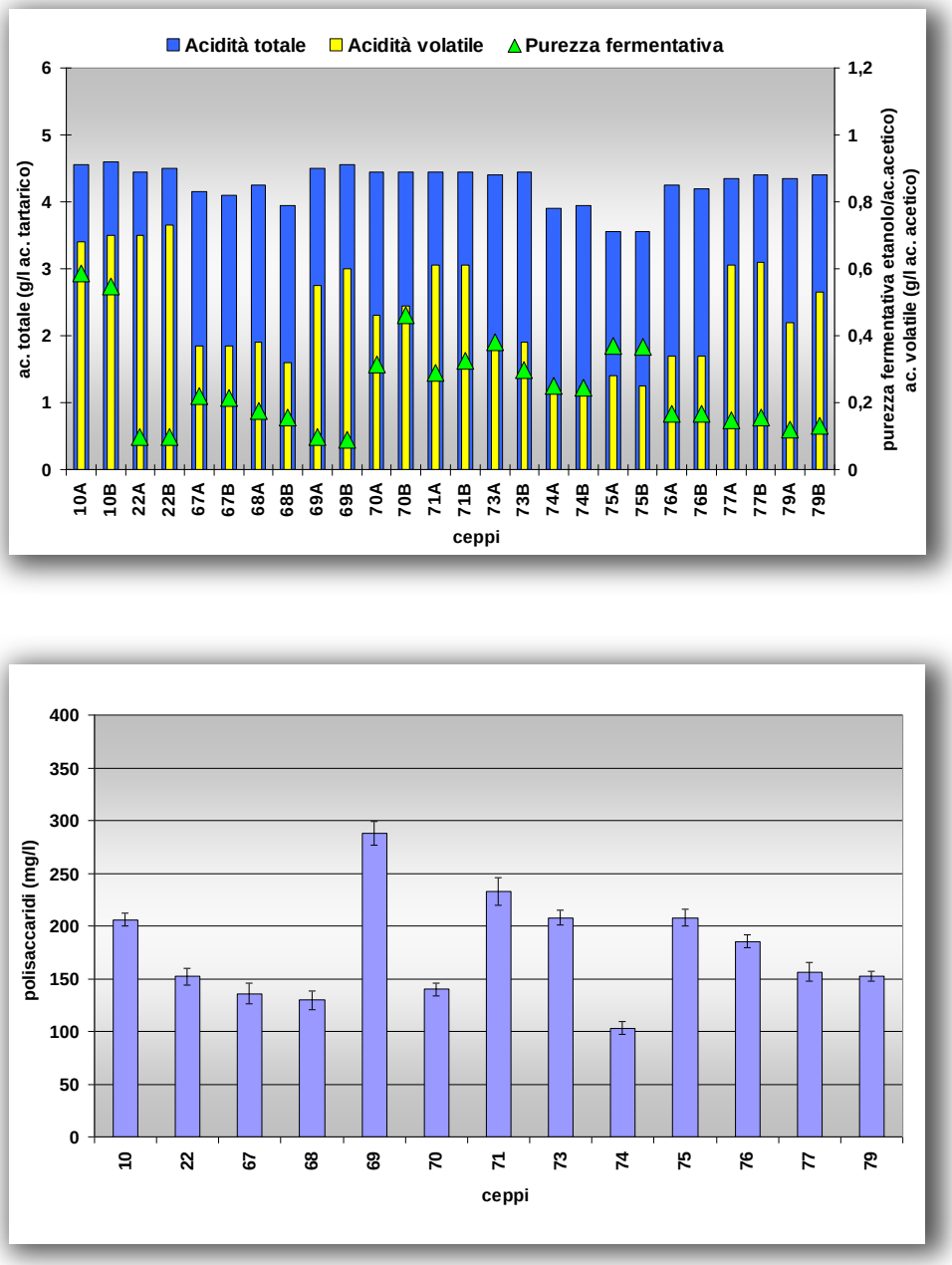
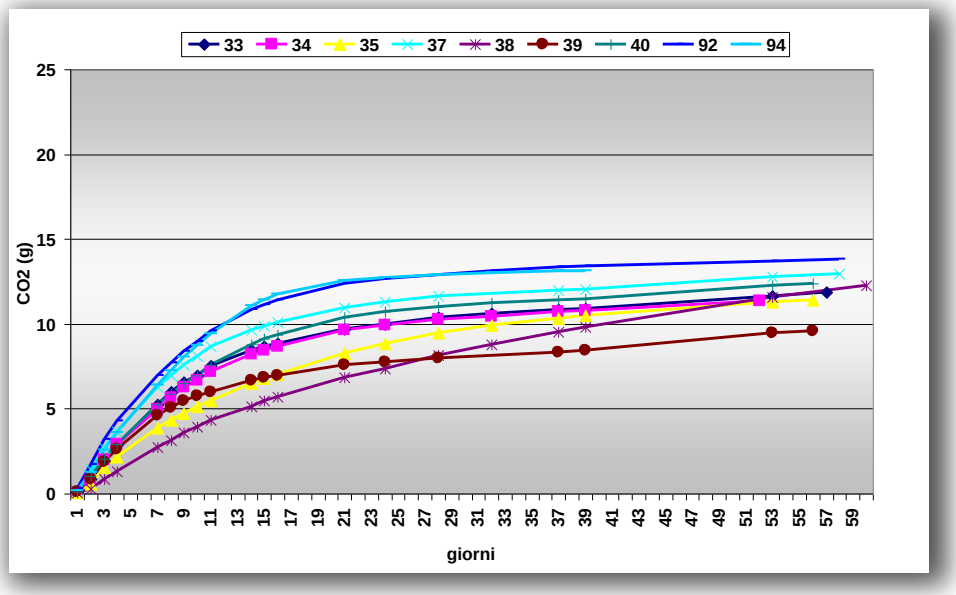
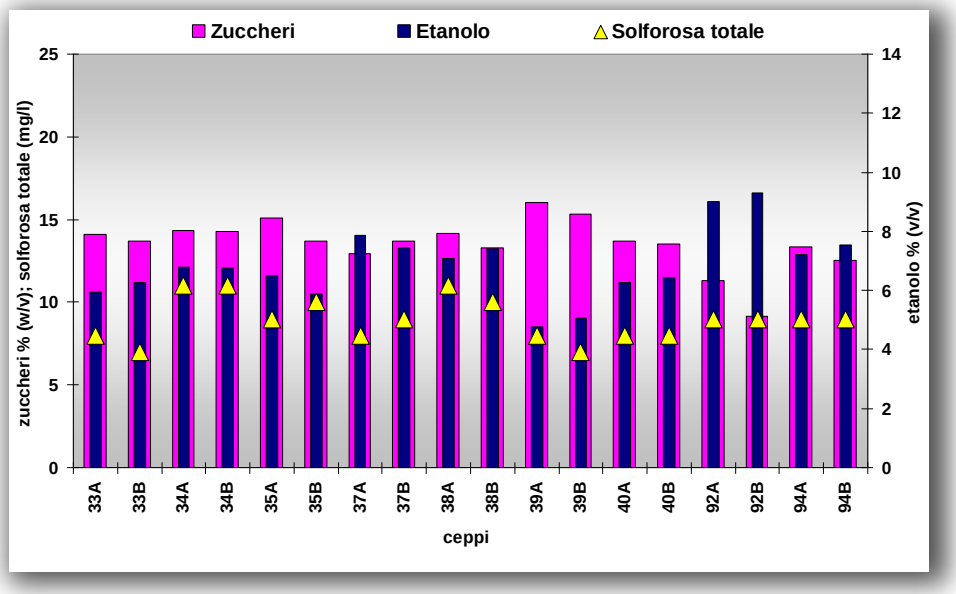


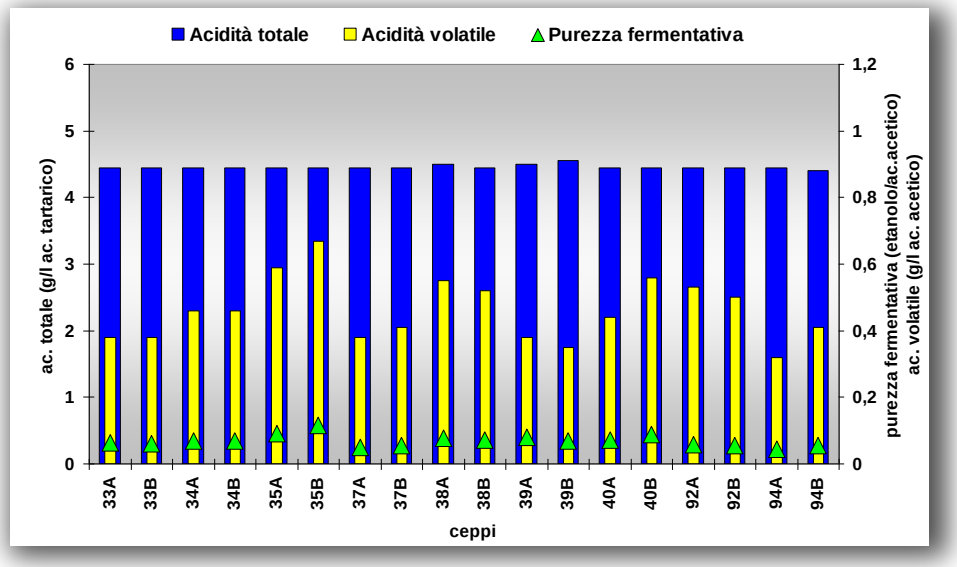
Figura 3: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Candida

Tabella 5: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Torulaspora

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
33	6.09 ±0.24	0.71 ±0.10	0.38 ±0.00	0.06 ±0.00
34	6.77 ±0.04	0.72 ±0.19	0.46 ±0.00	0.07 ±0.00
35	6.18 ±0.45	0.54 ±0.08	0.63 ±0.06	0.10 ±0.02
37	7.66 ±0.31	0.91 ±0.12	0.40 ±0.02	0.05 ±0.00
38	7.24 ±0.23	0.32 ±0.02	0.54 ±0.02	0.07 ±0.01
39	4.91 ±0.20	0.66 ±0.04	0.37 ±0.02	0.07 ±0.01
40	6.35 ±0.12	0.72 ±0.06	0.50 ±0.08	0.08 ±0.01
92	9.16 ±0.20	1.07 ±0.02	0.52 ±0.02	0.06 ±0.00
94	7.37 ±0.24	0.91 ±0.07	0.37 ±0.06	0.05 ±0.01


33
34
35
37
38
39
40
92
94
CO2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi
33A
33B
34A
34B
35A
35B
37A
37B
38A
38B
39A
39B
40A
40B
92A
92B
94A
94B



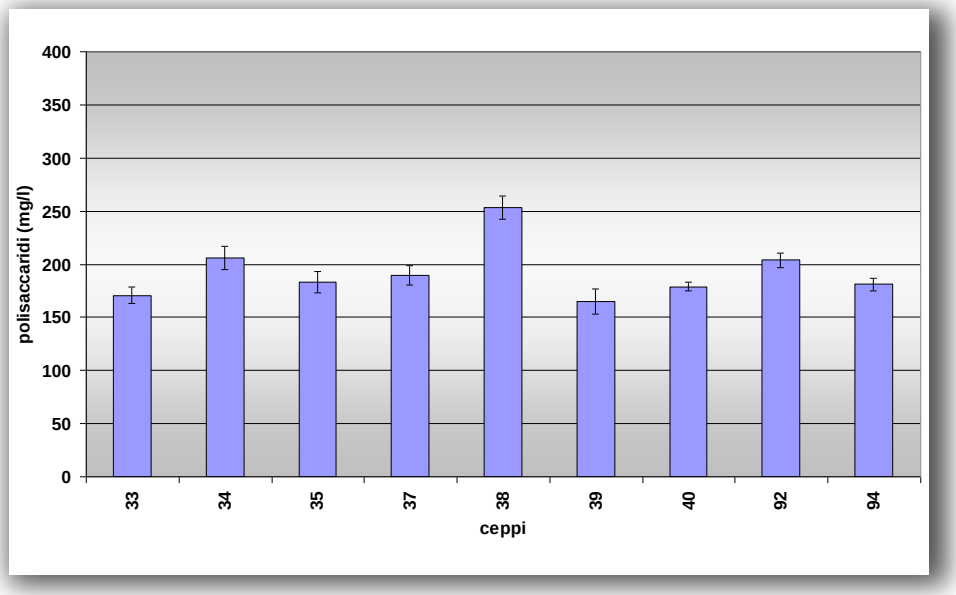
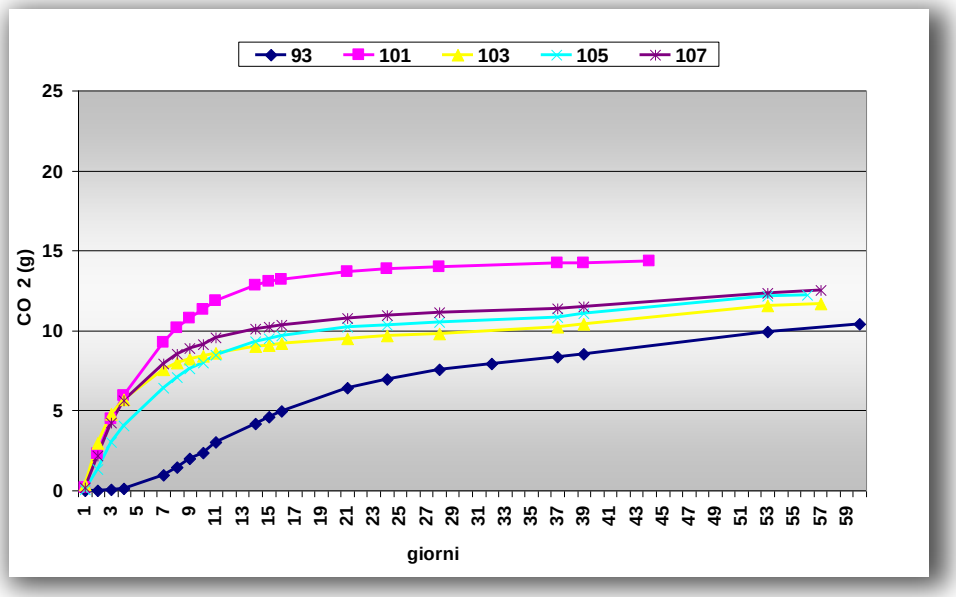
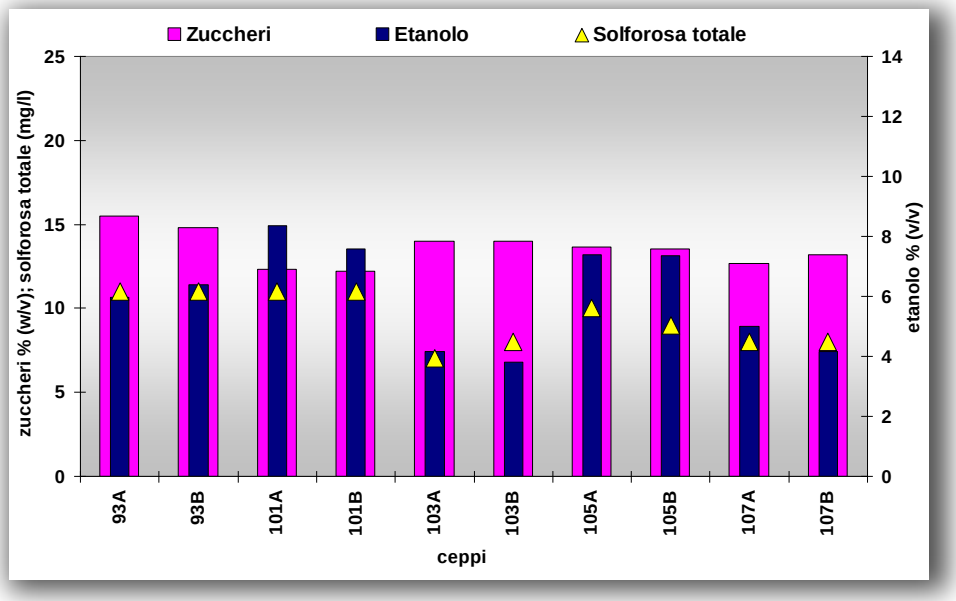


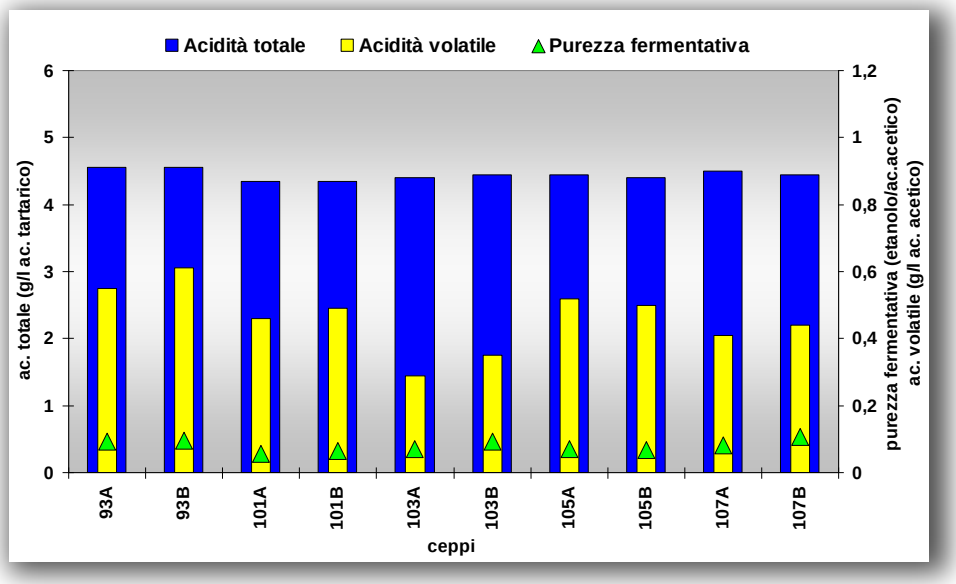
Figura 4: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Torulaspora

Tabella 6: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Kluyveromyces

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
93	6.19 ±0.30	0.03 ±0.01	0.58 ±0.04	0.09 ±0.00
101	7.96 ±0.54	1.49 ±0.19	0.48 ±0.02	0.06 ±0.01
103	3.98 ±0.25	1.43 ±0.06	0.32 ±0.04	0.08 ±0.02
105	7.37 ±0.01	1.02 ±0.01	0.51 ±0.01	0.07 ±0.00
107	4.58 ±0.59	1.40 ±0.41	0.43 ±0.02	0.09 ±0.02


93
101
103
105
107
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
93A
93B
101A
101B
103A
103B
105A
105B
107A
107B
ceppi



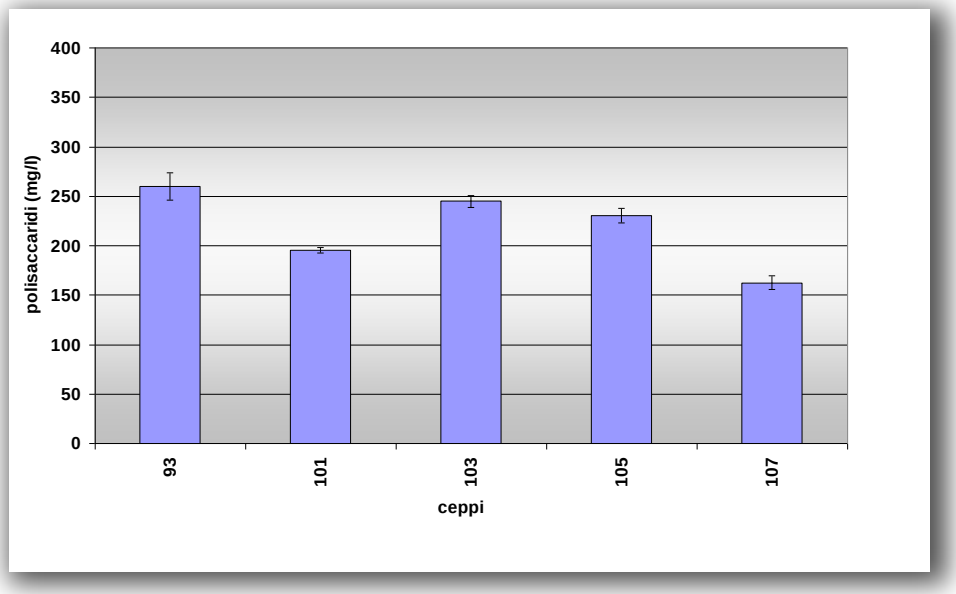
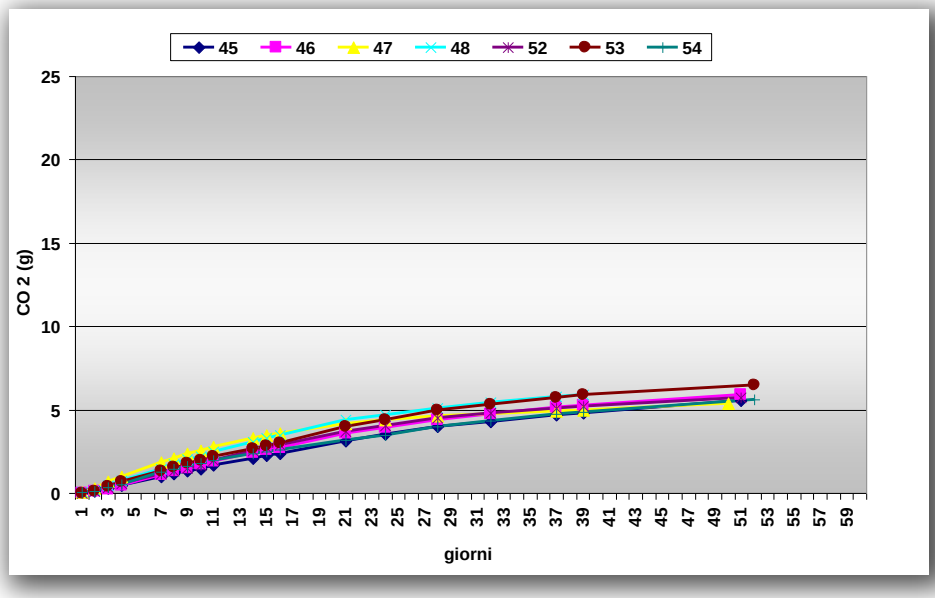
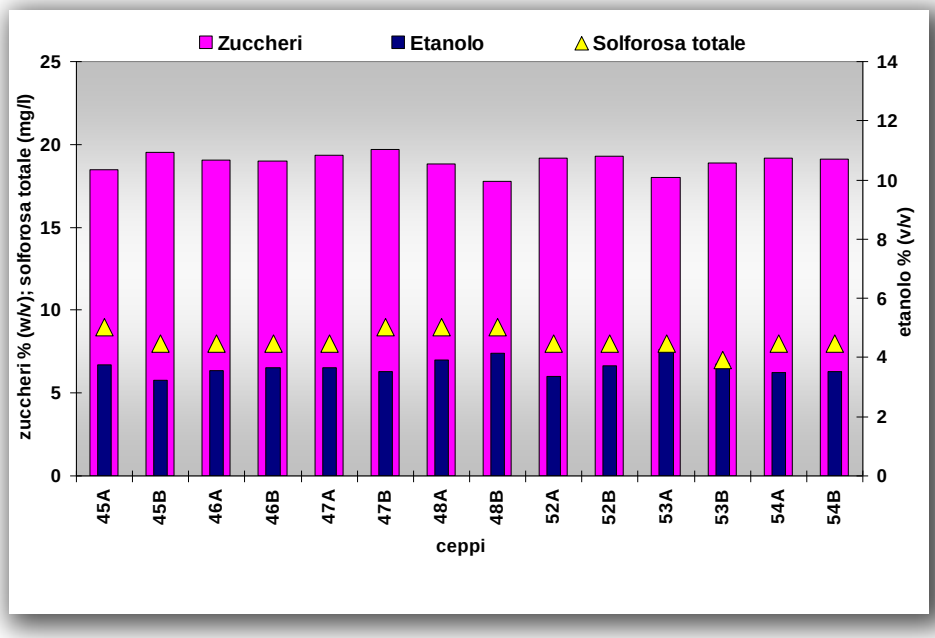


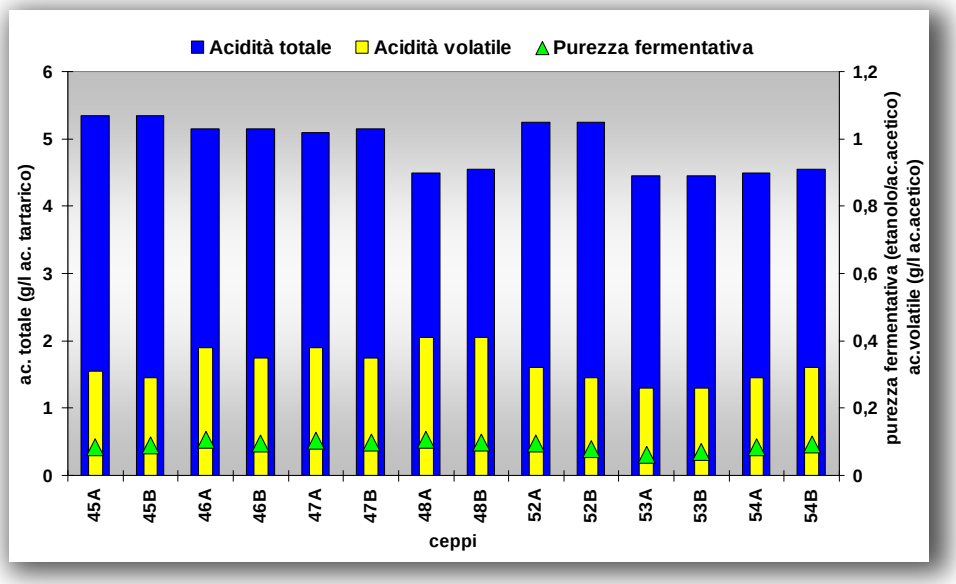
Figura 5: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Kluyveromyces

Tabella 7: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Metschnikowia

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
45	3.50 ±0.37	0.12 ±0.05	0.30 ±0.01	0.09 ±0.00
46	3.61 ±0.07	0.12 ±0.04	0.37 ±0.02	0.10 ±0.01
47	3.60 ±0.08	0.25 ±0.06	0.37 ±0.02	0.10 ±0.00
48	4.02 ±0.17	0.19 ±0.03	0.41 ±0.00	0.10 ±0.00
52	3.54 ±0.25	0.14 ±0.05	0.31 ±0.02	0.09 ±0.01
53	4.04 ±0.34	0.17 ±0.05	0.26 ±0.00	0.06 ±0.01
54	3.50 ±0.03	0.14 ±0.01	0.31 ±0.02	0.09 ±0.01


45
46
47
48
52
53
54
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi
45A
45B
46A
46B
47A
47B
48A
48B
52A
52B
53A
53B
54A
54B



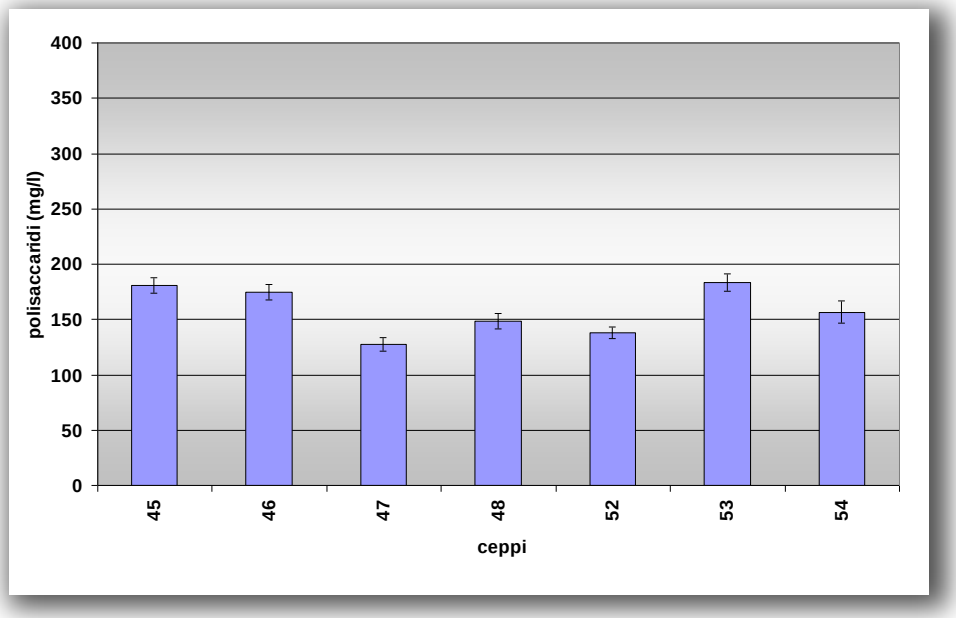
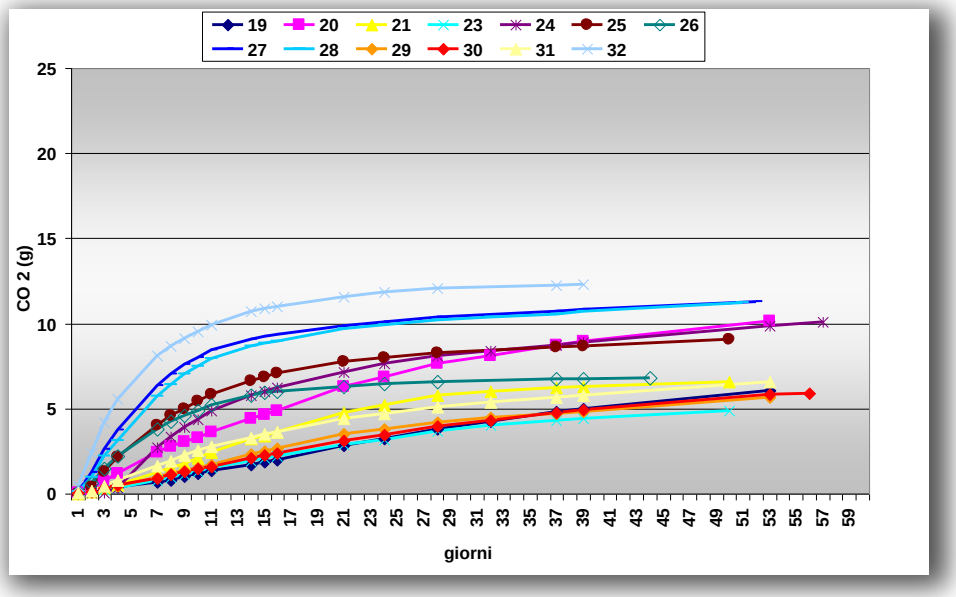
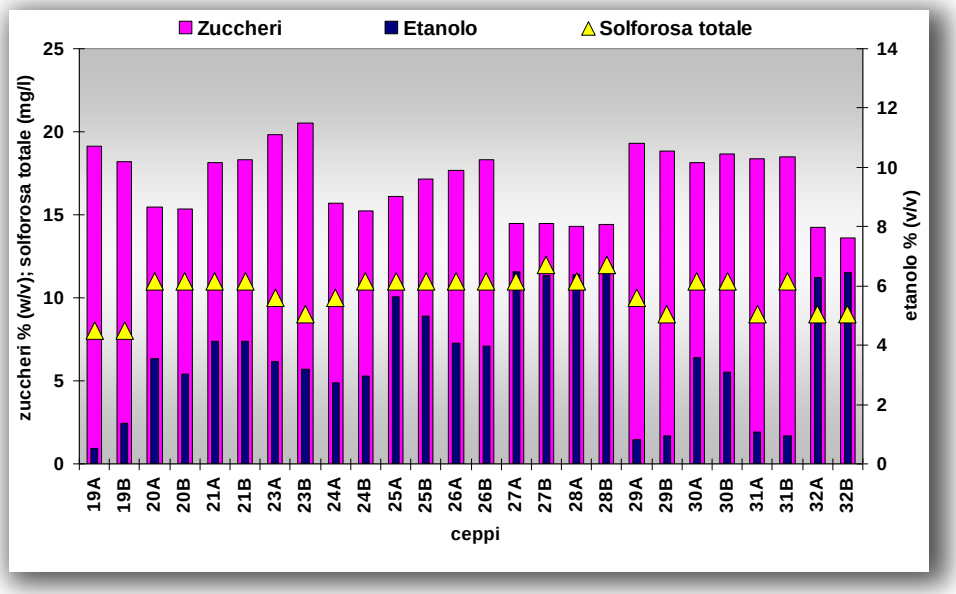


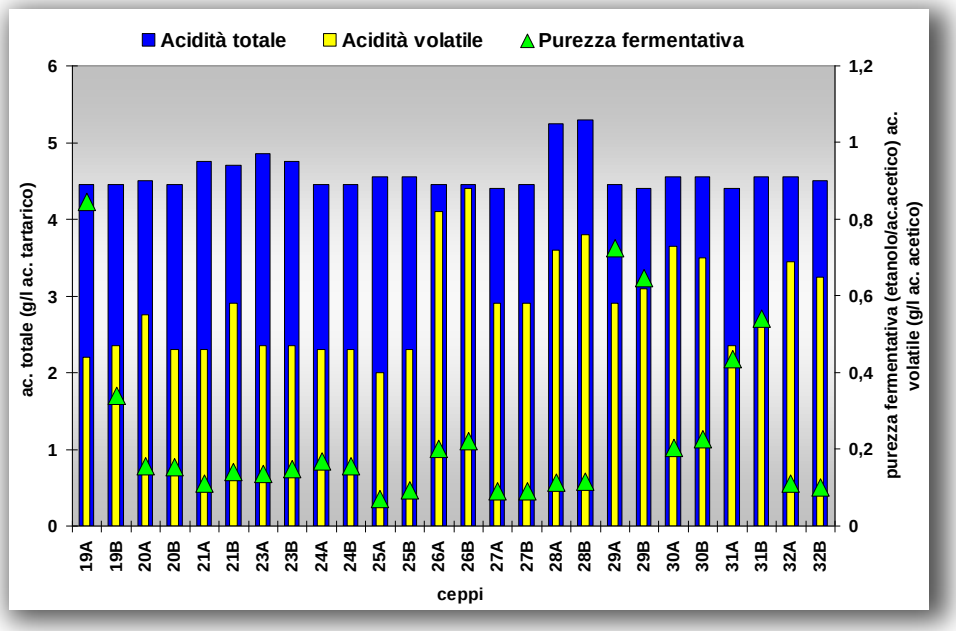
Figura 6: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Metschnikowia

Tabella 8: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Hanseniaspora

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
Ha20	3.28±0.37	0.24±0.04	0.51±0.06	0.15±0.00
Ha21	4.14±0.00	0.12±0.00	0.52±0.08	0.13±0.02
Ha23	3.32±0.20	0.07±0.02	0.47±0.00	0.14±0.01
Ha24	2.85±0.16	0.03±0.00	0.46±0.00	0.16±0.01
Ha25	5.30±0.45	0.43±0.14	0.43±0.04	0.08±0.01
Ha26	4.03±0.07	0.49±0.10	0.85±0.04	0.21±0.01
Ha27	6.41±0.10	0.87±0.21	0.58±0.00	0.09±0.00
Ha28	6.47±0.13	0.74±0.15	0.74±0.03	0.11±0.00
Ha30	3.34±0.34	0.11±0.01	0.72±0.02	0.21±0.02
Ha31	1.02±0.08	0.16±0.02	0.50±0.04	0.49±0.08
Ha32	6.37±0.11	1.40±0.34	0.67±0.03	0.11±0.02


19
20
21
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi
19A
19B
20A
20B
21A
21B
23A
23B
24A
24B
25A
25B
26A
26B
27A
27B
28A
28B
29A
29B
30A
30B
31A
31B
32A
32B



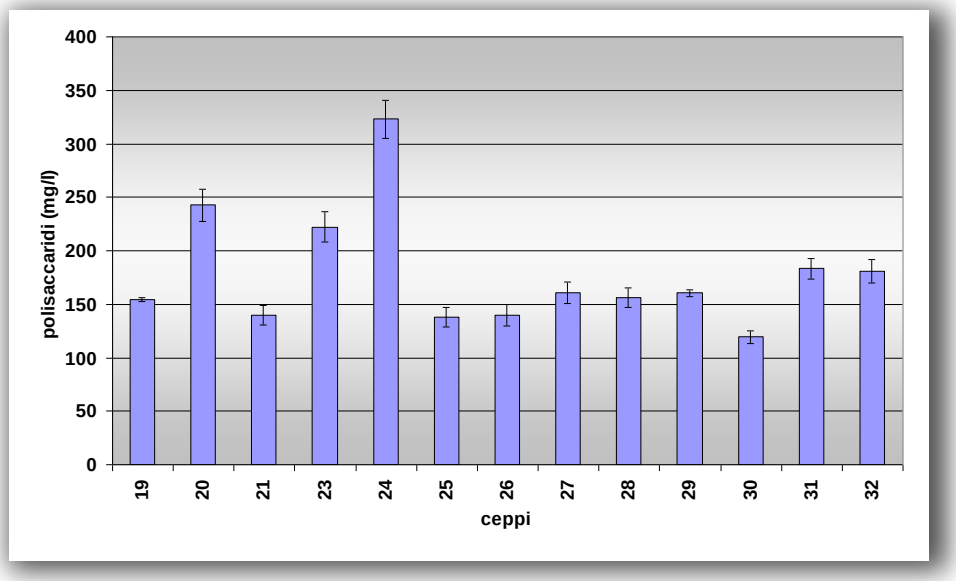
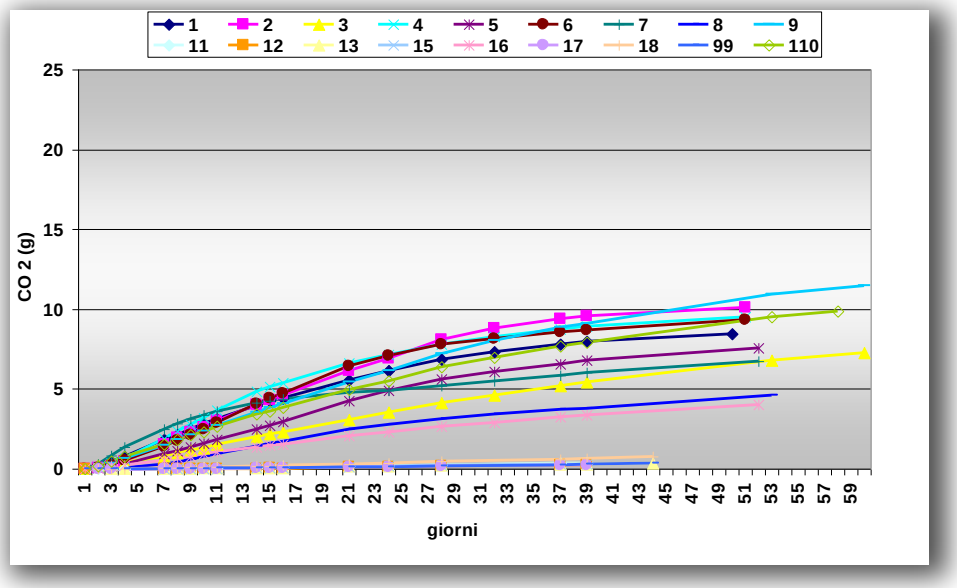
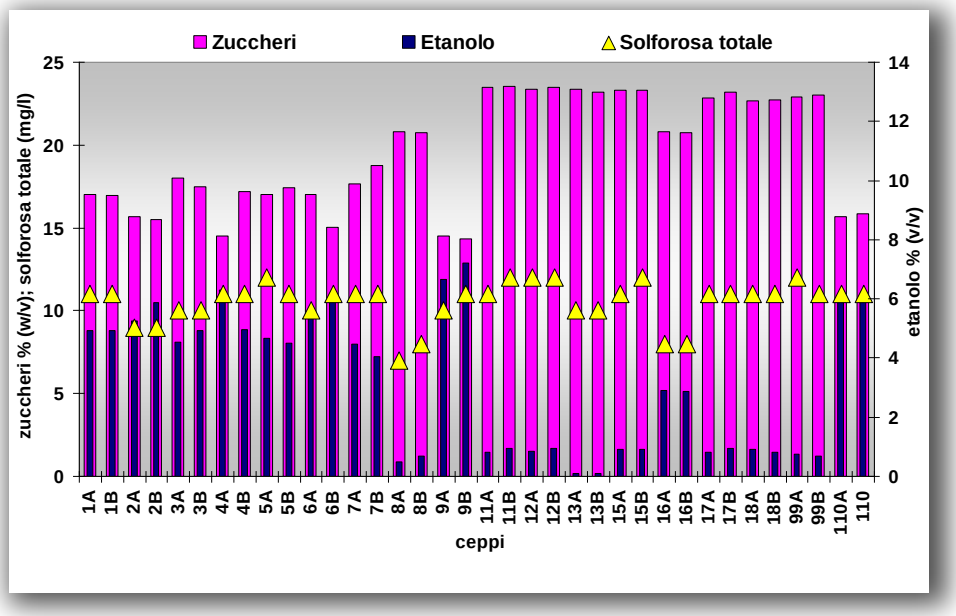


Figura 7: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Hanseniaspora

Tabella 9: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Pichia

Ceppo N.	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac.Volatile (g l^{-1})	Purezza fermentativa
Pi1	4.94±0.00	0.17±0.03	0.72±0.02	0.14±0.00
Pi2	5.55±0.44	0.06±0.00	0.77±0.00	0.14±0.01
Pi3	4.74±0.28	0.11±0.00	0.63±0.02	0.13±0.01
Pi4	5.63±0.95	0.12±0.05	0.79±0.00	0.14±0.02
Pi5	4.59±0.13	0.06±0.03	0.61±0.01	0.13±0.00
Pi7	4.25±0.30	0.27±0.10	0.70±0.00	0.17±0.01
Pi8	0.60±0.14	0.00±0.00	0.28±0.02	0.47±0.07
Pi9	6.94±0.40	0.12±0.02	0.54±0.02	0.08±0.00
Pi11	0.87±0.10	0.00±0.00	0.72±0.02	0.83±0.07
Pi12	0.90±0.06	0.00±0.00	0.66±0.02	0.73±0.07
Pi13	0.10±0.00	0.00±0.00	0.70±0.04	0.00±0.42
Pi15	0.90±0.00	0.00±0.00	0.67±0.00	0.74±0.00
Pi16	2.88±0.03	0.05±0.01	0.47±0.08	0.16±0.03
Pi17	0.87±0.10	0.00±0.00	0.58±0.00	0.67±0.08


1
2
3
4
5
6
7
8
9
11
12
13
15
16
17
18
99
110
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi

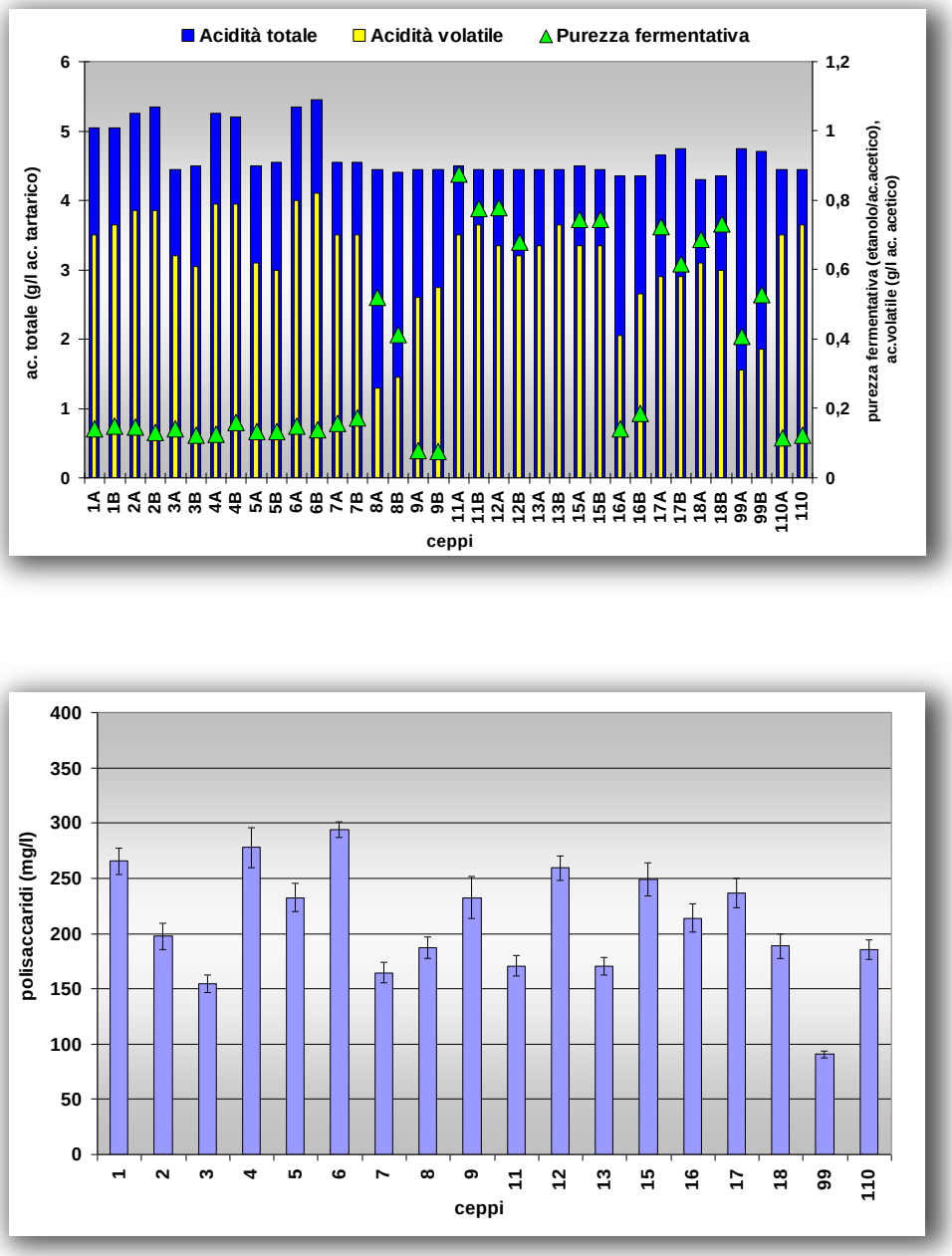
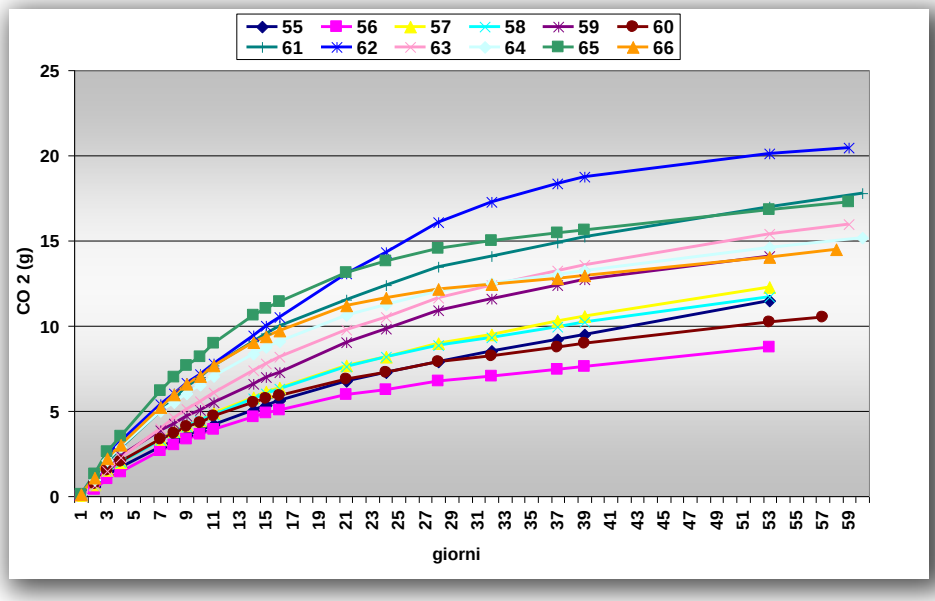
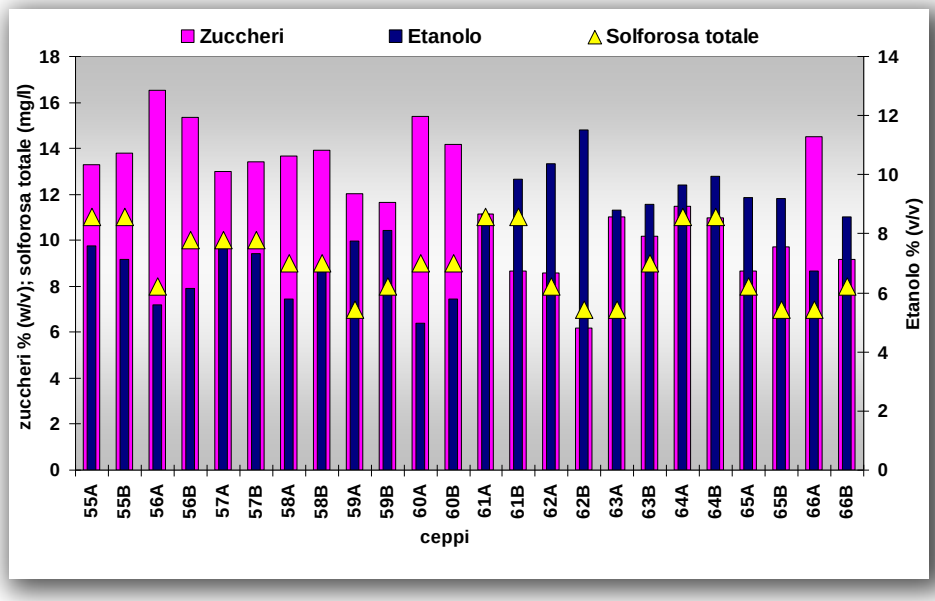


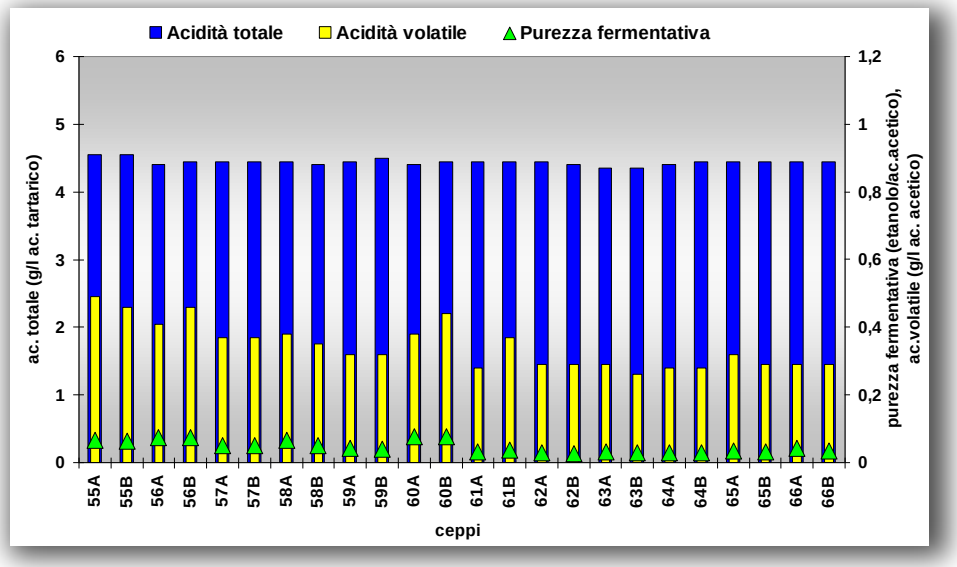
Figura 8: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Pichia

Tabella 10: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Saccharomycodes

Ceppo N.	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile ($g\ l^{-1}$)	Purezza fermentativa
Sd55	7.35±0.33	0.42±0.07	0.48±0.02	0.06±0.00
Sd56	5.87±0.41	0.34±0.12	0.44±0.04	0.07±0.00
Sd57	7.44±0.14	0.51±0.09	0.37±0.00	0.05±0.00
Sd58	6.34±0.79	0.48±0.03	0.37±0.02	0.06±0.01
Sd59	7.94±0.25	0.59±0.03	0.32±0.00	0.04±0.00
Sd60	3.04±0.54	0.52±0.11	0.41±0.04	0.14±0.01
Sd61	9.26±0.85	0.67±0.06	0.33±0.06	0.03±0.00
Sd62	10.95±0.81	0.79±0.43	0.29±0.00	0.03±0.00
Sd63	8.90±0.14	0.49±0.18	0.28±0.02	0.03±0.00
Sd64	9.80±0.23	0.70±0.05	0.28±0.00	0.03±0.00
Sd65	9.22±0.02	0.87±0.03	0.31±0.02	0.03±0.00
Sd66	7.66±1.30	0.73±0.40	0.29±0.00	0.04±0.01


55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
Etanolo % (v/v)
ceppi
55A
55B
56A
56B
57A
57B
58A
58B
59A
59B
60A
60B
61A
61B
62A
62B
63A
63B
64A
64B
65A
65B
66A
66B



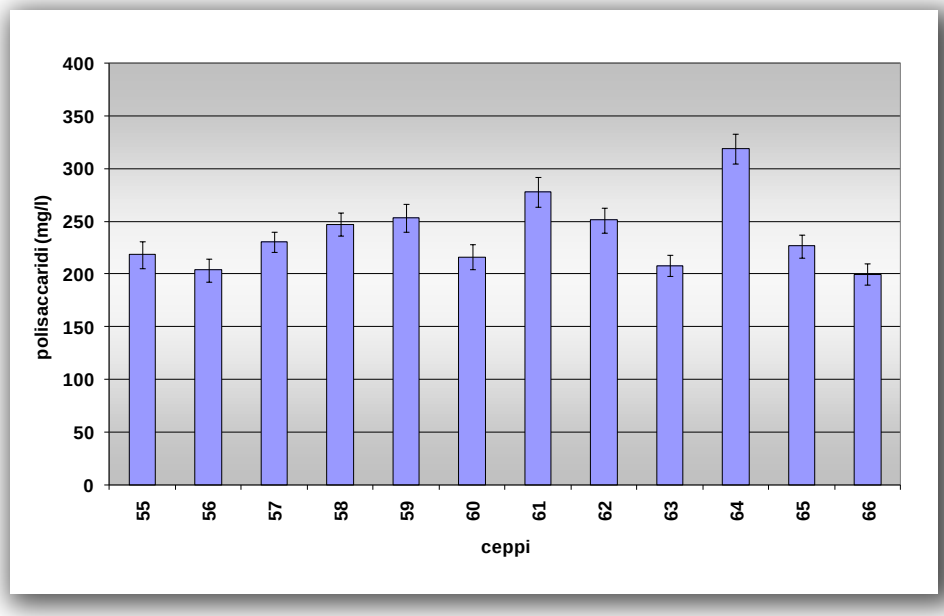
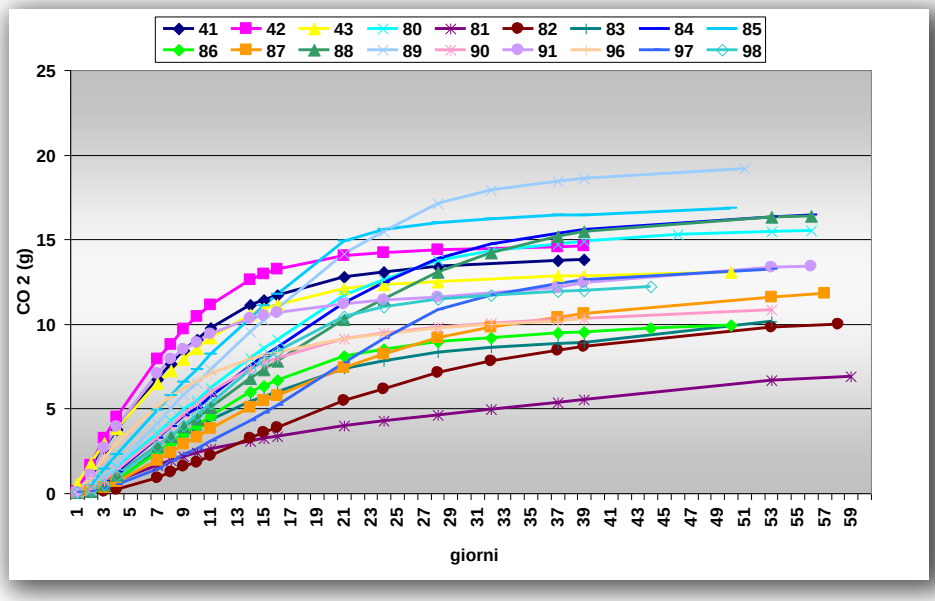
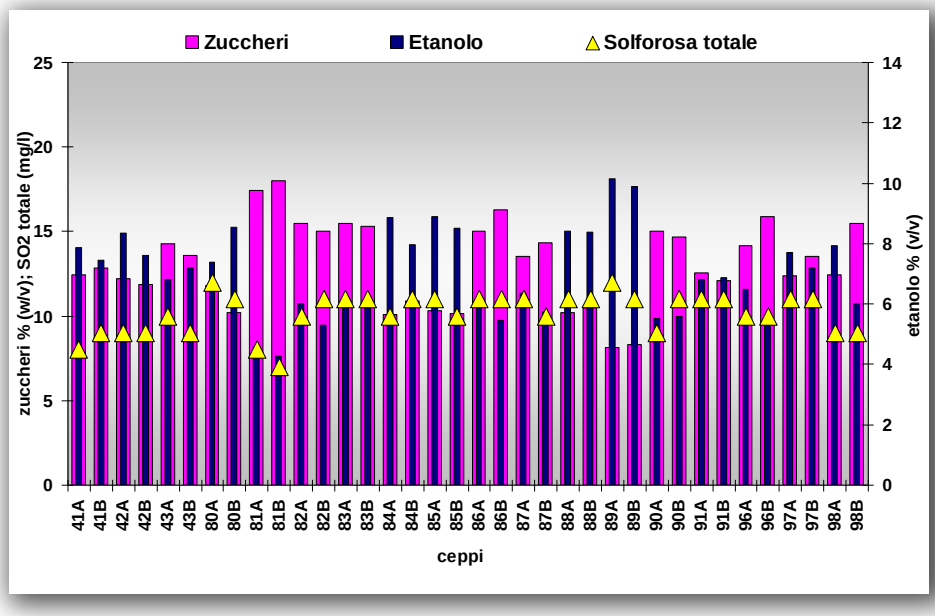


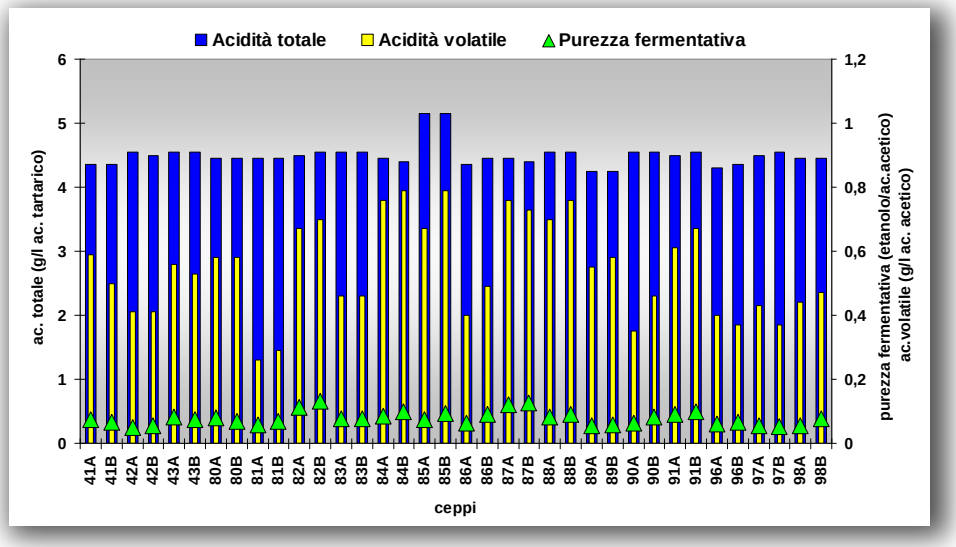
Figura 9: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Saccharomycodes

Tabella 11: principali caratteristiche enologiche delle colture pure di lieviti appartenenti al genere Zygosaccharomyces

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. Volatile ($g\ l^{-1}$)	Purezza fermentativa
Zy41	7.66±0.28	0.90±0.17	0.55±0.06	0.07±0.01
Zy42	7.97±0.52	1.08±0.01	0.41±0.00	0.05±0.00
Zy43	7.00±0.25	0.98±0.34	0.55±0.02	0.08±0.01
Zy80	7.96±0.83	0.30±0.11	0.58±0.00	0.07±0.01
Zy81	4.42±0.23	0.13±0.00	0.28±0.02	0.06±0.01
Zy82	5.66±0.51	0.04±0.00	0.69±0.02	0.12±0.01
Zy83	5.92±0.03	0.11±0.04	0.46±0.00	0.08±0.00
Zy84	8.40±0.63	0.22±0.12	0.78±0.02	0.09±0.01
Zy85	8.70±0.28	0.47±0.04	0.73±0.08	0.08±0.01
Zy86	5.84±0.54	0.14±0.10	0.45±0.06	0.08±0.02
Zy87	6.04±0.44	0.12±0.07	0.75±0.02	0.12±0.01
Zy88	8.40±0.04	0.18±0.04	0.73±0.04	0.09±0.01
Zy89	10.0±0.18	0.29±0.00	0.57±0.02	0.06±0.00
Zy90	5.56±0.04	0.25±0.12	0.41±0.08	0.07±0.02
Zy91	6.85±0.05	0.90±0.07	0.64±0.04	0.09±0.02
Zy96	6.02±0.68	0.71±0.35	0.39±0.02	0.06±0.00
Zy97	7.45±0.35	0.09±0.05	0.40±0.04	0.05±0.00
Zy98	6.98±1.36	0.17±0.13	0.46±0.02	0.07±0.02


41
42
43
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
96
97
98
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); SO2 totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
ceppi



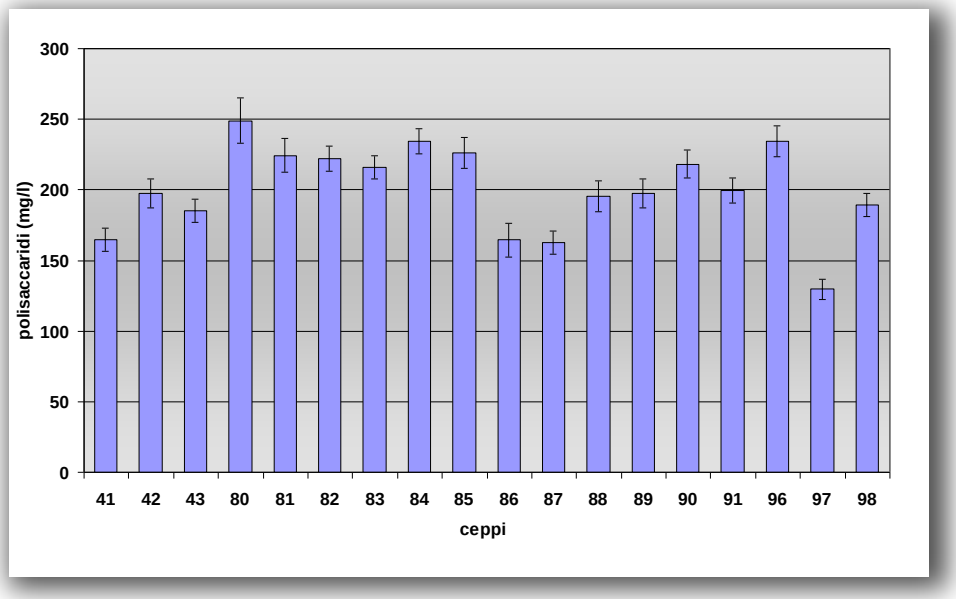
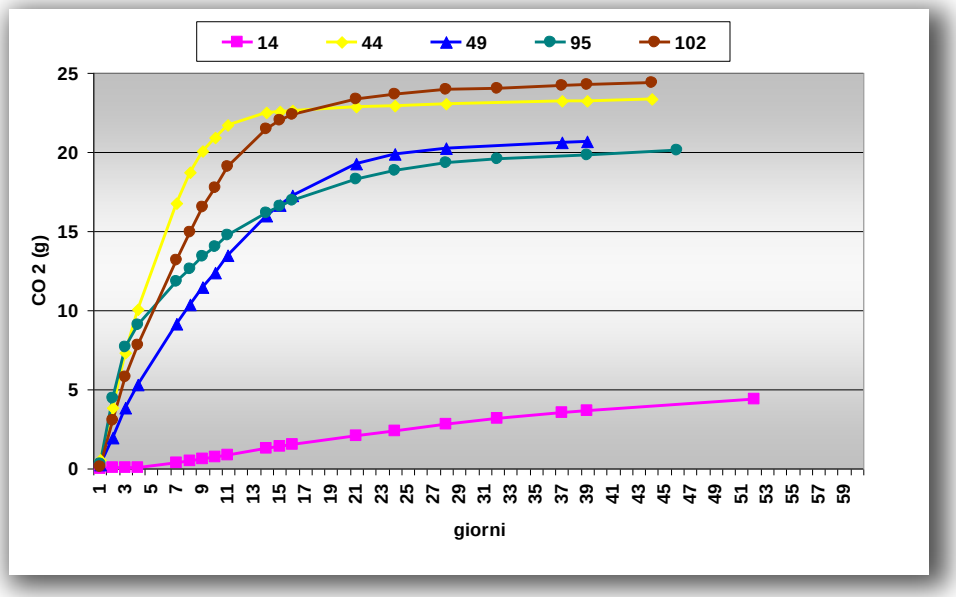
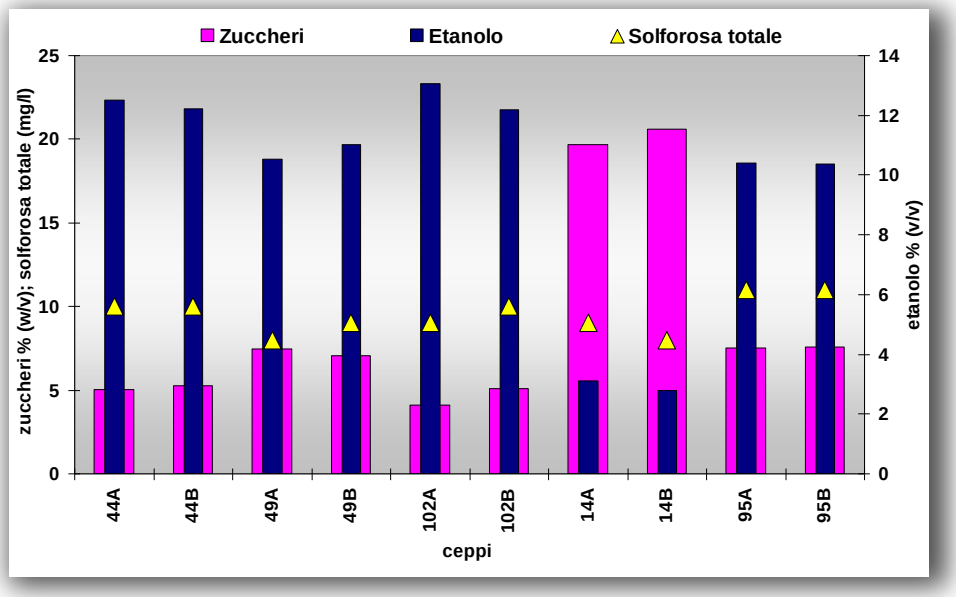


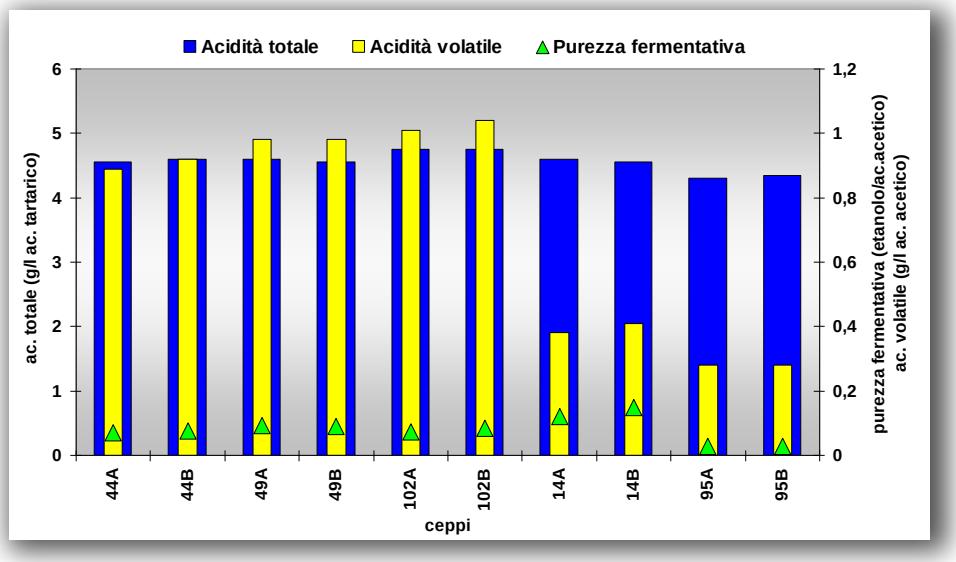
Figura 10: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Zygosaccharomyces

Tabella 12: cinetica di fermentazione e principali caratteristiche enologiche delle colture pure di 3 ceppi di lieviti Saccharomyces e 2 lieviti non Saccharomyces

Ceppo N°	Etanolo (% vol.)	Velocità fermentazione	Ac. volatile ($g\ l^{-1}$)	Purezza fermentativa
44	12.37 ±0.21	2.51 ±0.03	0.91 ±0.02	0.07 ±0.00
49	10.78 ±0.36	1.33 ±0.24	0.98 ±0.00	0.09 ±0.00
102	12.62 ±0.62	1.95 ±0.47	1.03 ±0.02	0.08 ±0.01
14	2.95 ±0.24	0.02 ±0.00	0.39 ±0.02	0.13 ±0.02
95	10.38 ±0.03	2.26 ±0.04	0.28 ±0.00	0.03 ±0.00


14
44
49
95
102
CO 2 (g)
giorni


Zuccheri
Etanolo
Solforosa totale
zuccheri % (w/v); solforosa totale (mg/l)
etanolo % (v/v)
44A
44B
49A
49B
102A
102B
14A
14B
95A
95B
ceppi



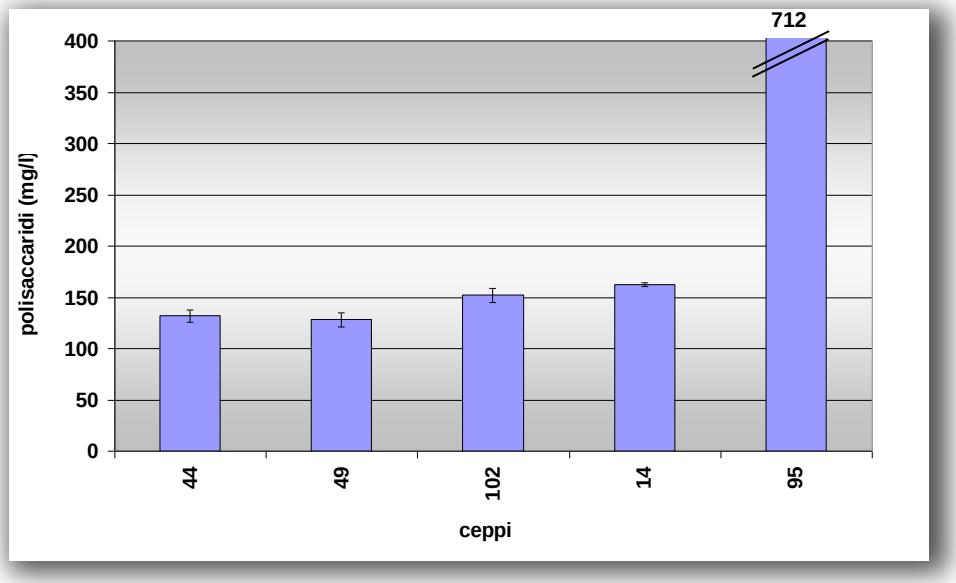
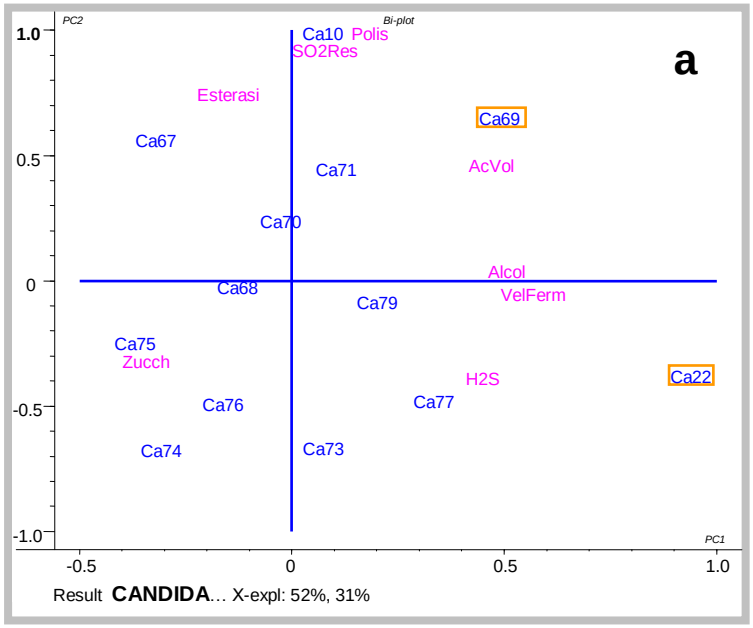
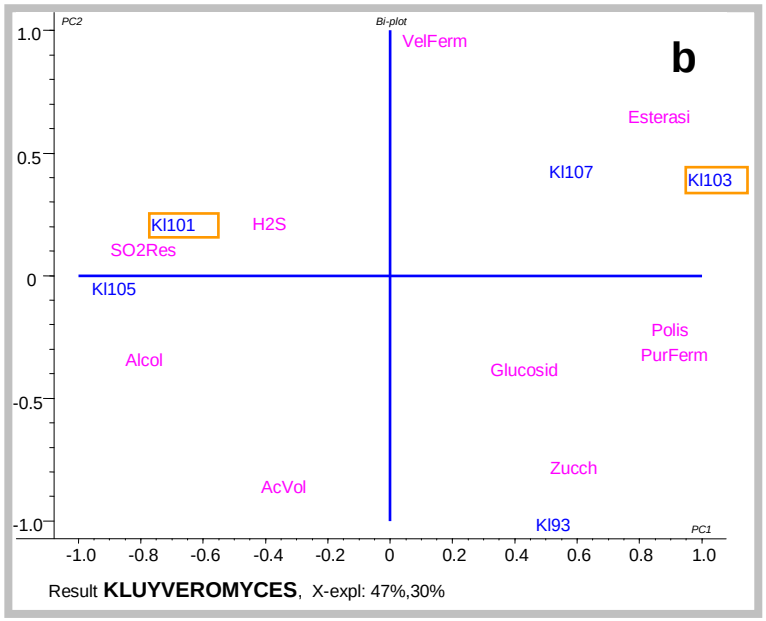
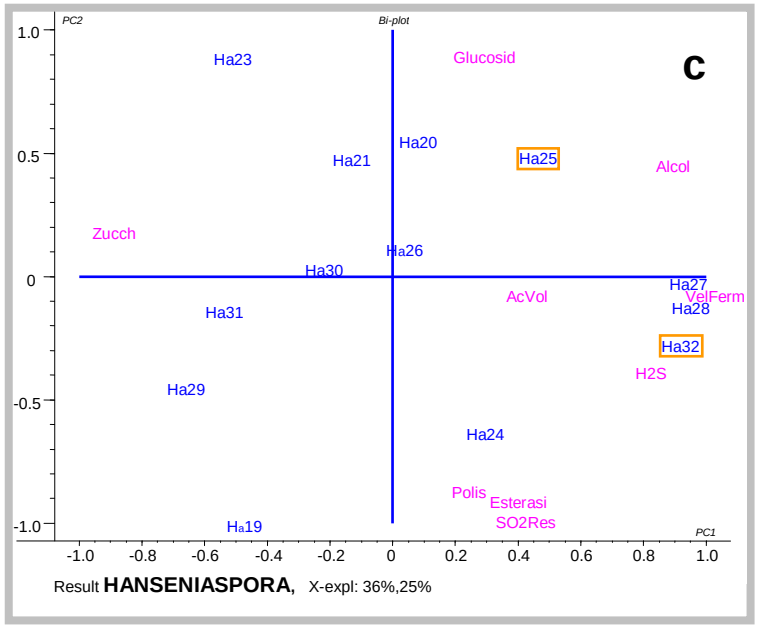


Figura 11: curve di fermentazione e principali parametri analitici dei fermentati relativi al genere Saccharomyces (44, 49, 102) Issatchenkia (14) e Schizosaccharomyces (95)







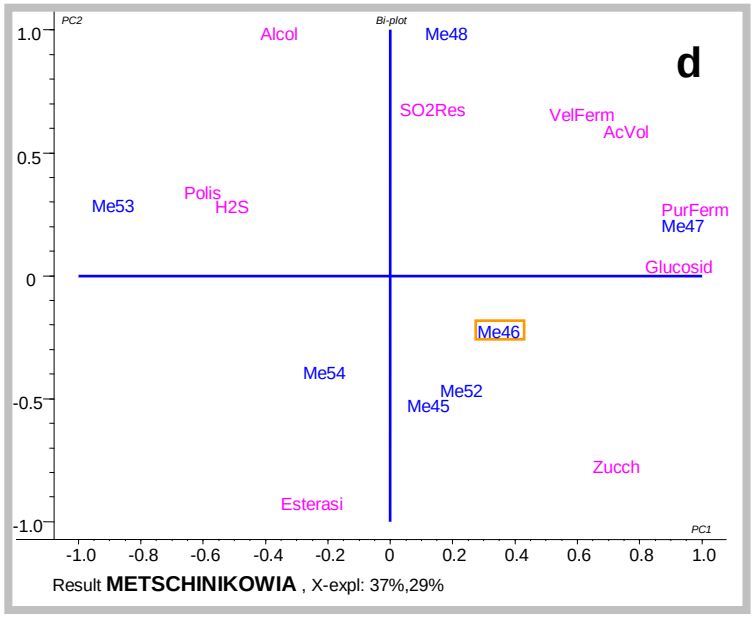
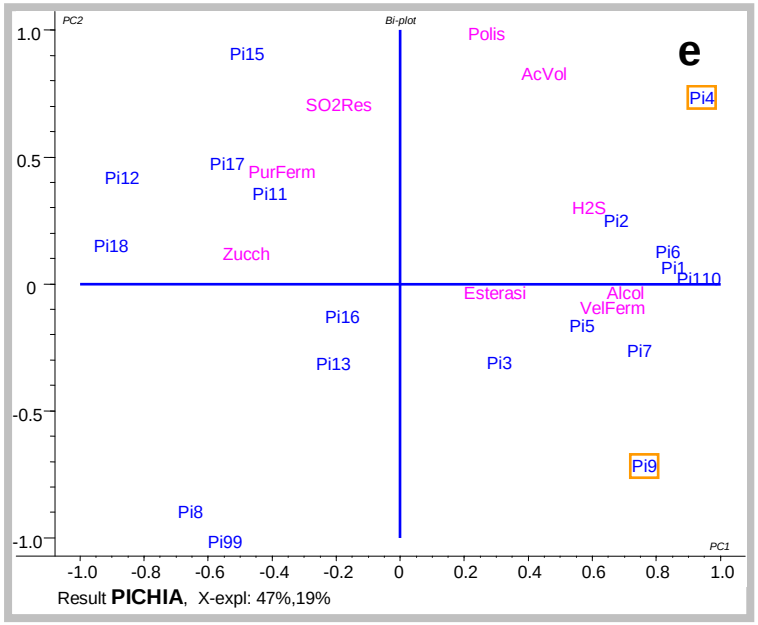
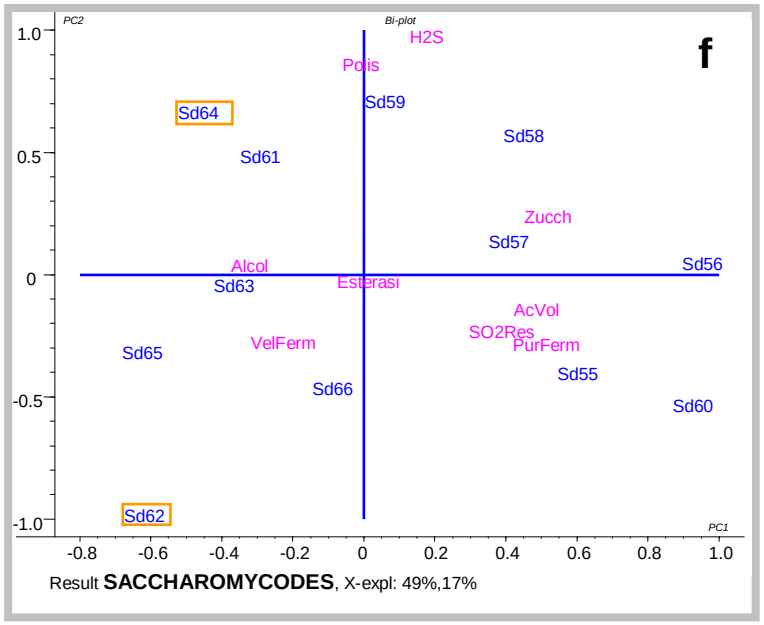
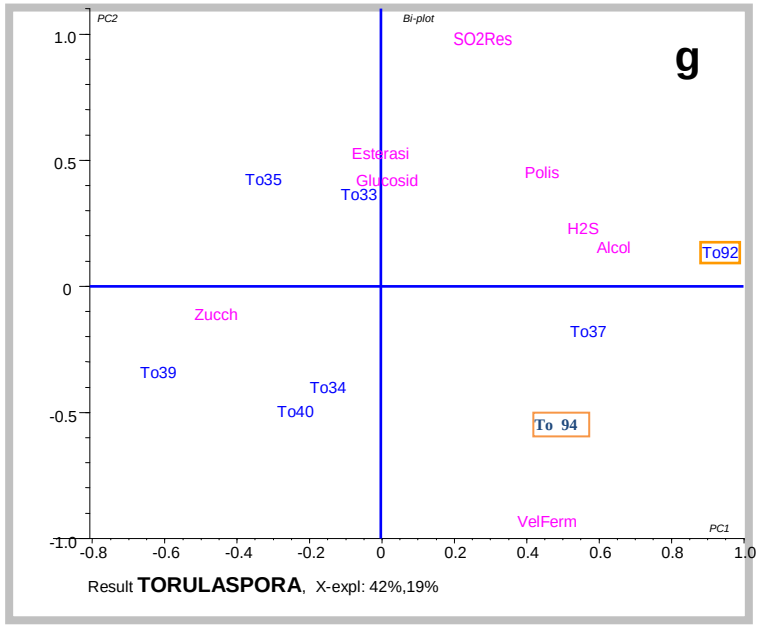


Fig. 12 a-h: Caratterizzazione dei ceppi dei diversi generi di lieviti non-Saccharomyces , attraverso l'analisi delle componenti principali condotta utilizzando i parametri maggiormente caratterizzanti.







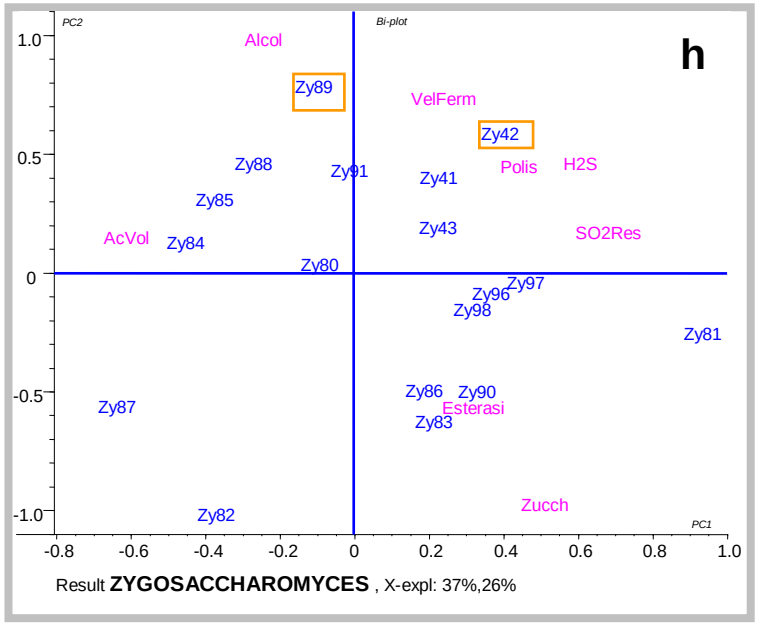


Fig. 12 a-h: (continua)

4.1.5. Conclusioni I anno sperimentazione

Le indagini sin qui svolte hanno consentito di evidenziare che:

- Il potere fermentativo mediamente più elevato è stato riscontrato tra le specie appartenenti ai generi *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes* e *Schizosaccharomyces* (per quest'ultimo genere, essendo stato esaminato un solo ceppo, il valore corrispondente non è stato ovviamente riportato nel grafico). Questi risultati d'altra parte confermano quanto riportato in letteratura. Interessanti sono comunque risultate le concentrazioni raggiunte da alcuni lieviti appartenenti a quei generi notoriamente classificati con basso potere alcoligeno come ad esempio gli apiculati, (con valori intorno a 6,5%) e *Pichia* (con concentrazioni del 7%).
- Tendenzialmente più diffusa e con concentrazioni più elevate è la produzione di acidità volatile tra i ceppi appartenenti al genere *Pichia*. Poco presente e con bassi valori invece nei fermentati dei lieviti appartenenti ai generi *Metschnikowia* e *Saccharomycodes*. Tra i lieviti apiculati esiste una notevole variabilità di produzione di acido acetico e, contrariamente a quanto spesso riportato, i lieviti in esame hanno comunque mostrato valori < 0,8 g/l ac. acetico.
- La purezza fermentativa, ossia la quantità di acido acetico rispetto all'etanolo prodotto, è risultata nei range ottimali per la gran parte dei generi esaminati. Fanno eccezione circa il 50% dei ceppi appartenenti sia al genere *Candida* che *Hanseniaspora* e soprattutto la gran parte dei ceppi appartenenti al genere *Pichia*, che hanno normalmente presentato anche i più alti valori.
- La produzione di SO_2, pur sempre contenuta in tutti i generi, oscilla tra i 7 e 12 mg/l. I lieviti appartenenti al genere *Candida* e *Pichia* risultano tendenzialmente più

predisposti ad una maggiore produzione di solforosa contrariamente a quanto accade invece per i lieviti appartenenti al genere *Metschnikowia*.

- Per quanto riguarda i polisaccaridi, circa il 25% dei fermentati con i lieviti non-*Saccharomyces* presentano valori simili circa a quelli con i lieviti *Saccharomyces*. Il 50% dei fermentati presentavano invece interessanti livelli di polisaccaridi (≥ 200 mg/l). Il lievito *Schizosaccharomyces* è sicuramente risultato il ceppo con un fermentato contenente la quantità più elevata di polisaccaridi.

Sulla base dei dati sopra riportati e della elaborazione dei principali parametri attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) (Fig. 12 a-h) sono stati selezionati, all'interno di ciascun genere, i seguenti ceppi.

- *Candida*: ceppi n. 22 e 69: buon potere alcoligeno (6-7%); fermentati con elevata purezza fermentativa; fermentato (ceppo n. 69) con il maggiore contenuto di polisaccaridi.
- *Hanseniaspora:* ceppi n. 25 e 32: buon potere alcoligeno (5-6%); fermentati con elevata purezza fermentativa; attività glucosidasica elevata (ceppo n. 25).
- *Kluyveromyces:* ceppi n. 101 e 103: fermentati con buona purezza fermentativa; buon potere alcoligeno (ceppo n. 101: 8%); attività glucosidasica; fermentato (ceppo n. 103) con contenuto elevato di polisaccaridi.
- *Metschnikowia:* ceppo n. 46: attività esterasica e glucosidasica; fermentato con contenuto medio di polisaccaridi.
- *Pichia:* ceppi n. 4 e 9: buon potere alcoligeno (5-7%); fermentati con buona purezza fermentativa; fermentati con contenuto elevato di polisaccaridi.

- *Saccharomycodes*: ceppi n. 62 e 64: buon potere alcoligeno (9-11%); fermentati con buona purezza fermentativa e con contenuto elevato di polisaccaridi.
- *Torulaspora*: ceppi n. 92 e 94: buon potere alcoligeno (7-9%); fermentati con contenuto medio-elevato di polisaccaridi.
- *Zygosaccharomyces:* ceppi n. 42 e 89: buon potere alcoligeno (7-10%); fermentati con buona purezza fermentativa; fermentati con buon contenuto di polisaccaridi.
- *Schizosaccharomyces:* ceppo n. 95: buon potere alcoligeno (10%); fermentato con buona purezza fermentativa; fermentato con il contenuto di polisaccaridi significativamente più elevato rispetto a tutti gli altri generi.

4.2. II anno di ricerca

4.2.1. Valutazione dell'attitudine enologica di 16 ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* inoculati in fermentazioni miste con lieviti *Saccharomyces*, mediante microfermentazioni su scala di laboratorio

In questa fase 16 ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, selezionati nel corso del primo anno di ricerca, sono stati utilizzati in prove di fermentazione, in coinoiculo con uno starter commerciale appartenente alla specie *S. cerevisiae* (Tab. 13).

Le prove sono state allestite seguendo il seguente schema:

Tesi 1	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^7 cell/ml di *S. cerevisiae*
Tesi 2	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^5 cell/ml di *S. cerevisiae*
Tesi 3	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^3 cell/ml di *S. cerevisiae*

Per ciascuna tesi è stata allestita anche una prova di controllo con la coltura pura del ceppo commerciale di *S. cerevisiae* con le medesime concentrazioni della tesi corrispondente (10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml e 10^3 cell/ml).

Ulteriori prove di controllo sono state allestite con i ceppi di non-*Saccharomyces* condotte in purezza (alla concentrazione di 10^7 cell/ml) (vedi schema allegato).

S. cerevisiae (coltura pura)	10^7 cell/ml
S. cerevisiae (coltura pura)	10^5 cell/ml
S. cerevisiae (coltura pura)	10^3 cell/ml
non-*Saccharomyces* (coltura pura)	10^7 cell/ml

Le microfermentazioni sono state condotte in doppio su 450 ml di mosto pastorizzato e standardizzato per contenuto zuccherino (23,1%) in beute equipaggiate di valvole di Müller. Il mosto in ciascuna beuta è stato inoculato con un volume della precoltura di ciascun ceppo selezionato, sviluppata a 25°C per 72h nel medesimo substrato. Il volume inoculato è stato calcolato mediante conta cellulare al Thoma in modo da standardizzare l'inoculo iniziale secondo le tre combinazioni sopra riportate.
L'evoluzione delle fermentazioni, condotte a 25°C, è stata monitorata sia per via gravimetrica che tramite conta vitale su piastra dei lieviti.
Da ciascuna beuta sono stati quindi effettuati i prelievi immediatamente dopo l'inoculo e dopo 2, 3, 7, 10, 15 e 22 giorni di fermentazione.
Per una migliore gestione e per un confronto statistico il lavoro è stato suddiviso tra le due unità di ricerca. Ciascuna unità ha condotto le prove di fermentazione su otto ceppi di lieviti non-*Saccharomyces*, effettuando le repliche in tempi successivi. In totale, in questa fase, ciascuna unità di ricerca ha condotto e monitorato 70 prove di fermentazione (8

combinazioni × 3 modalità di inoculo + 11 fermentazioni di controllo in coltura pura x 2 repliche).

Di seguito sono riportati i principali risultati osservati per ciascuno dei ceppi di lievito utilizzati:

- *Saccharomyces cerevisiae*

Il vigore fermentativo delle colture pure del ceppo *S. cerevisiae* alle tre diverse concentrazioni, come si può osservare dalla figura 13, risulta essere in funzione del numero di cellule inoculato; infatti, alla più alta concentrazione (10^7 cell/ml) si assiste ad un avvio della fermentazione più rapido, mentre alle concentrazioni 10^5 cell/ml e 10^3 cell/ml si ha un ritardo rispettivamente di circa uno e due giorni. A fine fermentazione (23 giorni) in tutte le tesi la CO_2 svolta è risultata comunque ad un livello di circa 40-45 g su 450 ml di mosto inoculato. La concentrazione cellulare del ceppo di *Saccharomyces* raggiunge, dopo due giorni di fermentazione, lo stesso livello in tutte e tre le prove (Fig. 14 a, b).
Nelle tabelle 14, 15 e 16 sono riportati i principali parametri enologici e composti volatili delle fermentazioni ottenute con la coltura pura di *Saccharomyces* al fine di un confronto con quelli ottenuti dalle fermentazioni miste.

- *non-Saccharomyces*

In figura 15 (a, b) vengono riportate le cinetiche di fermentazione e di crescita dei ceppi di lievito in coltura pura. Come era atteso, tutti i ceppi di non-*Saccharomyces* hanno mostrato un'attività fermentativa inferiore a quella del ceppo di *S. cerevisiae*. In tali condizioni comunque i lieviti non-*Saccharomyces* mantengono più o meno costante la loro concentrazione iniziale (10^7 cell/ml) fino a fine fermentazione. I principali parametri enologici dei

fermentati delle prove condotte con i lieviti non-*Saccharomyces* in coltura pura vengono riportati insieme ai risultati ottenuti dalle relative colture miste.

- *Candida zemplinina* (ceppo 22)

Nella figura 16 è riportato l'andamento fermentativo delle prove multistarter condotte con il ceppo 22 appartenente alla specie *C. zemplinina*. Come si può rilevare, l'andamento fermentativo nelle tesi 2 e 3, con *S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml, è risultato inferiore a quello ottenuto con *S. cerevisiae* coinoculato a concentrazione di 10^7 cell/ml (tesi 1). L'evoluzione della CO_2 nella tesi 3 (10^3 cell/ml), pur con una discreta variabilità, è risultata particolarmente lenta indicando, in tali condizioni, un'influenza del ceppo di non-*Saccharomyces* sulle performance fermentative di *S. cerevisiae*.
La presenza del ceppo di *C. zemplinina* non sembra aver interferito sulla popolazione vitale di *S. cerevisiae*. I differenti livelli di inoculo del ceppo di *S. cerevisiae* hanno influenzato la persistenza del ceppo di *C. zemplinina*. Il ceppo 22, infatti, persiste alla concentrazione di 10^6 cell/ml per circa 7 giorni nella tesi 1 (inoculo di *S. cerevisiae* di 10^7 cell/ml), sino al 10° giorno nella tesi 2 (inoculo di 10^5 cell/ml di *S. cerevisiae*) e per tempi ancora più lunghi nella tesi 3 (inoculo di 10^3 cell/ml di *S. cerevisiae*) (Fig. 17).
I principali parametri enologici riportati in tabella 17 non evidenziano differenze tra le tesi in coinoculo e quelle in coltura pura anche a bassi livelli di inoculo di *S. cerevisiae*. Fa eccezione la produzione di polisaccaridi che sembra essere positivamente influenzata dalla *C. zemplinina* soprattutto nelle tesi a basso inoculo iniziale di *S. cerevisiae*.
Per quanto riguarda la produzione di acidità volatile non si rilevano differenze significative tra le tesi in coltura pura e coinoculate (Fig. 18). I valori riscontrati sono in linea con le

produzioni dei singoli ceppi inoculati in coltura pura. Si può notare un incremento progressivo, nei valori medi dell'acidità volatile, passando dai livelli più alti a quelli più bassi di inoculo della coltura starter di *S. cerevisiae.*
Anche per i principali composti volatili non si rilevano significative differenze dovute alla presenza di *C. zemplinina* nel processo fermentativo (Tab. 18). Lo stesso si può dire anche per gli altri composti volatili (Tab.19).

- *Candida tropicalis* (ceppo 69)

In figura 19 è riportato l'andamento fermentativo delle prove multistarter allestite con il lievito *S. cerevisiae* (nei tre diversi livelli di inoculo) unitamente alla specie non-*Saccharomyces Candida tropicalis,* ceppo 69. Come si può rilevare, l'andamento fermentativo è analogo nelle tesi 2 e 3, con *S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml, le quali invece differiscono sostanzialmente dalla fermentazione con *S. cerevisiae* coinoculato a concentrazione di 10^7 cell/ml (tesi 1). In quest'ultima tesi, infatti, si raggiunge la massima quantità di CO_2 intorno al 10-12° giorno, mentre gli altri due coinoculi mostrano un andamento fermentativo analogo fino al raggiungimento del plateau intorno al 18° giorno, indicando in tali condizioni un'influenza del ceppo non-*Saccharomyces* sulle performance fermentative di *S. cerevisiae*.
Dalla valutazione della carica microbica vitale durante il processo fermentativo è possibile rilevare una consistente presenza del ceppo di *C. tropicalis* a concentrazioni superiori a 10^6 cell/ml sino al 15° giorno in tutte le tre tesi con i diversi livelli di inoculo della coltura di *S. cerevisiae* (Fig. 20).
I dati relativi ai principali parametri enologici valutati a fine fermentazione (Tab. 20) non evidenziano differenze tra le tesi in coinoculo e quelle in coltura pura anche a bassi livelli di inoculo di *S. cerevisiae*.

Come si può notare dalla figura 21 la produzione di acidità volatile in coinoculo *S. cerevisiae*/*C. tropicalis* è risultata non differente dalle rispettive prove condotte in coltura pura con *S. cerevisiae* ed in linea con le quantità prodotte in coltura pura.
Anche per i principali prodotti volatili di fermentazione (Tab. 21) non si rilevano significative differenze dovute alla presenza della coltura appartenente alla specie *C. tropicalis*. Da notare l'alta produzione di etil acetato da parte di *C. tropicalis* in coltura pura, non rilevabile nelle tesi in coltura mista che non differiscono dai controlli, ed una leggera riduzione nella produzione di alcol isoamilico nelle fermentazioni multistarter.

- *Torulaspora delbrueckii* (ceppo 92)

In figura 22 è riportato l'andamento fermentativo delle prove coinoculate relative al ceppo 92 di *T. delbrueckii*. Come si vedrà anche per il ceppo 94, per il ceppo 92 si osservano tra le tre tesi delle differenze rilevanti. Infatti, pur con leggere differenze tra le repliche, mentre in presenza della più alta concentrazione di *S. cerevisiae* si raggiunge similmente al controllo (*S. cerevisiae* inoculato a 10^7 cell/ml) la massima quantità di CO_2 svolta intorno all'11-13° giorno, nella tesi 2 (inoculo di 10^5 cell/ml) lo stesso valore viene raggiunto successivamente e nella tesi 3 (inoculo di 10^3 cell/ml) solo a fine fermentazione, confermando a livello di specie una certa influenza sull'attività fermentativa del ceppo di *S. cerevisiae*. L'evoluzione della conta microbica vitale, valutata nel corso delle fermentazioni, è riportata nella figura 23. Relativamente alle fermentazioni coinoculate l'andamento del ceppo *S. cerevisiae* non risente della presenza del ceppo 92 di *T. delbrueckii*. Tuttavia, questo ceppo risulta essere abbastanza competitivo con *S. cerevisiae*, infatti, nella tesi con più alto livello di inoculo di *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*

non supera la concentrazione cellulare iniziale e persiste al di sopra di 10^6 cell/ml fino al 7-10° giorno. Nelle due restanti tesi invece, il ceppo 92 di *T. delbrueckii* rimane pressoché costante fino al 15° giorno per poi decrescere rapidamente.

Relativamente ai principali parametri enologici valutati a fine fermentazione (Tab. 22) è possibile osservare che la presenza del ceppo 92 di *T. delbrueckii* determina un'acidificazione del fermentato abbassando i valori di pH ed incrementando quelli dell'acidità totale, come mostrato anche nella coltura pura. Non si registrano differenze nei riguardi della produzione di etanolo e di glicerolo mentre la produzione di polisaccaridi sembra essere positivamente e significativamente influenzata dalla presenza del ceppo 92 di *T. delbrueckii.*

Il ceppo 92 in coltura pura, ha confermato la ridotta produzione di acido acetico di questa specie (Fig. 24). Nelle tesi con coinoculo, infatti, la quantità di acido acetico prodotto è risultata sempre più bassa in confronto alle tesi con il *S. cerevisiae* in coltura pura. Valutando tuttavia le produzioni relative ai diversi livelli di inoculo di *S. cerevisiae* non si notano differenze sostanziali.

L'analisi dei principali composti volatili (Tab. 23) nelle tesi coinoculate ha evidenziato, rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae,* una produzione simile di acetaldeide, propanolo e isobutanolo. La produzione di alcoli amilici, invece, ha subito un incremento nelle fermentazioni coinoculate rispetto ai controlli in coltura pura. Anche per i restanti metaboliti non si osservano variazioni rilevanti nelle tre tesi coinoculate.

La valutazione degli altri composti volatili (Tab. 24) ha evidenziato una riduzione generalizzata delle concentrazioni dei composti volatili nelle tesi in cui *T. delbrueckii* è stata coinoculata con concentrazioni più alte del ceppo starter di *S. cerevisiae*. Si evidenzia, in particolare, la produzione di 2-fenil etanolo che risulta costantemente superiore nelle

tesi coinoculate, confermando le caratteristiche di alto produttore del ceppo per tale composto.

- *Torulaspora delbrueckii* (ceppo 94)

Nelle tre tesi con i diversi livelli di inoculo di *S. cerevisiae* (Fig. 25) si osservano notevoli differenze nella cinetica di fermentazione. Infatti, mentre in presenza della più alta concentrazione di *S. cerevisiae* si raggiunge la massima quantità di CO_2 svolta intorno al 10° giorno di fermentazione, con un andamento del tutto comparabile al controllo (*S. cerevisiae* in coltura pura inoculato a 10^7 cell/ml), nella tesi 2, con inoculo di 10^5 cell/ml, lo stesso valore viene raggiunto non prima del 15° giorno e nella tesi 3, con inoculo di 10^3cell/ml, solo a fine fermentazione indicando una certa influenza sull'attività fermentativa del ceppo di *S. cerevisiae*.
L'evoluzione della biomassa, valutata nel corso delle fermentazioni coinoculate, è riportata nella figura 26. Come si può osservare, l'andamento del ceppo *S. cerevisiae* non risente della presenza del ceppo *T. delbrueckii* nelle tre tesi; tuttavia, il ceppo non-*Saccharomyces* risulta essere abbastanza competitivo con *S. cerevisiae*. Nella tesi con più alto livello di inoculo di *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* non supera la concentrazione cellulare iniziale e persiste a tale livello fino al 10° giorno di fermentazione. Nelle due restanti tesi invece, la concentrazione iniziale di *T. delbrueckii* incrementa rispettivamente di uno o due ordini di grandezza e rimane pressoché costante fino al 15° giorno di fermentazione, per poi decrescere rapidamente.
Relativamente ai principali parametri enologici valutati a fine fermentazione (Tab. 25) è possibile osservare come i valori di pH dei fermentati non subiscono evidenti variazioni nelle tesi in purezza o multistarter. Al contrario, l'acidità totale subisce un incremento nella tesi in cui *T. delbrueckii* è stata fatta fermentare in purezza mentre l'etanolo

prodotto dimostra l'influenza fermentativa favorevole del ceppo di *S. cerevisiae* sul non-*Saccharomyces* con il completo consumo degli zuccheri e buon rendimento in alcol.
La produzione finale di glicerolo sembra essere poco influenzata dall'impiego del coinoculo, mentre si registra un incremento di polisaccaridi inversamente proporzionale al livello iniziale di inoculo di *Saccharomyces.*
La quantità di acido acetico prodotto a fine fermentazione (Fig. 27) non supera il valore di 0,5 g/l in nessuna tesi. In particolare la quantità di acido acetico prodotta dal ceppo 94 di *T. delbrueckii* in coltura pura è inferiore rispetto ai diversi livelli di inoculo di *S. cerevisiae*, come ampiamente dimostrato in letteratura. Inoltre, la presenza di *T. delbrueckii* nelle fermentazioni miste riduce in modo rilevante l'acidità volatile inversamente proporzionale alla concentrazione del *S. cerevisiae* coinoculato.
L'analisi dei principali composti volatili (Tab. 26) ha evidenziato una produzione di acetaldeide, isobutanolo, alcool amilico ed isoamilico da parte delle tesi coinoculate non differenti rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae*. La produzione di propanolo, invece, ha subito un incremento nelle fermentazioni coinoculate nelle tesi con *S. cerevisiae* inoculato con 10^5 e 10^3 cell/ml rispetto a quelle in coltura pura. Per i restanti composti i tre livelli di inoculo di *S. cerevisiae* non hanno influenzato la loro produzione nelle tre tesi coinoculate.

- *Kluyveromyces thermotolerans* (ceppo 101)

In figura 28 è riportato l'andamento fermentativo delle prove multistarter condotte da *S. cerevisiae* e *K. thermotolerans* ceppo 101. Come si può osservare, nella tesi 1, (coinoculata con *S. cerevisiae* a concentrazione di 10^7 cell/ml), il ceppo di *S. cerevisiae* raggiunge già la massima perdita di CO_2 dopo soli 11-12 giorni circa. Nelle

altre due tesi invece (*S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 UFC/ml), la presenza del ceppo 101 di *K. thermotolerans* determina un marcato rallentamento del processo fermentativo raggiungendo la massima perdita di CO_2 dopo oltre 18 giorni.
L'evoluzione della popolazione (Fig. 29) non mostra evidenti interferenze del ceppo 101 di *K. thermotolerans* nei confronti del ceppo di *S. cerevisiae* in tutte le tesi saggiate. Al contrario, la persistenza del ceppo 101 di *K. thermotolerans* é risultata proporzionale all'inoculo della coltura di *S. cerevisiae*: una vitalità superiore a 10^6 cell/ml è stata mantenuta per soli 7 giorni con l'inoculo di *S. cerevisiae* 10^7 cell/ml, per 10 giorni con quello pari a 10^5 cell/ml e 15 giorni per l'inoculo pari a 10^3 cell/ml.
Dall'analisi dei fermentati (Tab. 27) si possono notare elevati valori di acidità totale. Tale produzione, da imputare verosimilmente alla produzione di acido L-lattico da parte del ceppo Kl 101 (come si può evincere anche dai dati della coltura pura), è più marcata nei coinoculi con concentrazioni di *S. cerevisiae* più basse (10^5 e 10^3 cell/ml). La produzione di etanolo così come quella di glicerolo e polisaccaridi non è significativamente differente nelle diverse prove. Rispetto ai relativi controlli di *Saccharomyces* si registra sempre tuttavia un incremento nella concentrazione sia del glicerolo sia dei polisaccaridi nei fermentati coinoculati.
La produzione di acidità volatile (Fig. 30) nelle prove in coinoculo è risultata inferiore a quella mostrata dalle rispettive prove in coltura pura.
Dalla tabella 28, nelle tesi con coinoculo, si può rilevare un incremento della produzione complessiva di alcoli superiori, dovuta principalmente agli alcoli amilici, in linea con le produzioni mostrate in coltura pura. Per i restanti composti non si possono evidenziare differenze tra le tesi in coltura pura e quelle in coinoculo.
Tra gli altri composti volatili (Tab. 29) non si evidenziano in genere differenze significative in relazione alla presenza del

ceppo 101 di *K. thermotolerans*. Tuttavia, nelle tesi in coinoculo, è da sottolineare la produzione di 2-fenil etanolo che risulta sempre prodotto a concentrazioni superiori a quelle rilevate nelle rispettive tesi in coltura pura di *Saccharomyces.*

- *Kluyveromyces thermotolerans* (ceppo 103)

In figura 31 è riportato l'andamento fermentativo delle prove multistarter condotte da *S. cerevisiae* e *K. thermotolerans*. Confrontando la cinetica di fermentazione del ceppo di *Saccharomyces* in coltura pura (Fig. 13) e quella in coltura mista nella tesi 1, (coinoculato con *S. cerevisiae* a concentrazione di 10^7 cell/ml), non si rilevano interferenze sull'andamento fermentativo dovuto alla presenza del ceppo non saccaromicetico. Nelle altre due tesi (*S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml) la presenza del ceppo 103 di *K. thermotolerans* determina invece un lieve rallentamento del processo fermentativo.
Anche dallo sviluppo della popolazione microbica (Fig. 32) non si evidenziano particolari interferenze sia del ceppo 103 di *K. thermotolerans* nei confronti del ceppo di *S. cerevisiae* che, viceversa del ceppo di *S. cerevisiae* nei confronti del ceppo 103 di *K. thermotolerans,* mostrando entrambi un simile sviluppo in tutte e tre le tesi.
Per quanto riguarda i principali parametri enologici (Tab. 30), le tesi con coinoculo non hanno evidenziato differenze di rilievo. Fa eccezione la produzione di polisaccaridi che è invece positivamente influenzata del ceppo di *K. thermotolerans* ed in linea con l'alta produzione nella rispettiva coltura pura.
La produzione di acidità volatile (Fig. 33) nelle prove in coinoculo con *K. thermotolerans* è risultata inferiore a quelle delle rispettive prove in coltura pura condotte dal ceppo di *S. cerevisiae*. In particolare nelle tesi 2 e 3 (*S.*

cerevisiae 10^5 e 10^3 cell/ml rispettivamente) l'acidità volatile finale dei coinoculi è risultata simile a quella prodotta in coltura pura del non-*Saccharomyces*.
Tra i composti volatili principali (Tab. 31) non si evidenziano sensibili differenze.

- *Metschnikowia pulcherrima* (ceppo 46)

In figura 34 è riportato l'andamento fermentativo delle prove multistarter allestite con il lievito *S. cerevisiae* (nei tre diversi livelli di inoculo) unitamente alla specie *Metschnikowia pulcherrima,* ceppo 46. Dai risultati ottenuti si osserva un andamento fermentativo analogo nelle tesi 2 e 3, con *S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml; queste tesi si discostano nettamente dalla fermentazione allestita con la più alta concentrazione di *S. cerevisiae* (tesi 1). Infatti, mentre in quest'ultima si assiste ad un rapido avvio del processo fermentativo e si raggiunge la massima quantità di CO_2 svolta intorno al 10° giorno, nelle altre due tesi lo stesso valore viene raggiunto non prima del 15° giorno.
L'evoluzione della biomassa valutata nel corso delle fermentazioni è riportata nelle figure 35. Anche in questo caso (analogamente a quanto visto nella prova precedente allestita con *T. delbrueckii*) lo sviluppo del ceppo *S. cerevisiae* non risente della presenza di *M. pulcherrima*. Il ceppo non-*Saccharomyces* risulta essere poco competitivo con *S. cerevisiae* in ogni tesi del coinoculo. Infatti, la concentrazione iniziale di *M. pulcherrima* si mantiene costante solo nei primi 3-4 giorni, dopo i quali si assiste ad un rapido decremento.
Relativamente ai principali parametri enologici valutati a fine fermentazione (Tab. 32) è possibile osservare come essi non subiscono evidenti variazioni sia nelle tre tesi di controllo con *S. cerevisiae* sia nelle tesi coinoculate.

La quantità di acido acetico prodotto a fine fermentazione non supera il valore di 0,5 g/l in nessuna tesi. I risultati ottenuti (Fig. 36) mostrano come la presenza di *M. pulcherrima* nelle fermentazioni miste riduce sensibilmente l'acidità volatile. La coltura pura di tale ceppo è risultata inquinata e quindi il risultato non è stato riportato in figura.
L'analisi dei principali composti volatili (Tab. 33) non ha evidenziato variazioni rilevanti nelle fermentazioni in coinoculo rispetto a quelle condotte in coltura pura con il ceppo di *S. cerevisiae*.
La valutazione degli altri composti volatili (Tab. 34) ha evidenziato minori concentrazioni di quasi tutti gli analiti nelle fermentazioni in cui *M. pulcherrima* è stata coinoculata con concentrazioni pari a 10^7 e 10^5 cell/ml di *S. cerevisiae*, mentre il coinoculo con 10^3 cell/ml di *S. cerevisiae* ha mostrato un incremento particolarmente evidente nella concentrazione di isoamil acetato, esanolo, 2-feniletanolo e acido esanoico, rispetto al controllo in coltura pura.

- *Hanseniaspora osmophila* (ceppo 25)

L'andamento fermentativo delle prove multistarter condotte da *S. cerevisiae* e *H. osmophila* ceppo 25 è riportato in figura 37. Come si può rilevare l'attività fermentativa non sembra essere stata influenzata significativamente. Pur con alcune differenze tra le prove, l'andamento rispecchia e segue le concentrazioni di *S. cerevisiae* inoculate in ordine decrescente 10^7, 10^5, 10^3 cell/ml (Fig. 38). Tuttavia, nelle ultime due tesi (*S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml) la presenza del ceppo 25 di *H. osmophila* sembra aver determinato un rallentamento del processo fermentativo.
Il ceppo 25 di *H. osmophila* ha mostrato una scarsa persistenza durante il processo fermentativo. Infatti, già al terzo giorno in tutte le tesi coinoculate il ceppo 25 è presente solo alla concentrazione pari a 10^5 cell/ml e già al

settimo giorno di fermentazione scompare in tutte le tesi. E' possibile rilevare una maggiore persistenza passando dalla tesi con inoculo di *S. cerevisiae* 10^7, quindi 10^5 e per finire 10^3 cell/ml. Tuttavia, questa maggiore persistenza è limitata e compresa tra il terzo e settimo giorno di fermentazione
I dati relativi ai principali parametri enologici (Tab. 35) non evidenziano differenze tra le tesi in coinoculo e quelle del controllo in coltura pura.
La produzione di acidità volatile (Fig. 39) nelle prove in coinoculo è risultata simile a quella delle rispettive prove in coltura pura di *S. cerevisiae*. La coltura pura di *H. osmophila* è risultata inquinata e quindi il risultato non è stato riportato.
Dall'esame dei risultati riportati in tabella 36 non si rilevano differenze tra le tesi in coinoculo e i relativi controlli, eccetto un incremento della produzione di etil acetato nelle tesi coinoculate.

- *Hanseniaspora osmophila* (ceppo 32)

L'andamento fermentativo delle prove multistarter condotte da *S. cerevisiae* e *H. osmophila* ceppo 32 è riportato in figura 40. Come si può notare l'andamento fermentativo nelle tre tesi é proporzionale all'inoculo della coltura di *S. cerevisiae.* Nelle tesi 2 e 3 (*S. cerevisiae* inoculato a concentrazioni pari a 10^5 e 10^3 cell/ml) la presenza del ceppo 32 di *H. osmophila* sembra aver determinato un deciso rallentamento del processo fermentativo.
Dalla valutazione della carica microbica vitale (Fig. 41) è possibile rilevare una consistente presenza del ceppo 32 di *H. osmophila* a concentrazioni superiori a 10^6 cell/ml sino al 15° giorno in tutte le tesi con i diversi livelli di inoculo della coltura di *S. cerevisiae* ad indicare la rilevante persistenza della coltura durante tutto il processo fermentativo.
I principali parametri enologici, riportati in tabella 37, non evidenziano in generale differenze tra le tesi in coinoculo e i

relativi controlli in coltura pura anche a bassi livelli di inoculo del *S. cerevisiae*. Fa eccezione la produzione di polisaccaridi nelle tesi 2 e 3 che è risultata sempre superiore, in linea con quanto prodotto in coltura pura dal ceppo 32 di *H. osmophila*.
La produzione di acidità volatile (Fig. 42) in tutte le prove in coinoculo con *H. osmophila* è risultata inferiore a quella delle rispettive prove in coltura pura condotte dal ceppo di *S. cerevisiae*.
Dalla tabella 38 si può evincere un incremento della produzione di etil acetato nelle tesi coinoculate, anche se ben al di sotto della soglia percettiva. In particolare, l'incremento della produzione di etil acetato è inversamente proporzionale alla concentrazione di coinoculo del *S. cerevisiae*. Nelle tesi 1 e 2 si ha anche un leggero aumento del valore complessivo degli alcoli superiori.
Per gli altri composti volatili (Tab. 39), si evidenzia una riduzione generalizzata, soprattutto per gli esteri etilici, rispetto ai relativi controlli. E' da rilevare che, pur essendo nota un'ampia produzione di fenil etilacetato da parte di questa specie in coltura pura, nelle prove in coinoculo tuttavia non si registrano incrementi rispetto ai relativi controlli di *S. cerevisiae*.

- *Pichia fermentans* (ceppo 4)

Da un confronto della cinetica fermentativa di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura (Fig. 13) e quella in coltura mista con *Pichia fermentans* (Fig. 43) si può notare come essa sia fortemente influenzata dal diverso rapporto di inoculo. Nella tesi 1 (*Saccharomyces* 10^7 cell/ml: *Pichia* 10^7cell/ml), l'elevata concentrazione iniziale consente al lievito *Saccharomyces* di dominare la fermentazione rallentando la crescita di *Pichia fermentans* (Fig. 44 a). Concentrazioni più basse di *S. cerevisiae* al momento dell'inoculo e precisamente nel rapporto di 1:100 e 1:10.000

rispetto a *Pichia*, determinano, in modo proporzionale, un rallentamento della fermentazione (Fig. 43) e una maggiore persistenza nel tempo di *Pichia*. Rispetto alla tesi 1 (*S. cerevisiae* 10^7 cell/ml: *Pichia* 10^7 cell/ml), infatti, la quantità di CO_2, dopo 7 giorni di fermentazione, è circa a 2/3 nella tesi 2 (*S. cerevisiae* 10^5: *Pichia* 10^7) e circa 1/3 nella tesi 3 (*S. cerevisiae* 10^3: *Pichia* 10^7) e i lieviti del genere *Pichia*, ormai scomparsi dopo 10 giorni di fermentazione nella tesi 1, sono ancora presenti ad elevate concentrazioni (~10^6 cell/ml) nelle tesi 2 e 3 (Fig. 44 b, c). Solamente nella tesi 3 si registra comunque una minore crescita, nelle prime fasi della fermentazione, del ceppo di *Saccharomyces* rispetto al controllo, ossia in coltura pura (Fig. 44 c). A fronte di una diversa cinetica fermentativa al termine della fermentazione (23 giorni) la CO_2 svolta si uniforma nelle tre tesi

Riguardo ai principali parametri enologici, (Tab. 40), non si evidenziano differenze nel contenuto di etanolo e di glicerina nelle tesi in coinoculo rispetto ai relativi controlli. Significativo è risultato invece l'incremento nel contenuto di polisaccaridi che è risultato inversamente proporzionale alla concentrazione dell'inoculo di *S. cerevisiae.*

La produzione di acidità volatile (Fig. 45) nelle tesi in coinoculo risulta simile alle rispettive prove condotte in coltura pura dal *S. cerevisiae*. Non viene riportato il valore relativo al ceppo di *P. fermentans* in coltura pura in quanto inquinata.

Anche se in ogni prova la sommatoria complessiva dei principali composti volatili, riportati in tabella 41, risultava del tutto analoga, si evidenzia una produzione di acetaldeide leggermente inferiore a quella delle rispettive prove di controllo con *Saccharomyces*. Il contenuto di etil acetato e propanolo, invece, è risultato leggermente aumentato nelle prove multi starter, inoculate con 10^5 e 10^3 cell/ml di *S. cerevisiae*, rispetto a quelle in coltura pura. I tre livelli di inoculo di *S. cerevisiae* non hanno influenzato significativamente il livello dei restanti composti.

- *Pichia anomala* (ceppo 9)

Anche quando in coltura mista con *Pichia anomala,* così come si è osservato nelle prove in coltura mista con il ceppo 4 di *Pichia fermentans,* la cinetica fermentativa di *S. cerevisiae* risulta fortemente influenzata dal diverso rapporto di inoculo. Nella tesi 1 (*Saccharomyces* 10^7: *Pichia* 10^7), l'elevata concentrazione iniziale consente al lievito *Saccharomyces* di svolgere la fermentazione con una cinetica simile a quella presentata in coltura pura (Fig. 13) quindi senza risultare influenzato dal lievito *Pichia,* presente in uguali concentrazioni iniziali di inoculo. Concentrazioni più basse di *Saccharomyces* al momento dell'inoculo e precisamente nel rapporto di 1:100 e 1:10.000 rispetto a *P. anomala*, determinano, in modo proporzionale, un rallentamento della fermentazione (Fig. 46). Rispetto alla tesi 1 (*Saccharomyces* 10^7: *Pichia* 10^7) infatti, la quantità di CO_2, dopo 7 giorni di fermentazione, è circa $\frac{1}{2}$ nella tesi 2 (*Saccharomyces* 10^5: *Pichia* 10^7) e a circa 1/5 nella tesi 3 (*Saccharomyces* 10^3: *Pichia* 10^7). Tuttavia il ceppo di *P. anomala*, a differenza del ceppo di *P. fermentans*, quando in coltura mista con *Saccharomyces*, non risulta particolarmente influenzato nella crescita mostrando, infatti, in tutte e tre le tesi un comportamento simile (Fig. 47). Il ceppo di *Saccharomyces*, invece, mostra nelle prime fasi della fermentazione, una minore crescita nella tesi 3 rispetto alla medesima prova ma in coltura pura (Fig. 14). A fronte di una diversa cinetica fermentativa al termine della fermentazione (23 giorni) la CO_2 svolta si uniforma nelle tre tesi intorno ad un livello medio di circa 40 – 45 g.
Riguardo ai principali parametri enologici, riportati in tabella 42, non si evidenziano differenze tra gli svinati delle tesi in coinoculo e di quelli provenienti da coltura pura di *S. cerevisiae*. Fa eccezione il contenuto di polisaccaridi, il cui incremento nelle tesi coinoculate varia in maniera

proporzionale al rapporto di inoculo *P. anomala*/*S. cerevisiae*.
L'acidità volatile (Fig. 48) nelle prove multistarter, risulta più elevata nelle tesi 2 e 3 rispetto ai relativi controlli, mentre nella tesi 1 i valori risultano simili.
Dalla tabella 43 si può rilevare un notevole incremento della produzione di etil acetato nelle tesi con coinoculo. Per i restanti composti non si evidenziano differenze tra le tesi in coltura pura e quelle in coinoculo, se non un leggero aumento del contenuto in propanolo.
Per gli altri composti volatili (Tab. 44), si evidenzia un decremento delle concentrazioni di alcuni analiti (etil ottanoato, etil decanoato e fenil etil acetato) negli svinati delle tesi 1 e 2, con inoculo di 10^7 e 10^5 cell/ml di *S. cerevisiae*. Nella tesi 3, con inoculo pari a 10^3 cell/ml di *S. cerevisiae*, il contenuto di esanolo e acido esanoico aumenta.

- *Saccharomycodes ludwigii* (ceppo 62)

Nelle prove coinoculate con le diverse concentrazioni di *S. cerevisiae* e il ceppo 62 di *Saccharomycodes ludwigii* non si osservano grandi differenze nella cinetica di fermentazione (Fig. 49) come invece si è potuto osservare per la gran parte degli altri ceppi di non-*Saccharomyces* saggiati. L'andamento fermentativo del ceppo 62 di *S. ludwigii* in coltura pura (Fig. 15) è risultato d'altra parte simile a quello mostrato in coltura mista ai tre livelli di inoculo (Fig. 49). Il ruolo dominante del ceppo 62 di *S. ludwigii* in queste fermentazioni è testimoniato anche dal fatto che il ceppo di *S. cerevisiae* risulta in qualche modo rallentato nel suo sviluppo quando inoculato in concentrazioni più basse (tesi 2 e 3). In particolare nella tesi 3 (Fig. 50), il ceppo di *S. cerevisiae* non riesce a raggiungere, neanche a fine fermentazione, le stesse concentrazioni cellulari della tesi 1, come invece è accaduto

in tutte le altre fermentazioni coinoculate con gli altri ceppi di lieviti non-*Saccharomyces.* Pur con leggere differenze tra le repliche, nelle tesi 2 e 3 il livello di CO_2 svolta è mediamente più basso di circa 5 g rispetto alla tesi 1 (Fig. 49).
Rispetto ai principali parametri enologici (Tab. 45), non si rilevano particolari differenze tra i fermentati delle colture miste e quelli dei relativi contolli in coltura pura. In tutte le tesi tuttavia si osserva un leggero aumento di glicerina e un notevole incremento di polisaccaridi totali che è risultato 2-3 volte superiore rispetto alle relative prove di controllo con *S. cerevisiae* in coltura pura.
Come si può notare dalla figura 51, in tutte le prove il tenore di acidità volatile è risultato simile ed inferiore a 0,5 g/l.
Dalla tabella 46 si può rilevare un incremento della produzione di acetato di etile in linea con quello della coltura pura di *S. ludwigii*. Per i restanti composti non si possono evidenziare differenze tra le tesi in coltura pura di *Saccharomyces* e quelle in coinoculo.

- *Saccharomycodes ludwigii* (ceppo 64)

Contrariamente a quanto osservato con il ceppo 62 di *S. ludwigii*, tra le tesi coinoculate con il ceppo 64 sono state registrate grandi differenze nelle velocità di fermentazione. La velocità fermentativa in coltura pura del ceppo *S. ludwigii* 64 è risultata molto più bassa non solo rispetto a quella del ceppo 62 (Fig. 15 a) ma anche rispetto a quella mostrata in coltura mista ai tre livelli di inoculo (Fig. 52). La cinetica di fermentazione della coltura pura di *S. ludwigii* è risultata molto simile a quella di una delle due repliche della tesi 3 in coltura mista, tale da far supporre, anche in questo caso, che il ceppo di *S. cerevisiae* risulti in qualche modo inibito da *S. ludwigii*, come confermato d'altra parte ancora una volta dalla più bassa velocità di crescita registrata

sempre nella stessa replica (Fig. 53 c). Anche in questo caso, come nella tesi 3 per il ceppo 62 di *S. ludwigii*, il ceppo di *S. cerevisiae* non riesce a raggiungere, neanche a fine fermentazione, le stesse concentrazioni cellulari della tesi 1, come invece è accaduto in tutte le altre fermentazioni coinoculate con gli altri ceppi di lieviti non-*Saccharomyces*. Pur tenendo conto delle differenze tra le repliche, il livello di CO_2 svolta nella tesi 3 è mediamente risultata più bassa di circa 10 g rispetto a quella prodotta nella tesi 1.

Rispetto ai principali parametri enologici (Tab. 47), si rileva la tendenza ad una leggera riduzione nel tenore alcolico nei vini delle prove con rapporto di inoculo *S. ludwigii / S. cerevisiae* più elevato. In tutte le tesi si osserva un moderato aumento di glicerina e un notevole incremento di polisaccaridi totali che è risultato 2-3 volte superiore rispetto alle relative prove di controllo con *S. cerevisiae* in coltura pura.

La produzione di acidità volatile (Fig. 54) nelle prove in coinoculo è risultata inferiore a quelle delle rispettive prove condotte in coltura pura dal ceppo di *S. cerevisiae*.

L'analisi dei principali composti volatili (Tab. 48) ha evidenziato un notevole incremento nella produzione di etile acetato nelle tesi 2 e 3 (con *S. cerevisiae* inoculato con 10^5 e 10^3 cell/ml) e un moderato incremento degli alcoli amilici in tutte e tre le tesi rispetto ai relativi controlli in coltura pura.

Riguardo alla produzione degli altri composti volatili (Tab. 49), in tutte le prove di coinoculo si ha una diminuzione di etil decanoato e feniletil acetato, e un incremento nei livelli di esanolo e 2-feniletanolo rispetto all'inoculo in coltura pura di *Saccaromyces*.

- *Zygosaccharomyces florentinus* (ceppo 42)

Le cinetiche di fermentazione delle diverse prove di coltura mista con *Z. florentinus*, ancora una volta mettono in evidenza le differenze tra le tre tesi con i diversi livelli di inoculo di *S. cerevisiae*. In particolare, la cinetica fermentativa della tesi 1 risulta simile a quella della medesima prova con la coltura pura di *Saccharomyces* (Fig. 13) ma molto diversa da quella con la coltura pura di *Z. florentinus* (Fig. 15 a). Ciò dimostra che, nonostante *Z. florentinus* rimanga a concentrazioni elevate e simili a quelle del ceppo starter di *Saccharomyces* durante tutto il processo fermentativo (Fig. 56), il ceppo di *Saccharomyces* svolge un ruolo dominante nei riguardi dell'attività fermentativa. Ancora una volta invece, la più bassa concentrazione di *Saccharomyces* nelle tesi 2 e 3 al momento dell'inoculo, determina, in modo proporzionale, un rallentamento della fermentazione (Fig. 55).
Nella tesi 2 lo sviluppo cellulare del ceppo di *S. cerevisiae* (Fig. 56) risulta simile alla medesima prova con la coltura pura (Fig. 14), così come il ceppo di *Zygosaccharomyces* mantiene costante la sua concentrazione iniziale per tutto il processo fermentativo. Al contrario nella tesi 3, il ceppo di *Saccharomyces*, rispetto a quando in coltura pura, rallenta la sua crescita nelle fasi iniziali della fermentazione, raggiungendo solamente dopo 9 giorni il massimo della sua concentrazione cellulare (Fig. 56) determinando così anche la più bassa attività fermentativa (Fig. 55).
A fronte di una diversa cinetica fermentativa al termine della fermentazione (23 giorni) la CO_2 svolta si uniforma nelle tre tesi intorno ad un livello medio di circa 40-45 g.
I principali parametri enologici riportati in tabella 50 non evidenziano in generale differenze tra le tesi in coinoculo e quelle in coltura pura anche a bassi livelli di inoculo del *S. cerevisiae*. Fa eccezione la produzione di polisaccaridi, che sono risultati sempre superiori in presenza del ceppo 42 di

Z. florentinus confermando quanto prodotto in coltura pura. Riguardo alla produzione di acido acetico, i risultati ottenuti (Fig. 57) mostrano come il ceppo 42 di *Z. florentinus* determina nelle fermentazioni miste una diminuzione dell'acidità volatile, a livelli analoghi a quelli che tale ceppo ha prodotto in coltura pura (0,29 g/l).
Per principali composti volatili (Tab. 51), nelle tesi 2 e 3 si evidenzia un aumento del propanolo e dell'amilico attivo e una riduzione dell'isobutanolo.
Rispetto alla formazione degli altri composti volatili (Tab. 52), si nota in generale un incremento sensibile in riferimento alla maggior presenza di esteri acetati, esanolo e 2-fenil etanolo, mentre diminuisce la concentrazione dell'etil ottanoato ed etil decanoato.

- *Zygosaccharomyces bailii* (ceppo 89)

Le cinetiche di fermentazione delle tre diverse prove di coltura mista con *Z. bailii*, pur mostrando differenze nelle due repliche, ancora una volta mettono comunque in evidenza le differenze tra le tre tesi con i diversi livelli di inoculo di *S. cerevisiae*.
In particolare, la cinetica fermentativa della tesi 1 (Fig. 58) risulta simile a quella della medesima prova con la coltura pura di *Saccharomyces* (Fig. 13) ma molto diversa da quella con la coltura pura di *Z. bailii* (Fig. 15). Ciò dimostra la dominanza dello starter *Saccharomyces* sul lievito *Z. bailii*, testimoniato inoltre dal fatto che solo in questa tesi il ceppo di *Z. bailii* mostra una diminuzione della concentrazione cellulare dopo circa 10 giorni di fermentazione (Fig. 59). Nelle tesi 2 e 3, invece, la concentrazione iniziale di *Z. bailii* rimane costante fino a fine fermentazione. La più bassa concentrazione di *Saccharomyces* nelle tesi 2 e 3 al momento dell'inoculo e rispettivamente nel rapporto di 1:100 e 1:10.000 rispetto a *Z. bailii*, determinano, in modo

proporzionale, un rallentamento della fermentazione (Fig. 58).
La minore velocità di fermentazione nella tesi 2 non è comunque accompagnata da una minore crescita né del ceppo di *S. cerevisiae*, che si mantiene tra l'altro simile alla medesima prova con la coltura pura (Fig. 14 a, b), né del ceppo di *Zygosaccharomyces*, che mantiene la sua concentrazione iniziale costante per tutto il processo fermentativo. Al contrario, nella tesi 3, il ceppo di *S. cerevisiae*, rispetto a quando in coltura pura, rallenta la sua crescita nelle fasi iniziali della fermentazione, raggiungendo solamente dopo 9 giorni il massimo della sua concentrazione cellulare (Fig. 59) determinando così anche la più bassa attività fermentativa (Fig. 58). A fronte di una diversa cinetica fermentativa al termine della fermentazione (23 giorni) la CO_2 svolta si uniforma nelle tre tesi intorno ad un livello medio di circa 40 g.
I principali parametri enologici, riportati in tabella 53, evidenziano alcune differenze principalmente ascrivibili al quadro acido, alla produzione di polisaccaridi e glicerolo che sono risultati sempre superiori rispetto ai relativi controlli in coltura pura di *Saccharomyces*. Tali incrementi risultano sempre inversamente proporzionali al rapporto di inoculo.
Per quanto riguarda la produzione di acidità volatile (Fig. 60) non si rilevano differenze significative tra le tesi coinoculate ed i rispettivi controlli in coltura pura di *S. cerevisiae*, nonostante *Z. bailii* in coltura pura mostri valori sensibilmente più elevati. Un leggero incremento progressivo dell'acidità volatile si può notare passando dai livelli più alti a quelli più bassi di inoculo della coltura starter di *S. cerevisiae.*
Riguardo ai principali composti volatili (Tab. 54), si evidenzia un leggero e generale aumento dei loro livelli, in particolar modo nelle tesi 2 e 3.

- *Schizosaccharomyces pombe* (ceppo 95)

Da un confronto della cinetica fermentativa di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura (Fig. 13) e quella in coltura mista con *Schizosaccharomyces pombe* (Fig. 61) si può notare ancora una volta come essa sia fortemente influenzata dal diverso rapporto di inoculo. Nella tesi 1 (*Saccharomyces* 10^7: *S. pombe* 10^7), l'elevata concentrazione iniziale consente al lievito *Saccharomyces* di svolgere la fermentazione con una cinetica simile a quella presentata in coltura pura, quindi senza risultare influenzato dal lievito *S. pombe* presente in uguali concentrazioni iniziali di inoculo. Concentrazioni più basse di *Saccharomyces* al momento dell'inoculo e precisamente nel rapporto di 1:100 e 1:10.000 rispetto a *S. pombe*, determinano, in modo proporzionale, un rallentamento della fermentazione maggiore di quello osservato nella coltura pura di *S. cerevisiae* rispettivamente sempre nelle tre concentrazioni di inoculo. Rispetto alla tesi 1, infatti, la quantità di CO_2, dopo 10 giorni di fermentazione, è circa 3/4 nella tesi 2 e circa 1/2 nella tesi 3. Il ceppo di *S. cerevisiae* comunque non risulta particolarmente influenzato dalla presenza di *S. pombe* nella crescita mostrando infatti in tutte e tre le tesi un comportamento simile a quello osservato in coltura pura. Fa eccezione la tesi 3 in cui il ceppo di *S. cerevisiae*, mostra una crescita più lenta durante i primi 7 giorni di fermentazione rispetto alla medesima prova ma in coltura pura determinando al termine della fermentazione (23 giorni) una produzione di CO_2 mediamente più bassa di circa 10 g rispetto alla tesi 1.
Dall'analisi dei principali parametri enologici (Tab. 55), si evidenzia che il ceppo 95 mostra una buona attività disacidificante, come si può evincere dai dati di pH e acidità totale della coltura pura, influenzando, di riflesso, anche il quadro acidico delle prove coinoculate con *S. cerevisiae*. Le produzioni di etanolo non sono significativamente differenti.

L'elevato incremento nel livello di polisaccaridi nei fermentati con *S. pombe*, si accompagna, in tutte le tesi coinoculate, ad un altrettanto significativo incremento del tenore di glicerolo in modo inversamente proporzionale all'inoculo di *S. cerevisiae*. Tali concentrazioni sono in linea con le produzioni di *S. pombe* in coltura pura.
I valori di acidità volatile (Fig. 63) in tutte le prove multi starter sono risultati inferiori a quelli dei rispettivi controlli condotti in coltura pura dal ceppo di *S. cerevisiae*.
L'analisi dei principali composti volatili (Tab. 56) evidenzia un notevole incremento dell'acetato di etile, isobutanolo e alcoli amilici.

4.2.2. Valutazione dell'attitudine enologica di 7 combinazioni di lieviti, mediante microvinificazioni su scala pilota

In questa fase sono state allestite delle microvinificazioni presso la cantina sperimentale del consorzio Tuscania.
Le fermentazioni sono state effettuate in serbatoi di acciaio da 100 litri, riempiti con 70 litri di pigiato di uve Sangiovese e inoculando sette ceppi di lievito non-*Saccharomyces* selezionati tra quelli utilizzati nella precedente fase di sperimentazione (Tab. 58). I lieviti non-*Saccharomyces* sono stati inoculati in combinazione con lo starter commerciale *S. cerevisiae*. Dopo il riempimento dei serbatoi, il pigiato è stato inoculato con un volume della precoltura di ciascun ceppo di non-*Saccharomyces*, sviluppata in laboratorio a 25°C per 72h su mosto biologico. Il volume inoculato è stato calcolato mediante conta cellulare al Thoma in modo da standardizzare l'inoculo iniziale ovvero 10^7 cell/ml. Dopo tre giorni dall'inoculo dei lieviti non-*Saccharomyces* è stato inoculato il ceppo commerciale di *S. cerevisiae* alla concentrazione di 10^7 cell/ml, preparato per reidratazione del LSA secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice del lievito. Come controllo è stata allestita un'ulteriore prova di microvinificazione, inoculata con il solo ceppo del commercio *S. cerevisiae* EC1118.
Da ciascun serbatoio sono stati quindi effettuati dei prelievi immediatamente dopo l'inoculo e dopo 3, 5, 10 e 15 giorni di fermentazione per la determinazione della conta vitale dei lieviti.
In figura 64 sono riportate le evoluzioni della popolazione microbica durante le microvinificazioni condotte presso la cantina sperimentale del Consorzio Tuscania (vendemmia 2009).

Nel mosto di partenza è stata rilevata una notevole presenza di lieviti non-*Saccharomyces* spontanei che nella maggior parte delle prove si attestavano intorno a 10^6-10^7 cell/ml, mantenendosi a tali livelli anche nelle fasi avanzate della fermentazione. La popolazione dei *Saccharomyces* è sempre stata capace di dominare il processo fermentativo attestandosi su concentrazioni di 10^8 cell/ml. Tuttavia nelle prove inoculate con *Hanseniaspor*a e *Kluyveromyces* si può notare una netta riduzione della popolazione saccharomicetica. In queste prove sequenziali, hanno fatto registrare un buon sviluppo in coltura mista *Candida*, *Hanseniaspora, Torulaspora* e *Kluyveromyces* mentre *Metschnikowia* e *Pichia* sono risultate scarsamente persistenti e praticamente assenti alla fine del processo fermentativo.

Il mosto utilizzato per le prove aveva la composizione sommaria sotto riportata:

Mosto	ac. totale g/l	zuccheri %
media vasche	4.00 (3.87-4.12)	23,4 (22,7-24,1)

Si riportano di seguito i risultati relativi ai parametri riscontrati nei vini dopo stabilizzazione.
Riguardo alla resa in etanolo (Fig. 65), solo le fermentazioni condotte con *Kluyveromyces* ed inoculo sequenziale di *Saccharomyces* hanno portato a vini con tenore alcolico del tutto simile a quello riscontrato nei vini delle fermentazioni di controllo inoculate con *Saccharomyces.* Nei vini delle restanti prove si è osservata una leggera riduzione, che è

giunta a circa 0,5 gradi alcol nelle fermentazioni miste con *Zygosaccharomyces.* L'acidità volatile è risultata aumentare nelle fermentazioni miste con *Pichia, Candida* e *Hanseniaspora*, mentre in quelle con *Zygosaccharomyces* e *Metschnikowia* si è osservata una leggera riduzione.
Ad eccezione delle fermentazioni miste con *Pichia* ed *Hanseniaspora* (Fig. 66), tutte le altre hanno portato ad un aumento del tenore di acidità totale nei relativi vini. Riguardo al pH, nei fermentati da coltura mista con *Candida, Torulaspora, Metschnikowia* e *Zygosaccharomyces* sono stati riscontrati valori più bassi rispetto alla fermentazione di controllo con *Saccharomyces*.
La figura 67 mostra che, rispetto al controllo con *Saccharomyces*, dalle fermentazioni con inoculo misto con *Zygosaccharomyces* e con *Metschnikowia* sono derivati vini con un più elevato tenore di acido malico, mentre nel vino ottenuto da inoculo con *Kluyveromyces* si è avuto una concentrazione più bassa. In quest'ultimo svinato si evidenzia anche un contenuto di acido D/L-lattico sensibilmente superiore a quelli riscontrati nei vini di tutte le altre fermentazioni.
Dalla figura 68 si evince che, nei vini ottenuti dalle fermentazioni miste con *Kluyveromyces, Metschnikowia, Torulaspora* e in particolare con *Candida,* si è avuto un incremento di glicerolo rispetto al controllo.
La figura 69 mostra come, rispetto ai vini di controllo (inoculo solo di *Saccharomyces*) si è registrato un più elevato tenore in polisaccaridi in quasi tutti i vini, in particolare in quello derivante da fermentazione mista con *Kluyveromyces*; fanno eccezione i vini ottenuti dalle fermentazioni miste con *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces.*
I livelli di acetaldeide, propanolo ed alcol amilico sono risultati simili a quelli riscontrati nei vini di controllo (Fig. 70). Si è riscontrato, invece, un notevole aumento del lattato di etile nei vini da fermentazione mista con *Kluyveromyces.*

L'acetato di etile è risultato più elevato nei vini ottenuti dalle fermentazioni con inoculi misti con *Hanseniaspora* e *Metschnikowia.* Nei vini derivati dalle fermentazioni con *Metschnikowia, Torulaspora, Kluyveromyces* e, in particolar modo con *Candida*, si sono osservati livelli più elevati di isobutanolo rispetto ai vini di controllo. L'alcol isoamilico è presente a concentrazione più elevata nei vini derivati dalle fermentazioni con *Metschnikowia, Torulaspora* e *Kluyveromyces;* nei vini ottenuti da *Candida* e *Zygosaccharomyces* sono stati riscontrati tenori leggermente più bassi.
Dal grafico riportato in figura 71 si evince che nella maggior parte dei vini ottenuti da fermentazioni miste si è avuto un minor tenore di etil esanoato, etil ottanoato e, ad eccezione della prova con *Hanseniaspora,* di fenil etil acetato. L'acido butirrico era presente a livelli maggiori nei vini derivati dalle fermentazioni miste con *Hanseniaspora, Kluyveromyces* e *Zygosaccharomyces* mentre, sempre rispetto ai vini di controllo, quelli derivati dalle fermentazioni miste con *Candida, Pichia* e *Metschnikowia,* erano caratterizzati da una minore quantità di questo composto. Tutti i vini derivati dalle fermentazioni con inoculi misti, e particolarmente quelli con *Candida, Hanseniaspora, Metschnikowia, Torulaspora* e *Kluyveromyces*, hanno mostrato livelli di 2-fenil etanolo assai più elevati di quelli riscontrati nei vini di controllo.

Il contenuto di polifenoli totali è risultato simile o di poco superiore rispetto ai vini di controllo, mentre si è osservato un aumento di antociani totali, particolarmente evidente nei vini ottenuti dalle fermentazioni con *Pichia* e *Candida* (Fig. 72).

4.2.3. Figure e tabelle II anno di sperimentazione

Tabella 13: lieviti non-Saccharomyces impiegati in coinoculo.

Codice	Lievito non-*Saccharomyces*
22	*Candida zemplinina*
69	*Candida tropicalis*
92	*Torulaspora delbrueckii*
94	*Torulaspora delbrueckii*
101	*Kluyveromyces thermotolerans*
103	*Kluyveromyces thermotolerans*
46	*Metschnikowia pulcherrima*
25	*Hanseniaspora osmophila*
32	*Hanseniaspora osmophila*
4	*Pichia fermentans*
9	*Pichia anomala*
62	*Saccharomycodes ludwigii*
64	*Saccharomycodes ludwigii*
42	*Zygosaccharomyces florentinus*
89	*Zygosaccharomyces bailii*
95	*Schizosaccharomyces pombe*

Saccharomyces cerevisiae EC1118

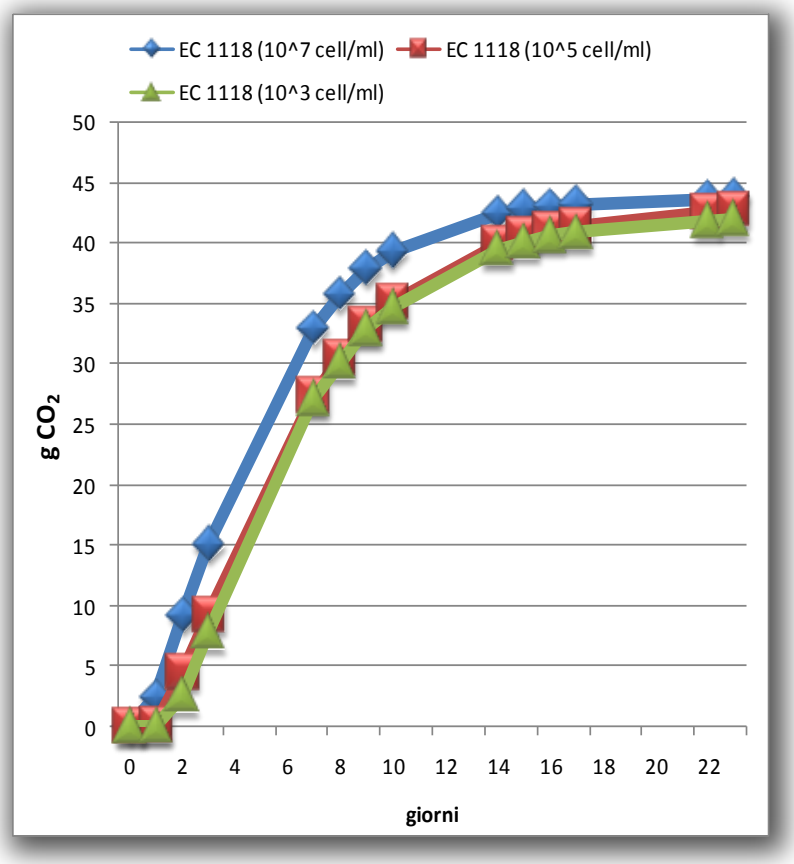


Figura 13: cinetica di fermentazione di S. cerevisiae in coltura pura ai tre livelli di inoculo (media risultati delle prove valutate separatamente nelle due unità operative)

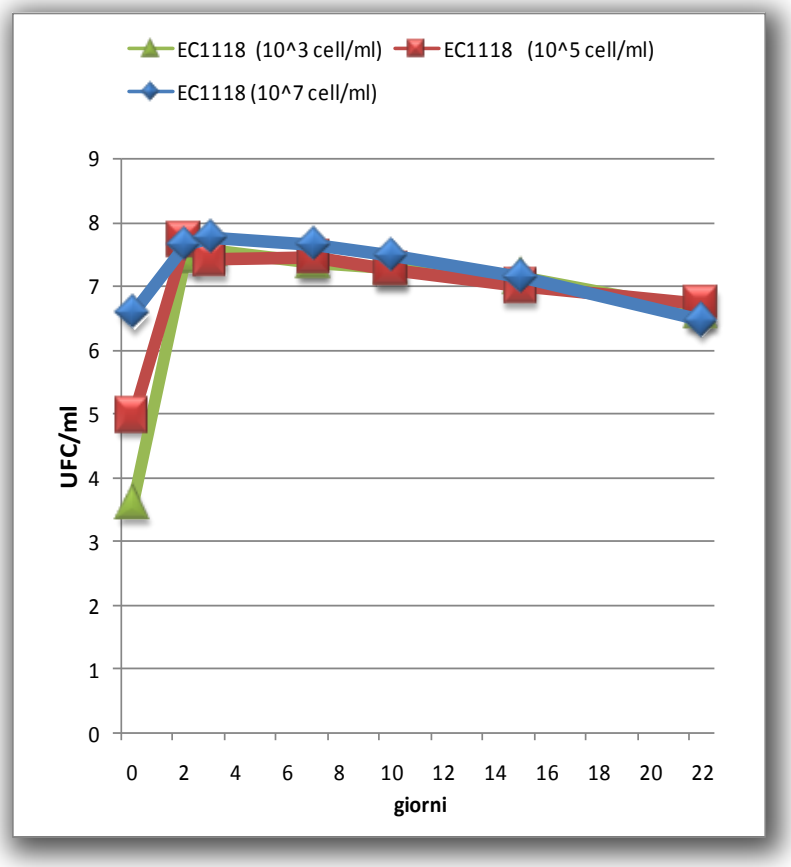


Figura 14: evoluzione della popolazione microbica vitale nelle prove con S. cerevisiae in coltura pura con tre diverse concentrazioni, 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml e 10^3 cell/ml (media delle conte valutate separatamente nelle due unità operative)

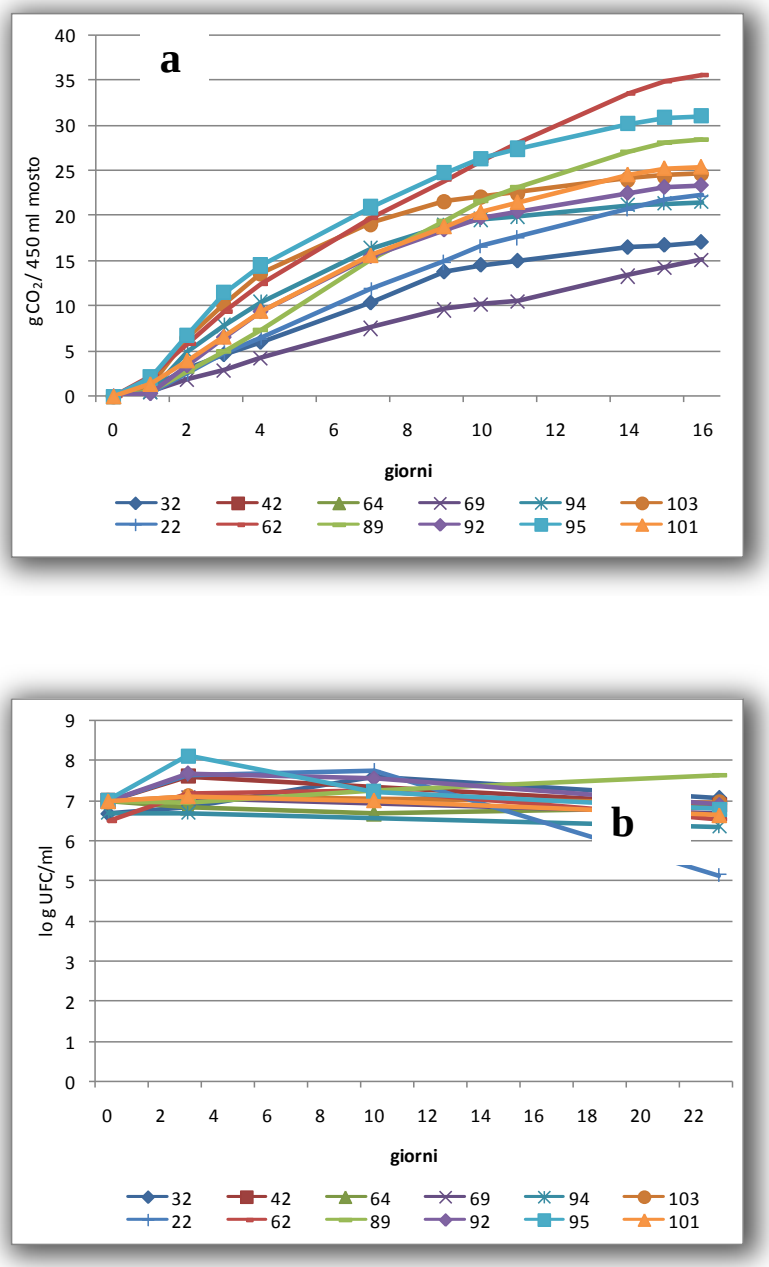


Figura 15: (a) cinetica di fermentazione ed (b) evoluzione della popolazione microbica vitale dei lieviti non-Saccharomyces in coltura pura.

Saccharomyces cerevisiae EC1118

Tabella 14: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con S. cerevisiae in coltura pura (media risultati delle prove valutate separatamente nelle due unità operative)

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
S. cerevisiae 10^7	3,27	6.82±0,22	13,85±0,07	6,4±0,73	92±13
S. cerevisiae 10^5	3,26	6.90±0,22	13,80±0,07	6,69±0,21	91±12
S. cerevisiae 10^3	3,25	6.82±0,20	13,75±0,13	6,83±0,62	74±7

Tabella 15: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. cerevisiae (media risultati delle prove valutate separatamente nelle due unità operative)

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
S. cerevisiae 10^7	31,05 ±0,56	21,79 ±0,48	36,16 ±0,47	29,59 ±1,15	75,95 ±6,40	13,41 ±1,07	111,83 ±1,38
S. cerevisiae 10^5	30,24 ±3,11	21,70 ±0,67	40,18 ±2,30	31,83 ±0,62	72,71 ±4,46	11,40 ±0,14	96,20 ±12,22
S. cerevisiae 10^3	27,17 ±0,19	20,63 ±0,69	36,14 ±0,71	31,54 ±2,80	78,56 ±5,97	12,57 ±0,82	105,72 ±0,41

Tabella 16: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. cerevisiae (media risultati delle prove valutate separatamente nelle due unità operative)

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esil acetato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
S. cerevisiae 10^7	0,256 ±0,012	0,184 ±0,023	0,032 ±0,012	0,379 ±0,045	0,162 ±0,026	0,380 ±0,004	0,249 ±0,008	0,802 ±0,011	12,065 ±0,403
S. cerevisiae 10^5	0,200 ±0,028	0,201 ±0,027	0,031 ±0,001	0,318 ±0,011	0,178 ±0,018	0,400 ±0,014	0,300 ±0,135	0,740 ±0,014	10,920 ±1,018
S. cerevisiae 10^3	0,269 ±0,045	0,190± 0,014	0,03 ±0,000	0,356 ±0,062	0,190 ±0,014	0,360 ±0,003	0,185 ±0,007	0,806 ±0,008	10,480 ±0,792

Candida zemplinina ceppo 22

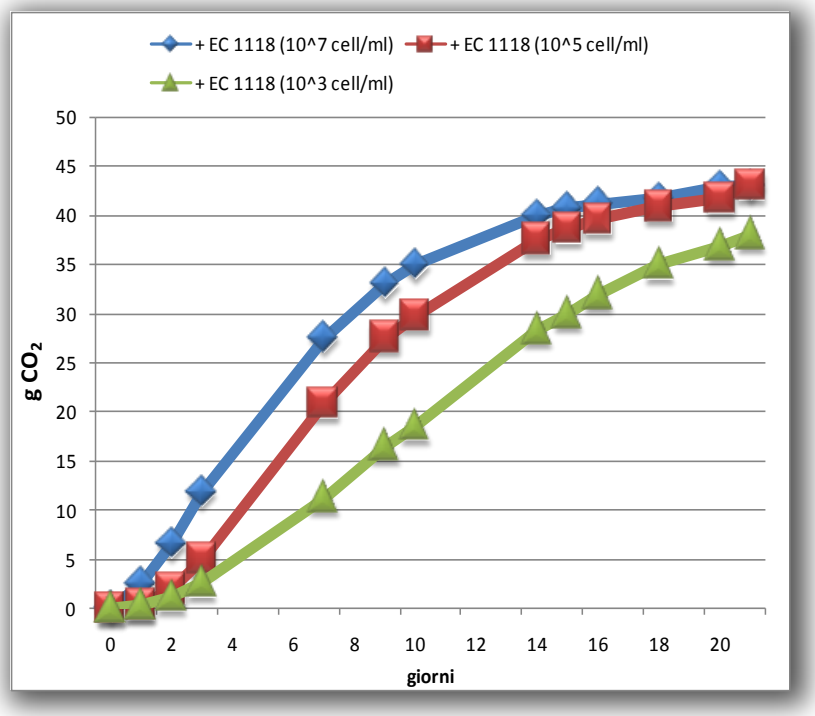


Figura 16: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con C. zemplinina

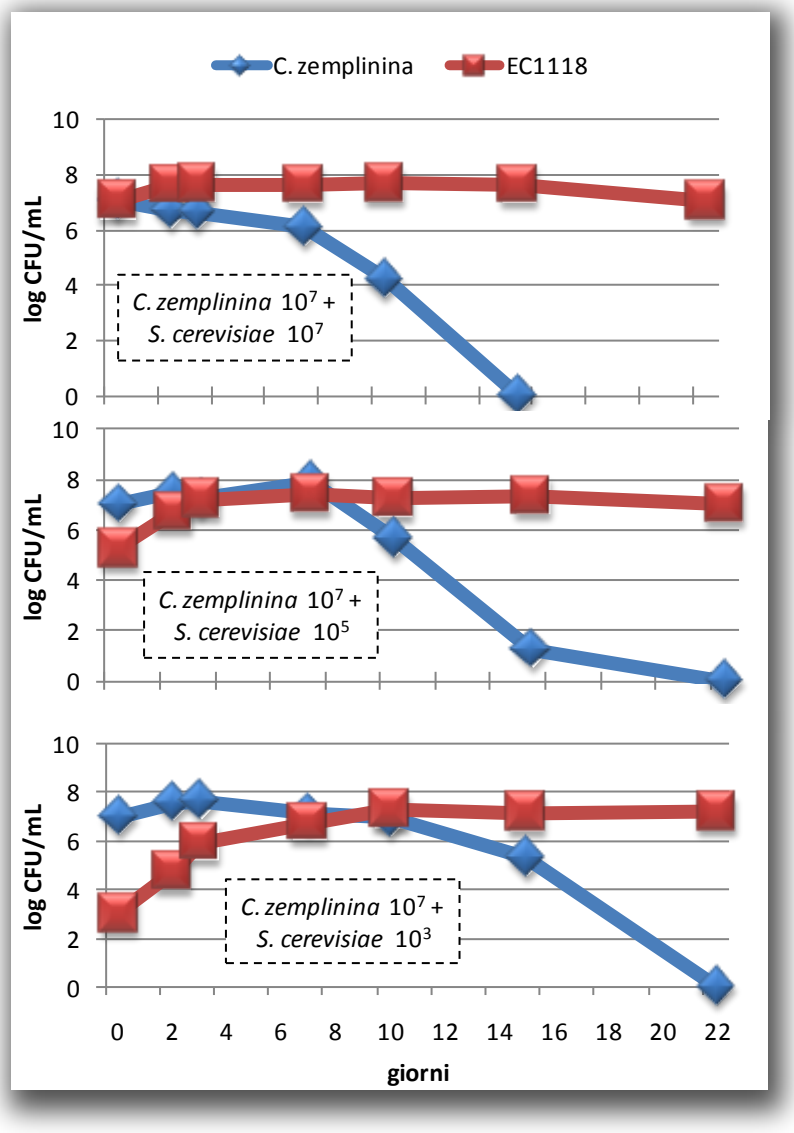


Figura 17: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

.

Tabella 17: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con C. zemplinina

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
C. zemplinina 10^7	3,07	6,50±0,32	8,23±0,10	8,43±0,28	145±18
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,21	6,88±0,27	13,83±0,04	6,25±0,30	123±42
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,15	6,84±0,02	13,78±0,05	7,18±1,30	140±42
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,08	6,88±0,04	13,64±0,04	7,95±1,28	181±48

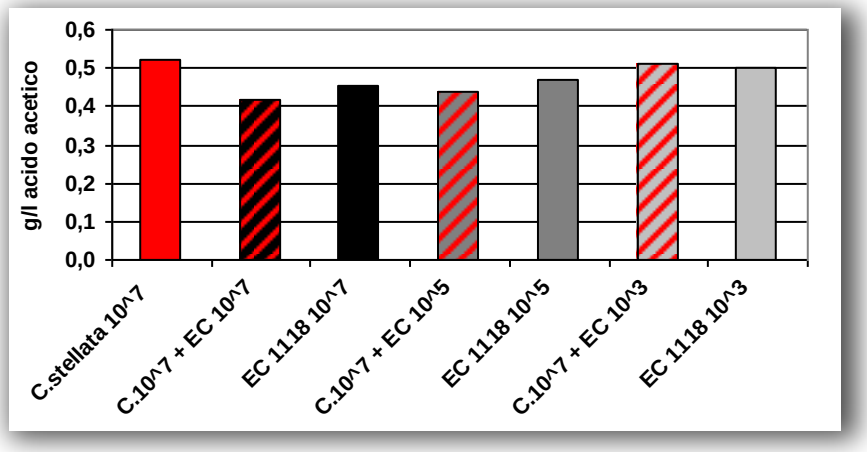


Figura 18: acidità volatile nei fermentati delle prove con C. zemplinina

Tabella 18: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con C. zemplinina

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
C. zemplinina 10^7	16,50 ±6,32	24,14 ±0,33	18,82 ±1,33	14,26 ±0,82	67,43 ±5,69	7,60 ±0,25	22,88 ±3,45
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	27,58 ±10,42	21,02 ±0,27	35,51 ±3,85	30,72 ±3,08	67,51 ±4,39	13,56 ±0,85	112,26 ±8,96
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	22,78 ±7,59	21,82 ±0,64	44,98 ±1,87	38,30 ±3,07	79,29 ±23,37	13,01 ±2,68	86,58 ±7,95
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	25,83 ±8,35	22,16 ±0,33	48,44 ±5,07	40,63 ±0,34	78,52 ±11,33	13,57 ±0,90	82,16 ±7,27

Tabella 19: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con C. zemplinina

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esil acetato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,156 ±0,034	0,235 ±0,052	0,020 ±0,001	0,457 ±0,074	0,213 ±0,040	0,277 ±0,033	0,271 ±0,003	0,840 ±0,061	12,605 ±1,124
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,095 ±0,008	0,177 ±0,033	0,040 ±0,014	0,443 ±0,010	0,157 ±0,031	0,281 ±0,070	0,191 ±0,008	0,700 ±0,007	15,795 ±3,670
C. zemplinina 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,073 ±0,010	0,152 ±0,054	0,021 ±0,001	0,362 ±0,054	0,119 ±0,016	0,232 ±0,069	0,136 ±0,006	0,757 ±0,017	11,115 ±0,445

Candida tropicalis ceppo 69

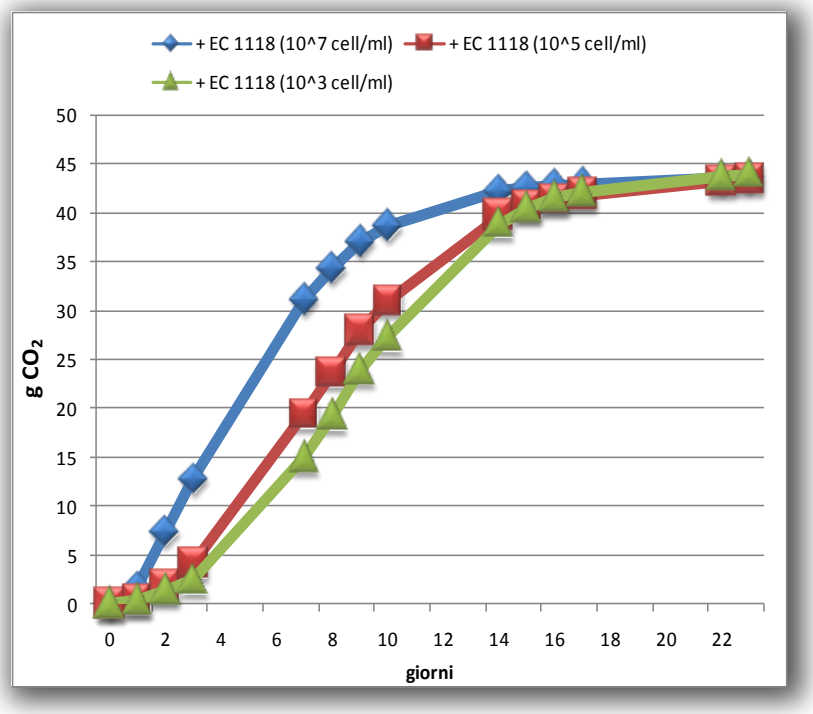


Figura 19: cinetica di fermentazione nelle prove coinoculate con C. tropicalis

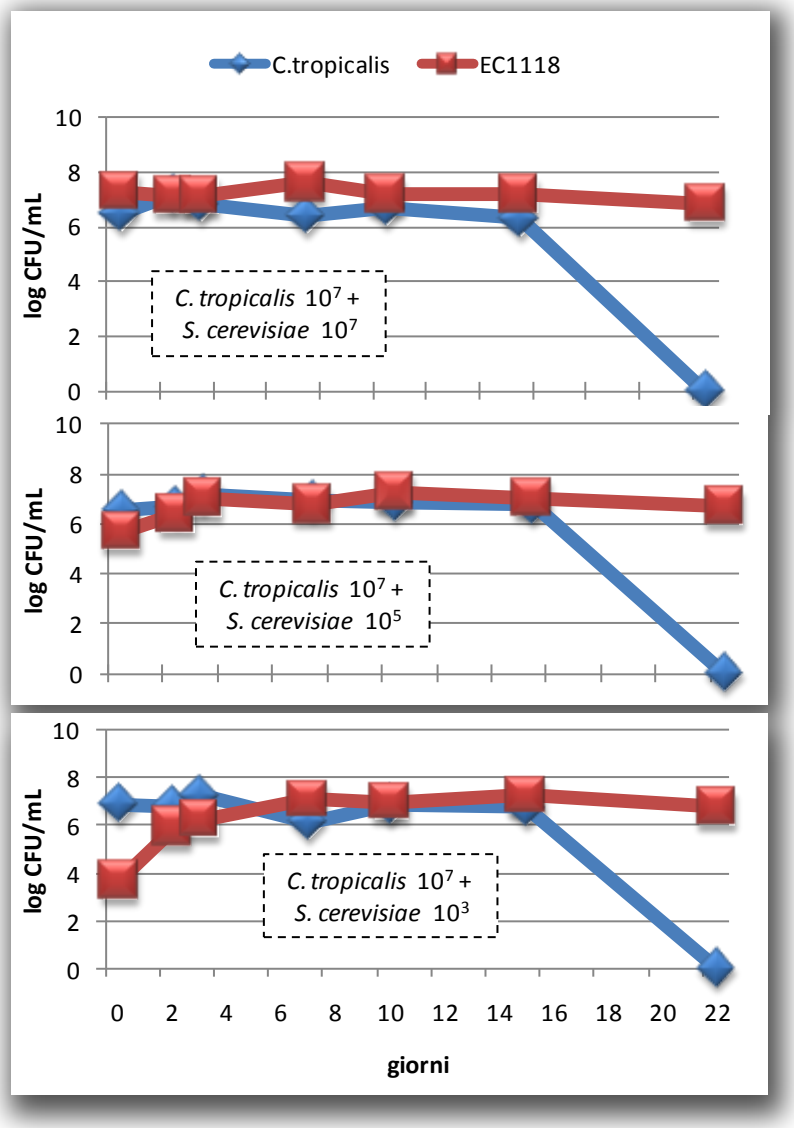


Figura 20: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 20: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con C. tropicalis

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
C. tropicalis 10^7	3,44	7,73±0,85	6,94±0,25	4,47±0,33	221±14
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,45	6,52±0,03	13,77±0,16	6,68±0,01	131±17
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,41	6,47±0,21	13,64±0,23	6,82±0,13	142±9
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,39	6,47±0,43	13,73±0,18	6,77±0,18	158±9

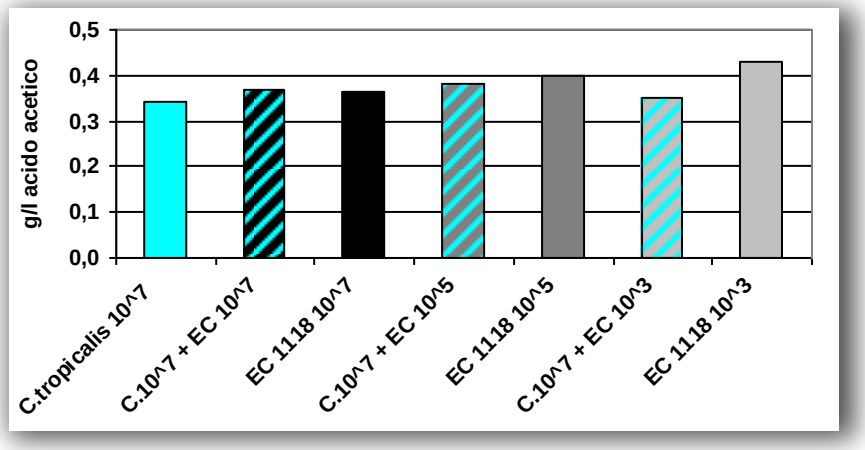


Figura 21: acidità volatile nei fermentati delle prove con C. tropicalis

Tabella 21: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con C. tropicalis

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
C. tropicalis 10^7	15,08 ±2,03	23,17 ±0,96	25,66 ±3,51	225,28 ±28,32	77,9 ±4,03	22,24 ±4,25	69,63 ±5,30
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	36,59 ±3,53	20,08 ±0,84	44,32 ±10,85	31,65 ±4,53	75,88 ±1,45	14,85 ±0,82	103,62 ±8,37
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	33,74 ±8,93	21,54 ±0,65	49,64 ±6,15	33,42 ±0,23	55,07 ±5,65	17,14 ±0,46	77,75 ±0,40
C. tropicalis 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	38,04 ±15,47	21,85 ±1,16	50,47 ±6,03	38,77 ±6,10	70,14 ±14,14	22,37 ±6,06	96,72 ±21,25

Torulaspora delbrueckii ceppo 92

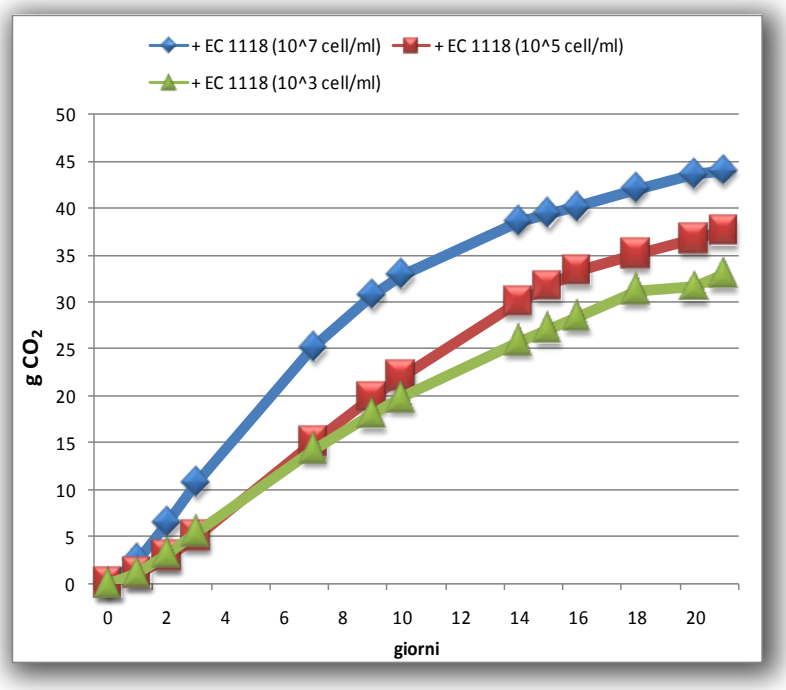


Figura 22: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter di T. delbrueckii

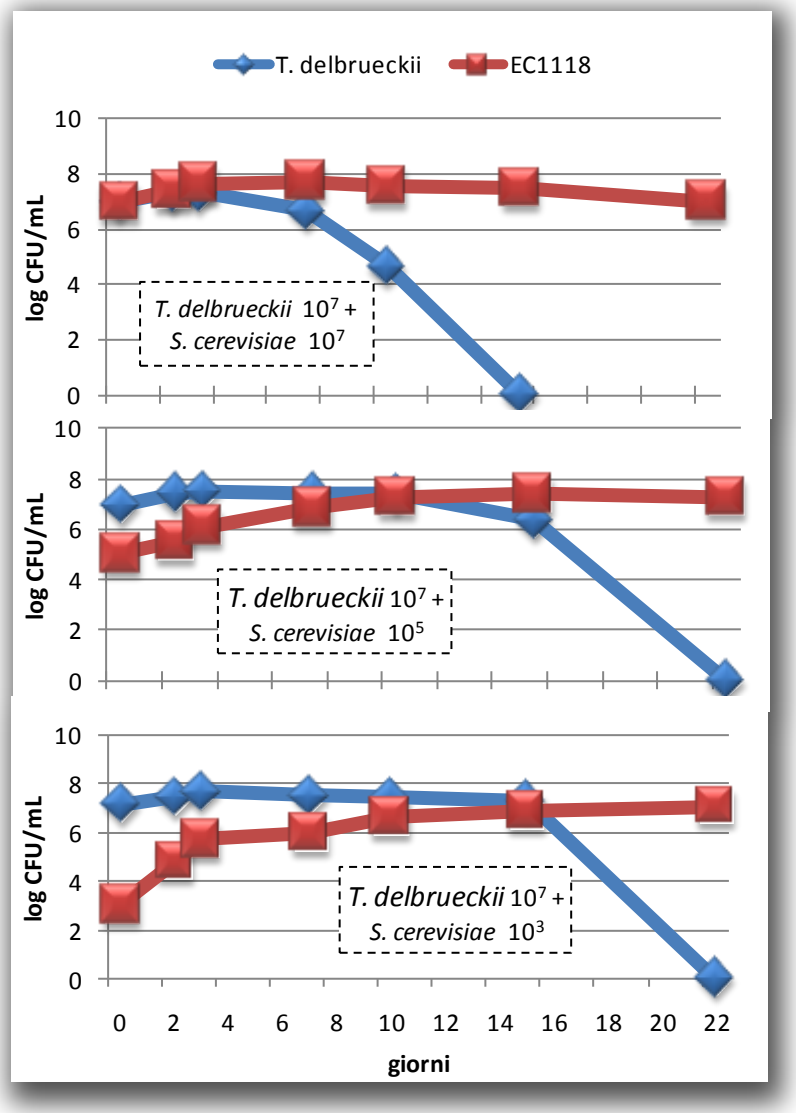


Figura 23: evoluzione della popolazione microbica vitale nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 22: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
T. delbrueckii 10^7	3,09	7,90±0,12	13,07±0,09	6,72±0,35	289±31
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,19	7,12±0,02	13,90±0,04	5,88±0,04	157±16
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,10	7,36±0,51	13,85±0,08	6,14±0,22	269±44
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,08	7,34±0,49	13,76±0,04	6,29±0,61	308±42

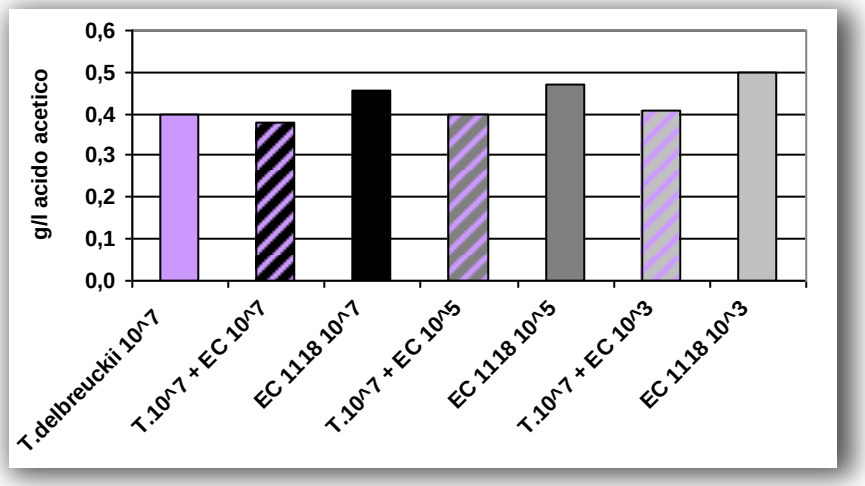


Figura 24: acidità volatile nei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Tabella 23: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
T. delbrueckii 10^7	26,42 ±5,27	20,85 ±1,86	41,81 ±6,32	57,24 ±4,55	41,59 ±6,31	15,11 ±1,13	105,48 ±15,28
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	29,68 ±9,96	21,39 ±0,97	39,02 ±9,44	34,19 ±2,34	75,48 ±9,17	17,83 ±1,77	136,50 ±9,91
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	23,90 ±4,81	20,04 ±1,57	46,18 ±12,61	48,14 ±0,97	77,52 ±12,31	26,37 ±0,36	139,10 ±1,85
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	26,06 ±4,83	22,07 ±1,60	47,65 ±9,47	50,52 ±4,19	66,45 ±12,28	28,48 ±2,48	141,51 ±14,30

Tabella 24: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esil acetato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,284 ±0,013	0,229 ±0,016	0,018 ±0,004	0,373 ±0,011	0,177 ±0,009	0,187 ±0,019	0,143 ±0,047	0,670 ±0,008	13,710 ±0,721
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,427 ±0,038	0,174 ±0,037	0,020 ±0,014	0,344 ±0,023	0,142 ±0,040	0,314 ±0,008	0,093 ±0,038	0,714 ±0,009	16,885 ±0,403
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,276 ±0,035	0,110 ±0,014	0,030 ±0,014	0,378 ±0,018	0,045 ±0,008	0,260 ±0,004	0,057 ±0,019	0,342 ±0,005	19,910 ±1.004

Torulaspora delbrueckii ceppo 94

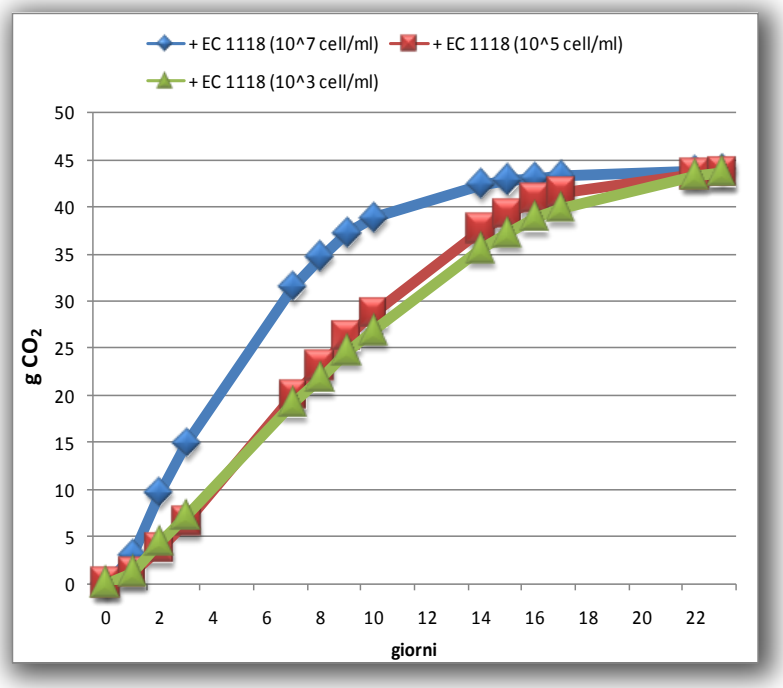


Figura 25: cinetica di fermentazione nelle prove coinoculate di T. delbrueckii

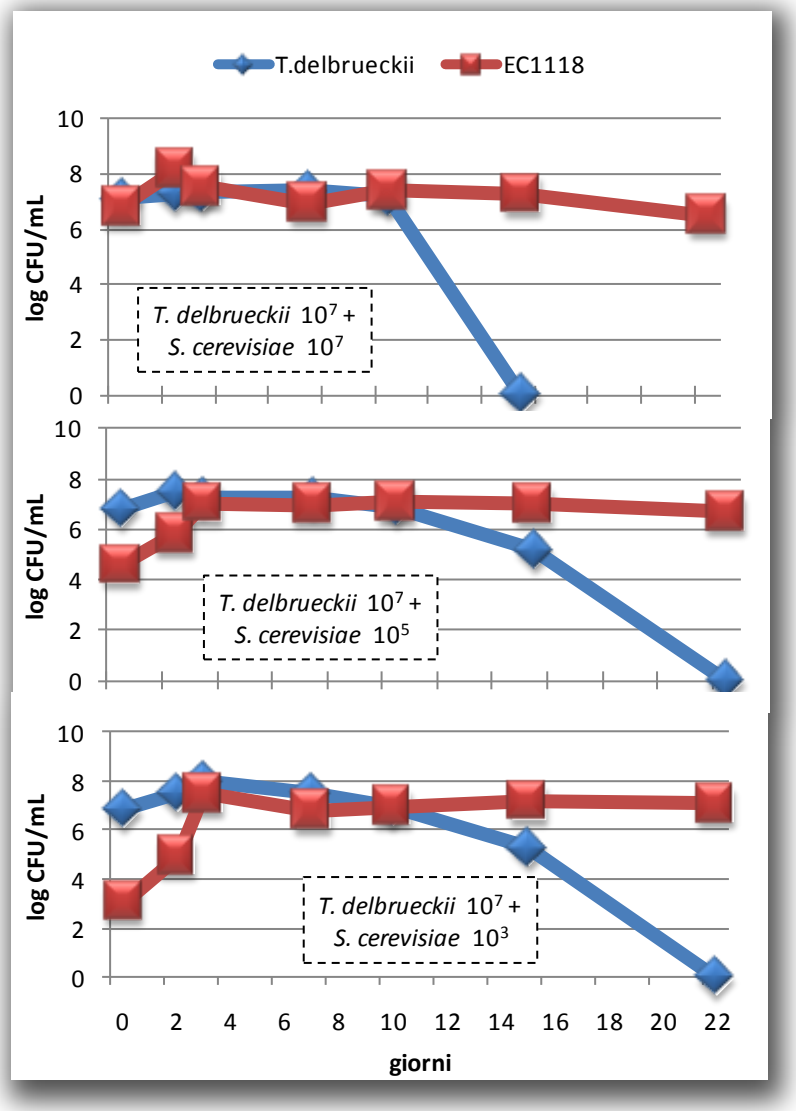


Figura 26: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 25: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
T. delbrueckii 10^7	3,47	7,35±0,16	7,92±0,18	4,75±0,28	124±9
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3.43	6,71±0,11	13,71±0,22	6,67±0,26	114±8
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,36	6,45±0,07	14,24±0,30	6,51±0,13	156±22
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,27	7,05±0,15	14,12±0,22	6,73±0,22	187±22

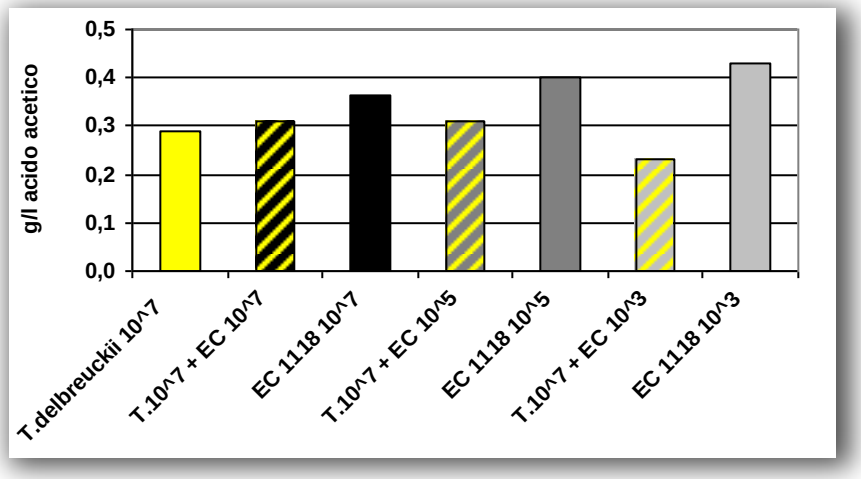


Figura 27: acidità volatile nei fermentati delle prove con T.delbrueckii

Tabella 26: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con T. delbrueckii

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
T. delbrueckii 10^7	14,85 ±2,01	22,27 ±3,52	25,92 ±4,27	71,74 ±8,64	12,34 ±2,43	11,35 ±1,02	51,71 ±1,21
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	40,48 ±7,59	21,85 ±0,93	43,88 ±0,44	32,15 ±0,64	83,75 ±3,61	18,11 ±0,96	120,8 ±2,90
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	27,82 ±2,03	23,03 ±2,33	69,34 ±2,29	43,00 ±2,39	65,78 ±0,61	19,80 ±0,45	95,26 ±4,66
T. delbrueckii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	34,45 ±13,00	22,05 ±0,30	79,40 ±6,39	37,08 ±6,11	70,10 ±16,80	29,33 ±3,77	110,6 ±11,25

Kluyveromyces thermotolerans ceppo 101

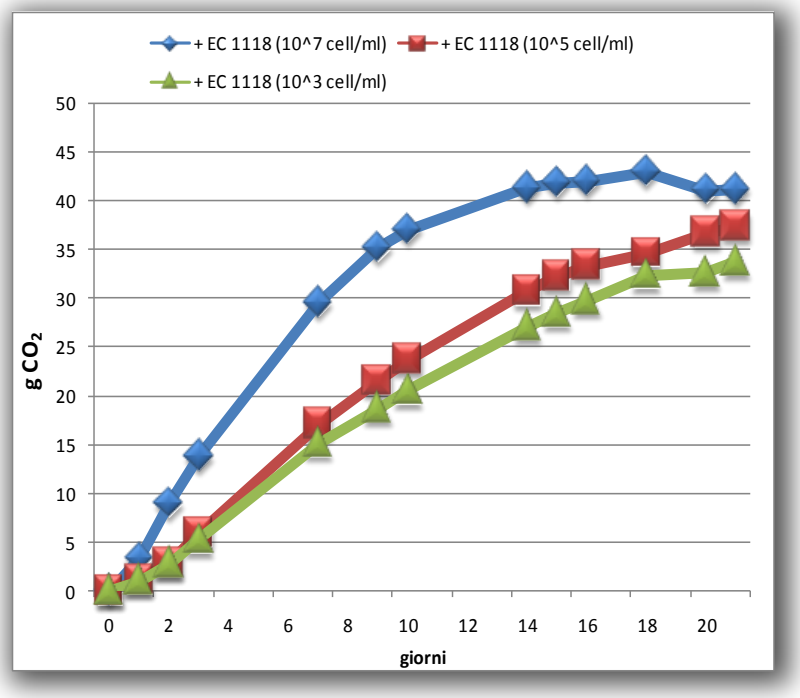


Figura 28: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con K. thermotolerans

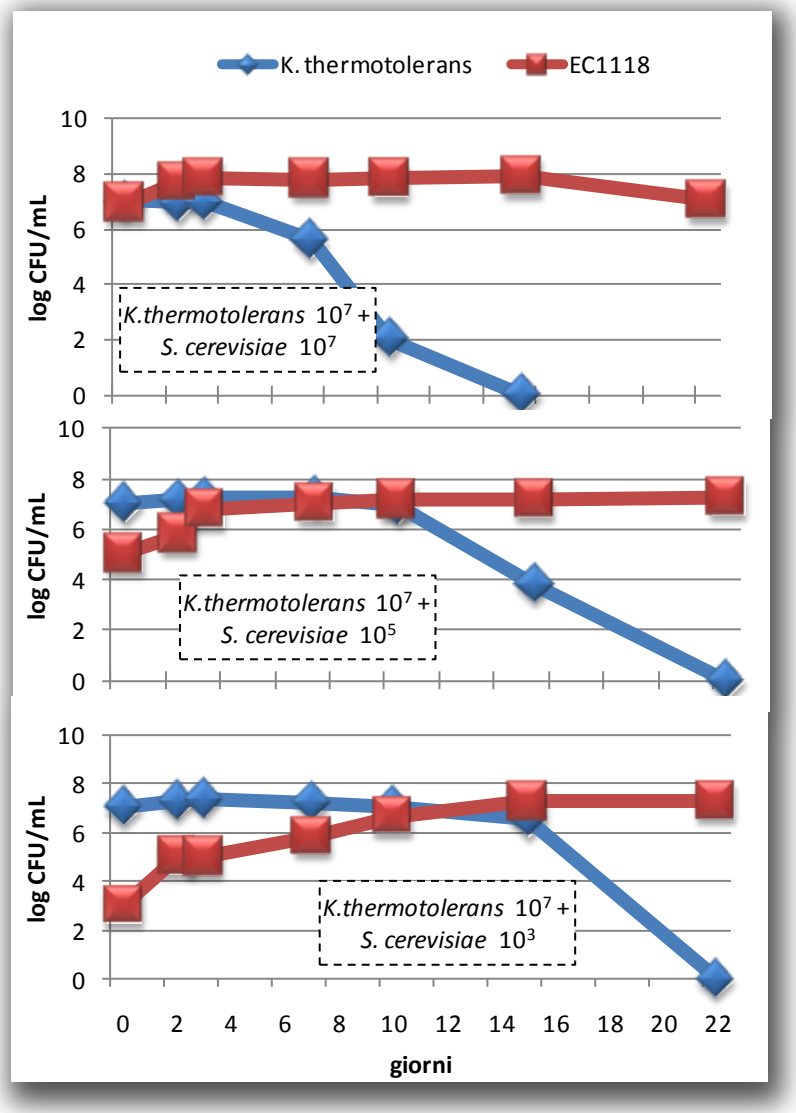


Figura 29: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 27: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
K. thermotolerans 10^7	2,84	12,90±0,86	13,16±0,03	7,89±0,51	280±26
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,16	7,30±0,07	13,80±0,02	6,95±0,20	133±1
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	2,97	9,00±1,96	13,80±0,02	7,29±0,96	139±10
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	2,90	9,20±1,93	13,70±0.18	7,58±0,46	158±3

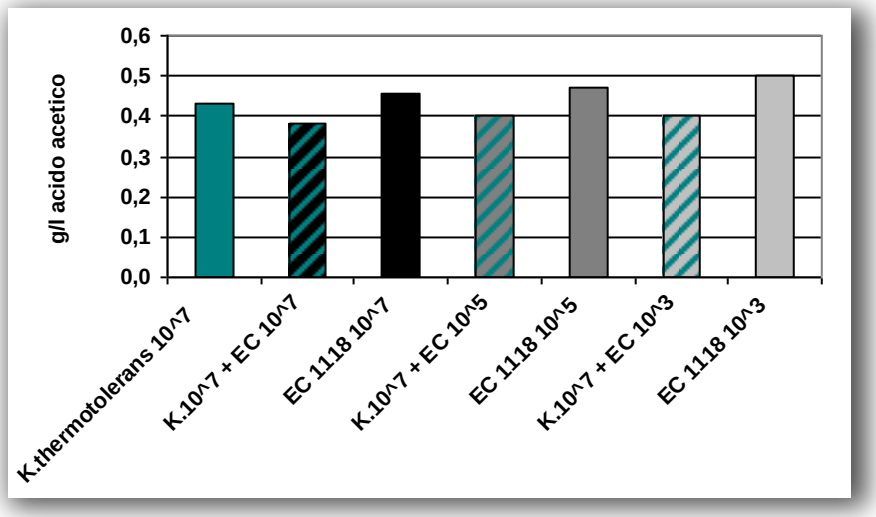


Figura 30: acidità volatile nei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Tabella 28: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
K. thermotolerans 10^7	24,35 ±1,65	21,09 ±0,17	36,96 ±1,89	34,94 ±2,58	88,05 ±6,23	23,73 ±0,95	153,31 ±16,20
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	33,68 ±7,96	22,92 ±0,09	35,40 ±1,54	32,05 ±0,35	93,82 ±2,11	21,37 ±1,83	168,24 ±15,91
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	25,11 ±0,13	22,83 ±0,35	42,46 ±6,11	36,33 ±3,08	78,00 ±13,17	24,94 ±1,16	137,34 ±14,98
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	25,74 ±0,86	22,14 ±0,39	46,22 ±9,25	40,00 ±5,54	81,59 ±10,21	26,08 ±2,70	144,61 ±7,66

Tabella 29: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esil acetato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,190 ±0,042	0,149 ±0,013	0,030 ±0,014	0,419 ±0,016	0,130 ±0,000	0,302 ±0,019	0,143 ±0,047	0,619 ±0,008	16,230 ±0,806
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,187 ±0,033	0,132 ±0,012	0,019 ±0,002	0,437 ±0,061	0,090 ±0,028	0,300 ±0,013	0,210 ±0,006	0,715 ±0,050	18,8300 ±0,523
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,186 ±0,048	0,180 ±0,014	0,021 ±0,001	0,41 4±0,006	0,085 ±0,049	0,171 ±0,044	0,168 ±0,013	0,570 ±0,001	20,925 ±1,096

Kluyveromyces thermotolerans ceppo 103

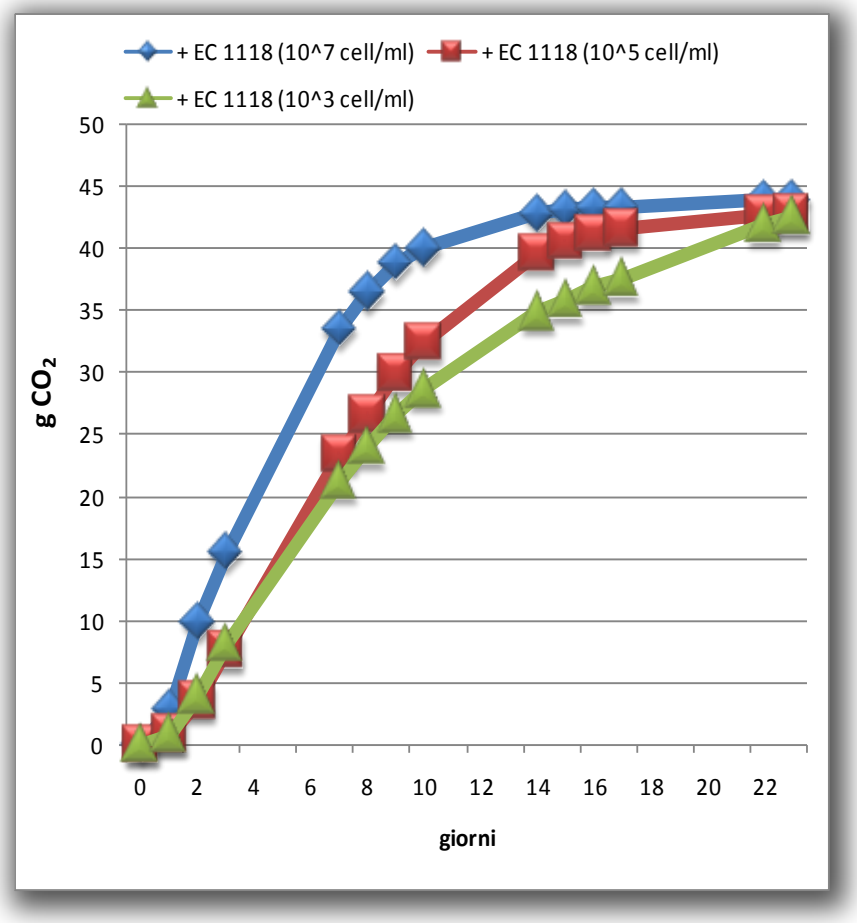


Figura 31: cinetica di fermentazione nelle prove coinoculate con K. thermotolerans

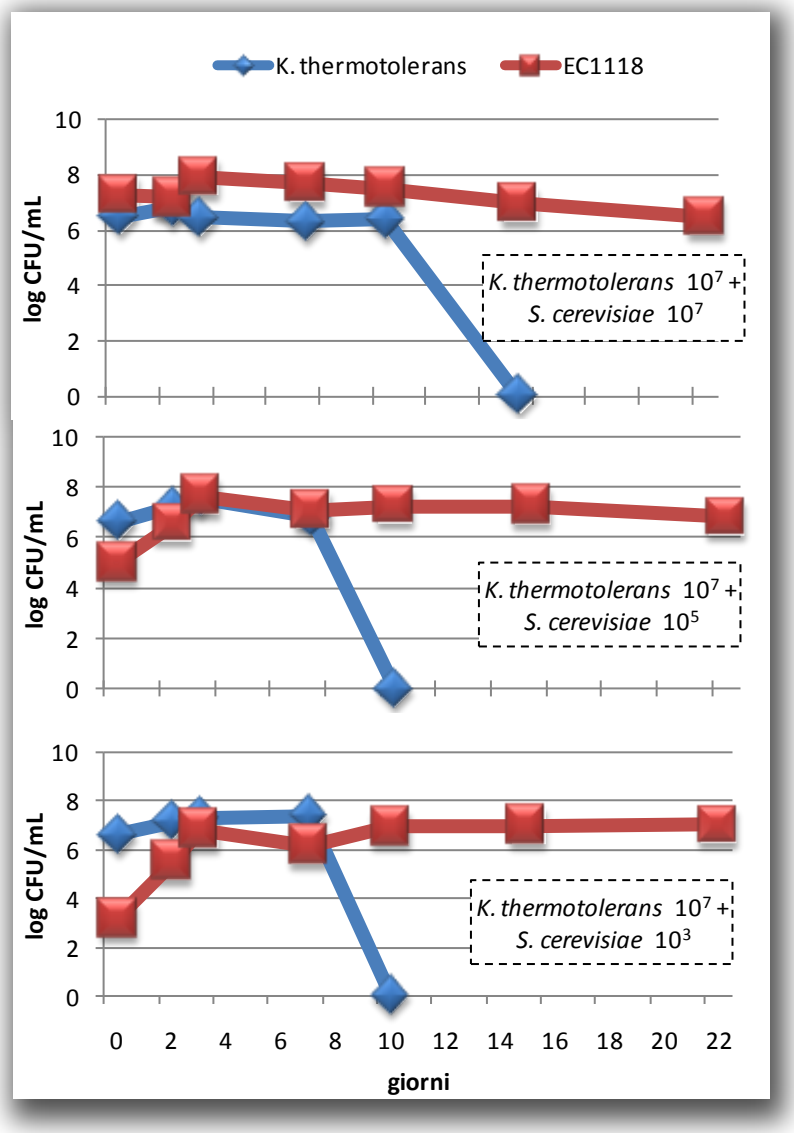


Figura 32: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 30: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
K. thermotolerans 10^7	3,48	7,43±0,43	11,02±0,52	6,01±0,35	235±18
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,41	6,75±0,07	13,83±0,06	7,08±0,26	120±12
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,40	6,79±0,11	13,58±0,27	7,10±0,12	164±13
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,37	7,28±0,45	13,25±0,64	7,21±0,39	178±8

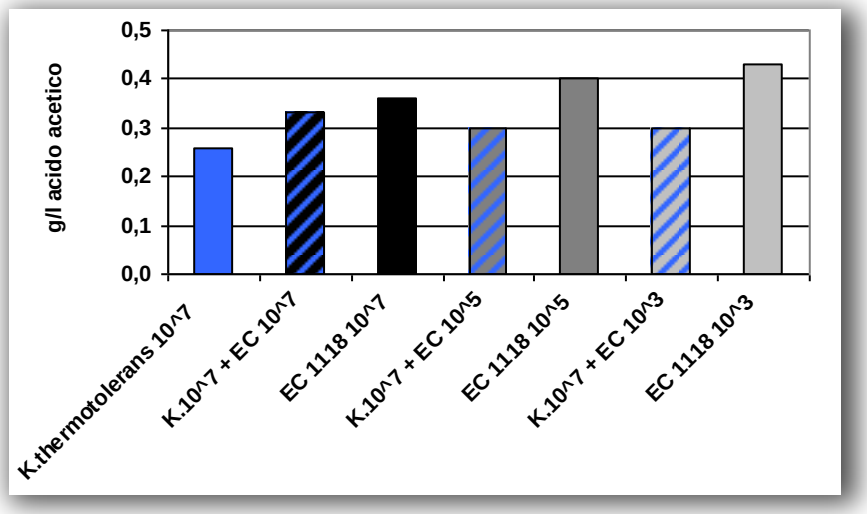


Figura 33: acidità volatile nei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Tabella 31: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con K. thermotolerans

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
K. thermotolerans 10^7	37,40 ±6,53	24,23 ±1,95	82,20 ±7,53	37,75 ±4,62	18,72 ±1,22	21,92 ±4,38	79,73 ±12,35
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	44,26 ±1,73	20,90 ±2,35	37,16 ±6,67	29,04 ±5,09	97,14 ±14,64	18,09 ±5,00	132,42 ±24,58
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	33,13 ±9,91	20,13 ±0,56	37,81 ±4,56	30,13 ±3,63	62,29 ±1,92	19,65 ±6,73	108,40 ±19,77
K. thermotolerans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	37,02 ±8,23	20,99 ±1,93	50,39 ±14,06	34,45 ±4,60	43,19 ±10,74	24,84 ±6,22	100,84 ±9,10

Metschnikowia pulcherrima ceppo 46

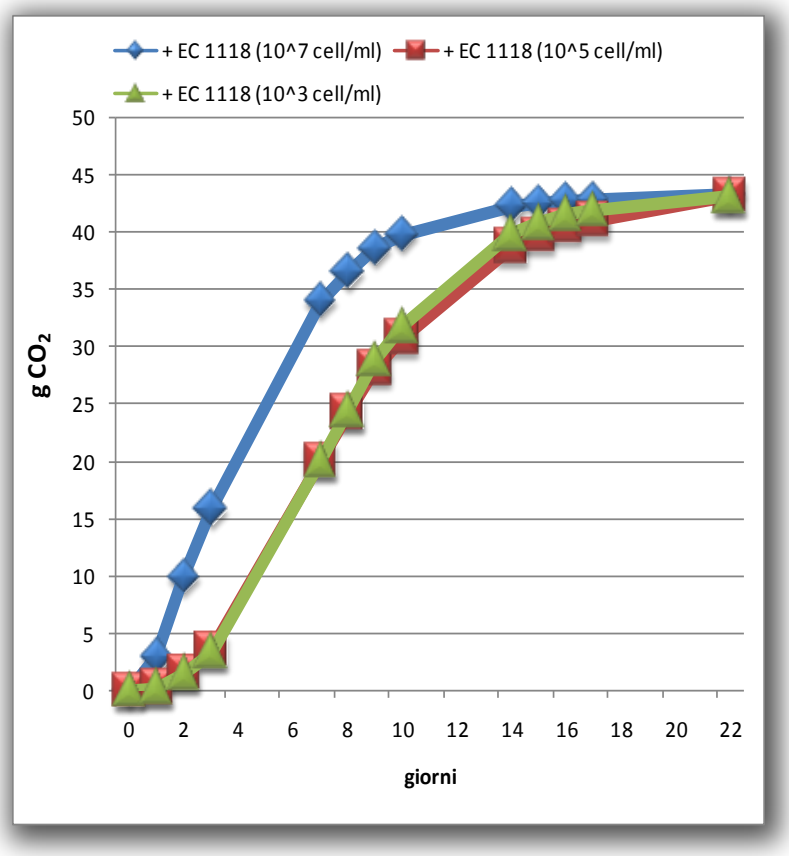


Figura 34: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con M. pulcherrima

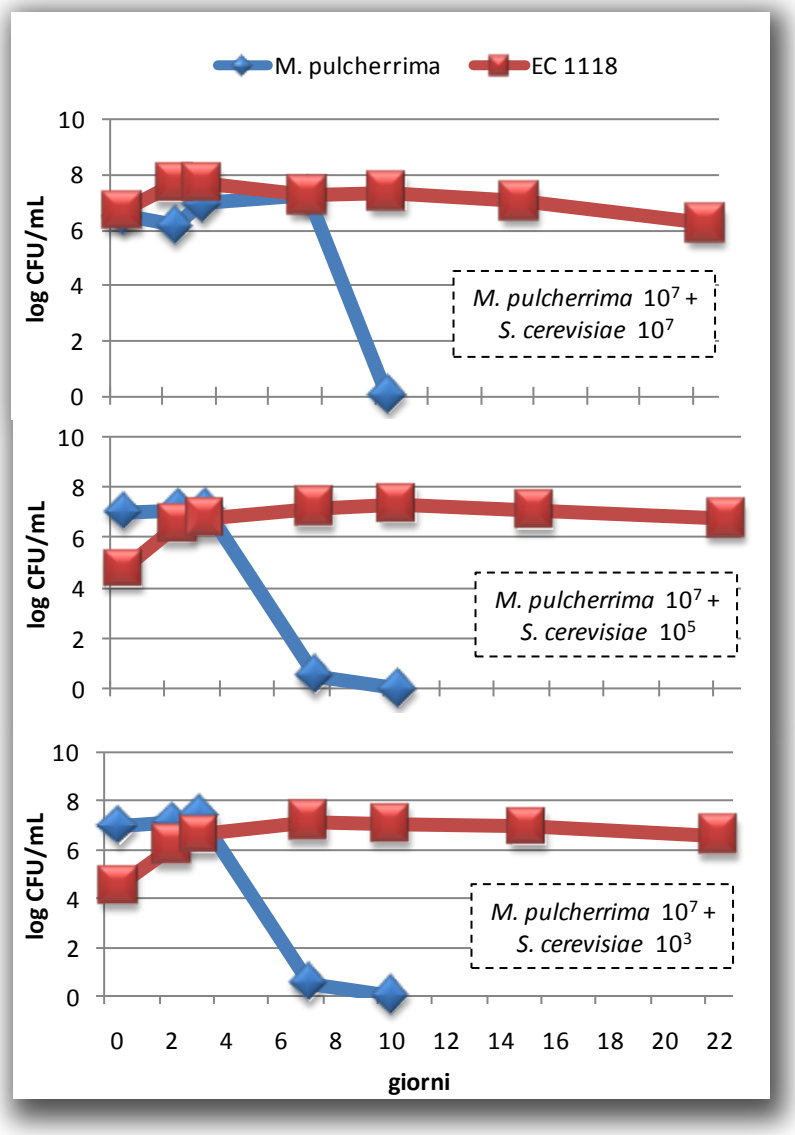


Figura 35: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 32: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con M. pulcherrima

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,40	6,33±0,27	13,87±0,01	6,53±0,27	120±10
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,39	6,50±0,16	13,79±0,13	6,98±0,00	126±10
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,40	6,64±0,37	13,65±0,19	7,25±0,25	154±17

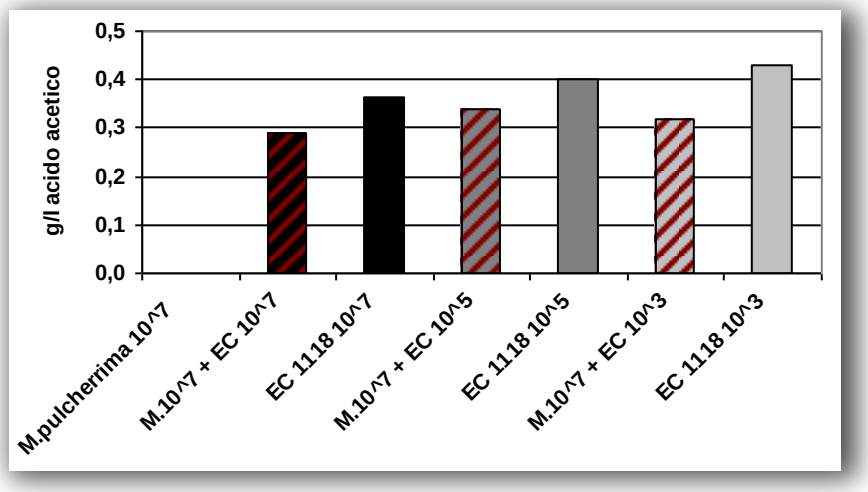


Figura 36: acidità volatile nei fermentati delle prove con M. pulcherrima

Tabella 33: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con M. pulcherrima

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	41,84 ±2,17	21,57 ±1,80	35,89 ±8,34	30,42 ±1,54	95,97 ±20,90	17,94 ±1,22	139,14 ±21,81
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	28,34 ±0,78	23,25 ±3,86	44,65 ±1,98	38,45 ±1,29	43,71 ±6,37	13,42 ±0,18	73,88 ±3,51
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	28,93 ±4,13	21,75 ±1,30	48,01 ±5,61	51,64 ±7,95	50,50 ±2,05	15,95 ±1,79	85,37 ±7,78

Tabella 34: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con M. pulcherrima

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esil acetato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,219 ±0,013	0,142 ±0,017	0,017 ±0,004	0,397 ±0,075	0,049 ±0,016	0,150 ±0,006	0,078 ±0,017	9,490 ±1,004	1,950 ±0,071
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,417 ±0,030	0,10 5±0,007	0,046 ±0,008	0,427 ±0,037	0,065 ±0,021	0,140 ±0,014	0,160 ±0,001	11,390 ±1,146	1,879 ±0,041
M. pulcherrima 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,988 ±0,087	0,150 ±0,014	0,039 ±0,002	0,725 ±0,106	0,149 ±0,016	0,160 ±0,003	0,233 ±0,015	32,300 ±0,990	2,919 ±0,098

Hanseniaspora osmophila ceppo 25

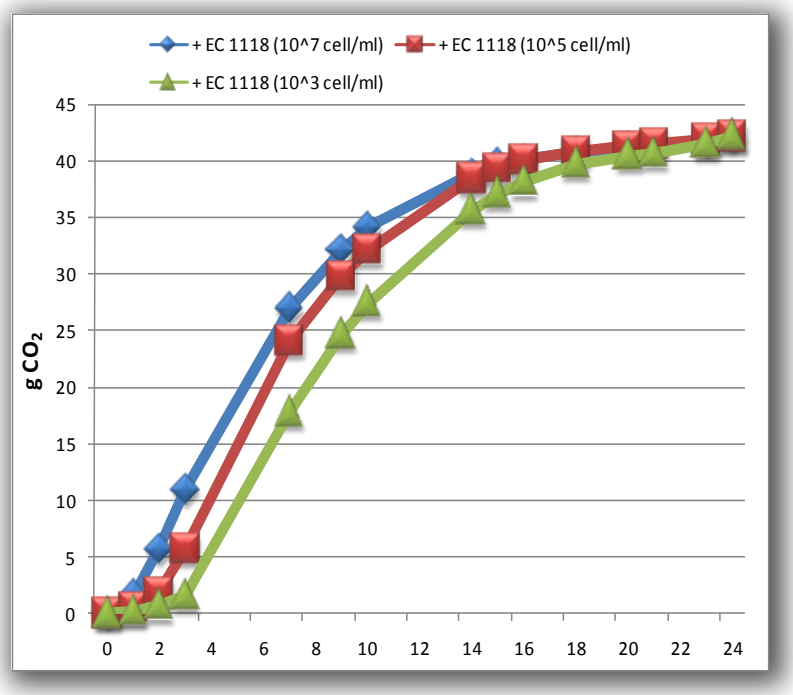


Figura 37: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con H. osmophila

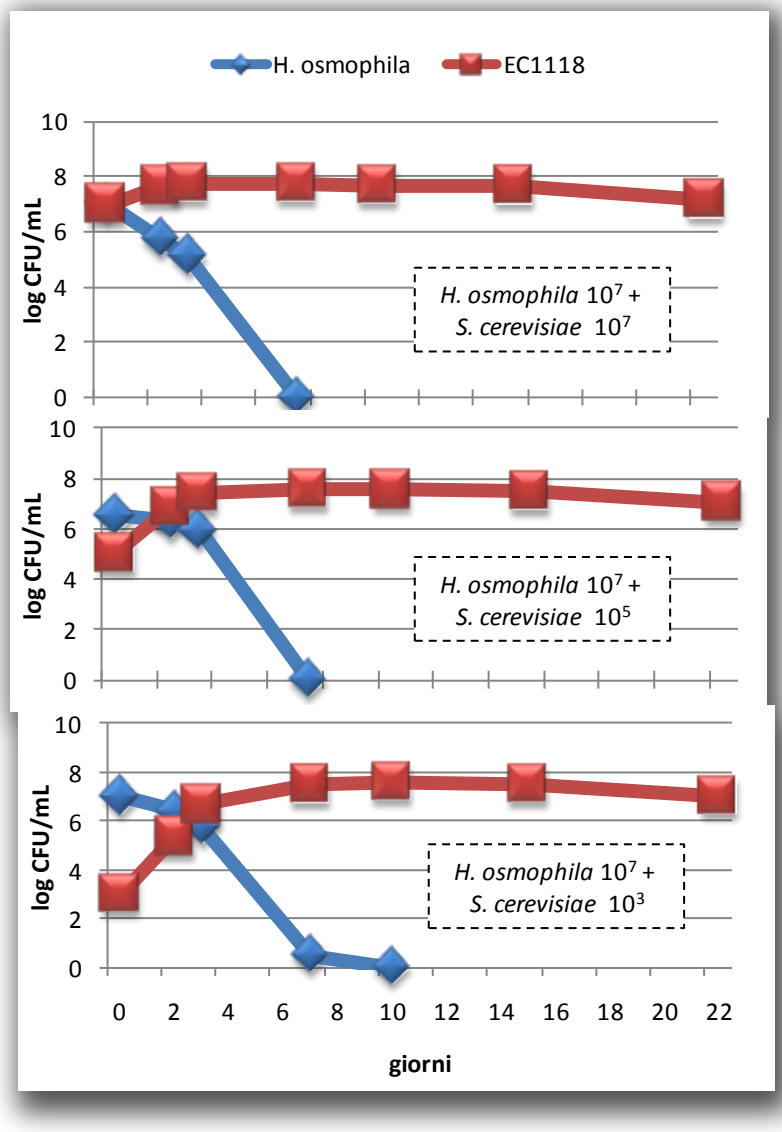


Figura 38: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 35. principali parametri enologici dei fermentati delle prove con H. osmophila

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,19	6,70±0,03	13,86±0,01	6,34±0,05	96±6
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,23	6,45±0,05	13,85±0.02	6,63±0,23	111±5
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,25	6,57±0,02	13,88±0,01	6,06±0,23	101±6

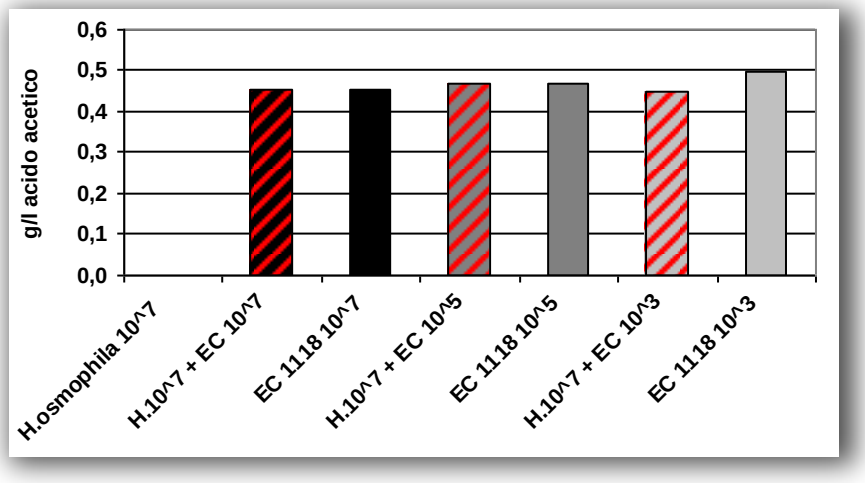


Figura 39: acidità volatile nei fermentati delle prove con H. osmophila

Tabella 36: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con H. osmophila

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	36,59 ±3,58	21,24 ±0,57	37,68 ±3,91	64,68 ±5,62	59,89 ±4,91	13,14 ±0,20	111,71 ±11,29
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	26,53 ±1,84	21,06 ±0,01	37,46 ±2,35	77,19 ±4,35	59,99 ±1,89	14,82 ±2,00	109,52 ±9,41
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	27,77 ±1,69	20,52 ±2,70	40,70 ±3,97	89,23 ±7,31	69,08 ±5,40	14,81 ±0,08	109,25 ±2,23

Hanseniaspora osmophila ceppo 32

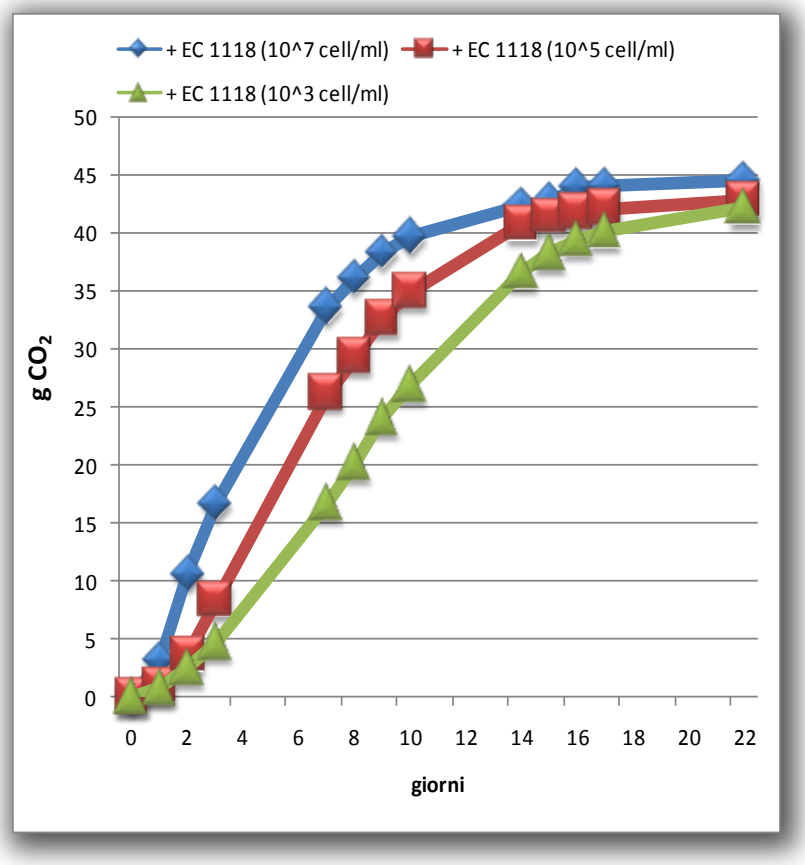


Figura 40: cinetica di fermentazione nelle prove multi starter con H. osmophila

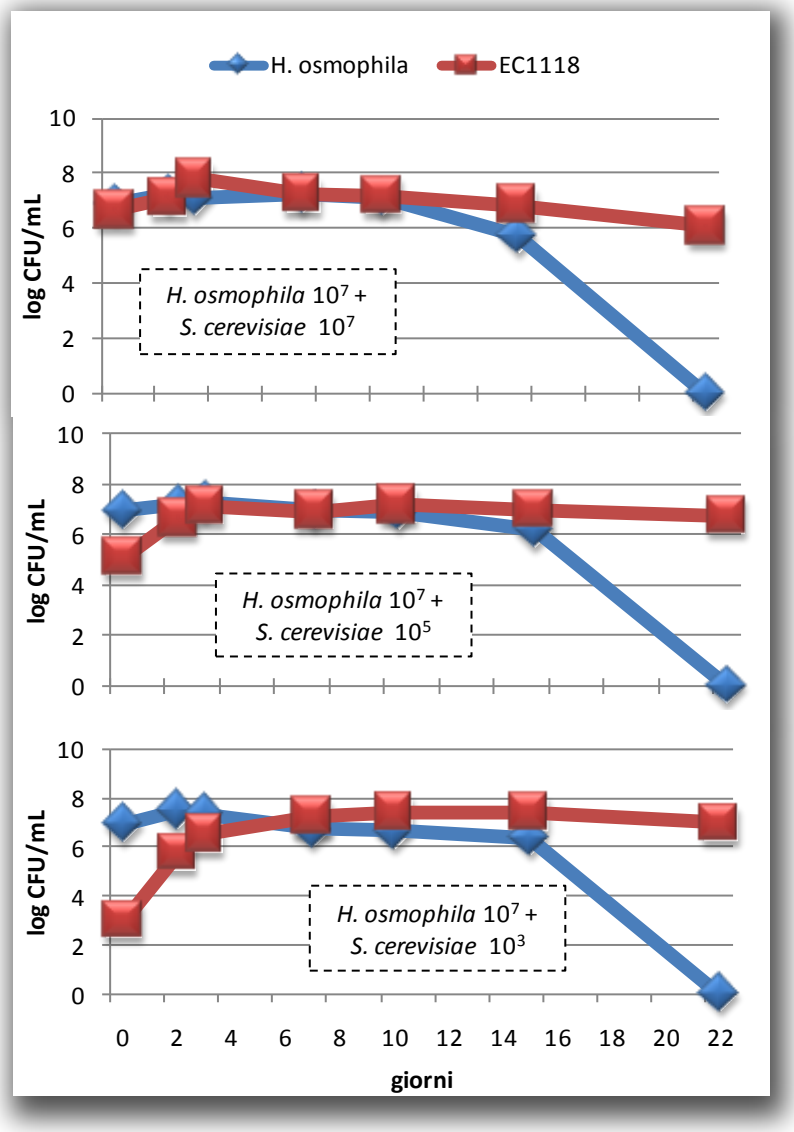


Figura 41: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 37. principali parametri enologici dei fermentati delle prove con H. osmophila

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
H. osmophila 10^7	3,42	8,10±0,10	10,98±0,07	6,72±0,58	180±8
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,48	6,42±0,05	13,74±0,05	6,63±0,14	145±22
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,48	6,64±0,69	13,83±0,05	6,79±0,48	170±4
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,41	6,87±0,37	13,28±0,67	7,04±0,25	190±6

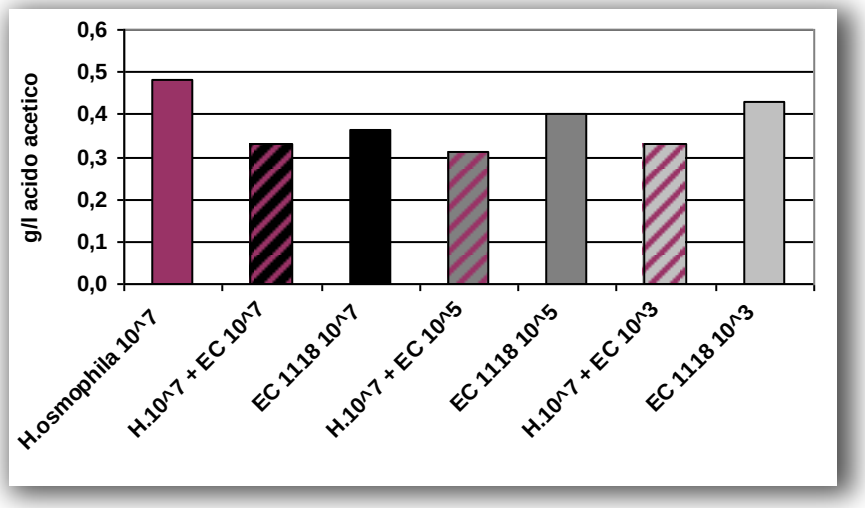


Figura 42: acidità volatile nei fermentati delle prove con H. osmophila

Tabella 38: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con H. osmophila

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil Acetato	Isobutanolo	Amilico attivo	Isoamilico
H. osmophila 10^7	22,40 ±0,62	23,53 ±1,05	94,23 ±11,20	89,97 ±7,83	28,22 ±3,21	15,15 ±0,93	74,54 ±5,38
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	38,29 ±3,11	21,94 ±0,59	34,86 ±4,97	36,15 ±8,03	83,15 ±6.09	17,95 ±1.76	127,95 ±12,74
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	27,19 ±4,66	21,3 ±0,48	38,11 ±3.08	56,2 ±10,63	65,00 ±13.00	21,55 ±3.00	114,28 ±19,89
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	24,38 ±0,27	21,59 ±1,66	49,50 ±9.50	60,94 ±9,11	42,50 ±5.50	21,50 ±1,68	102,76 ±9,68

Tabella 39: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con H. osmophila

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,19 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,33 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,52 ± 0,05	6,85 ± 0,91
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,28 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,33 ± 0,06	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,72 ± 0,04	6,12 ± 1,42
H. osmophila 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,19 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,30 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,42 ± 0,04	5,55 ± 1,01

Pichia fermentans ceppo 4

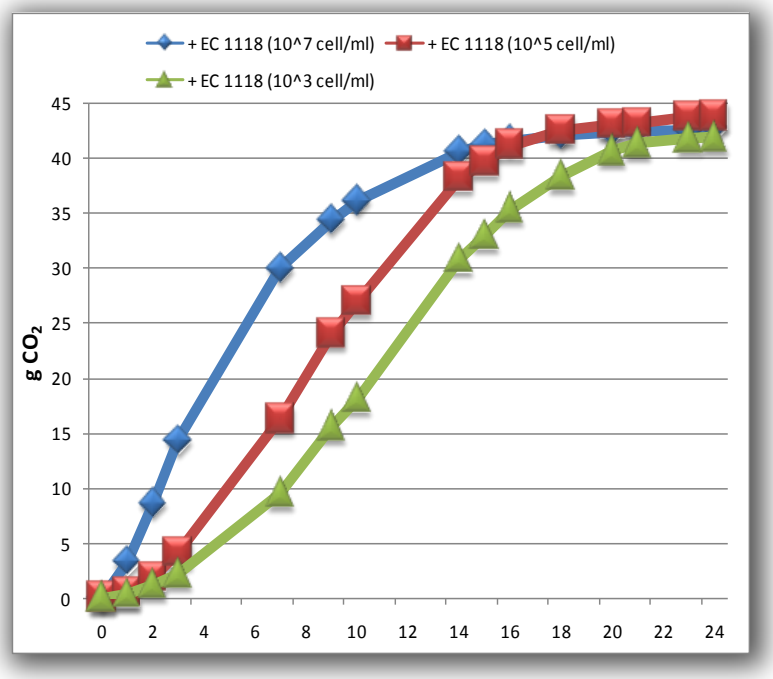


Figura 43: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con P. fermentans

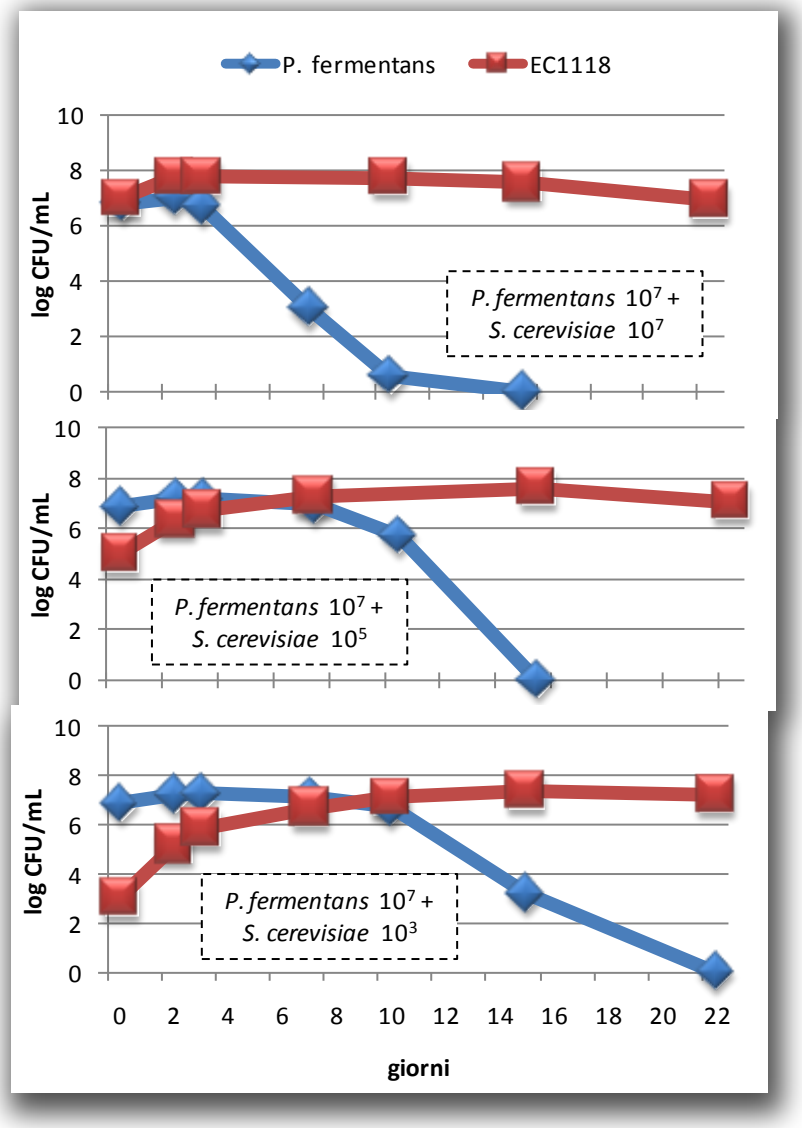


Figura 44: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 40: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con P. fermentans

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,23	6,59±0,01	13,96±0,01	6,10±0,10	125±7
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,25	6,56±0,02	13,91±0,08	6,44±0,01	169±11
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,33	6,15±0,05	13,96±0,08	6,28±0,33	216±8

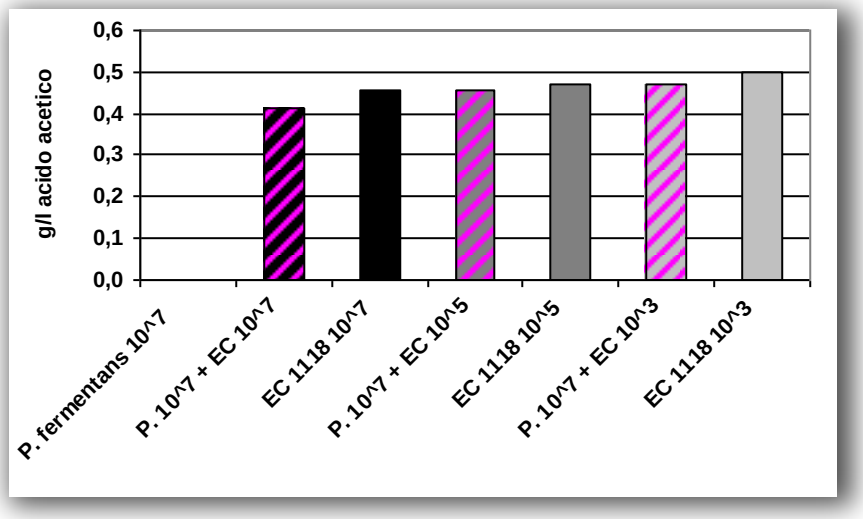


Figura 45: acidità volatile nei fermentati delle prove con P. fermentans

Tabella 41: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con P. fermentans

Inoculi (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	26,60 ±1,16	21,83 ±0,44	35,30 ±0,35	30,17 ±1,32	77,90 ±6,76	16,04 ±2,01	122,42 ±11,88
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	24,80 ±2,28	21,29 ±1,28	50,32 ±4,49	47,09 ±3,13	78,87 ±8,05	16,97 ±2,62	101,13 ±13,17
P.fermentans 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	22,45 ±1,08	20,89 ±0,65	53,57 ±3,86	83,90 ±7,39	69,14 ±1,03	17,11 ±0,36	99,13 ±2,12

Pichia anomala ceppo 9

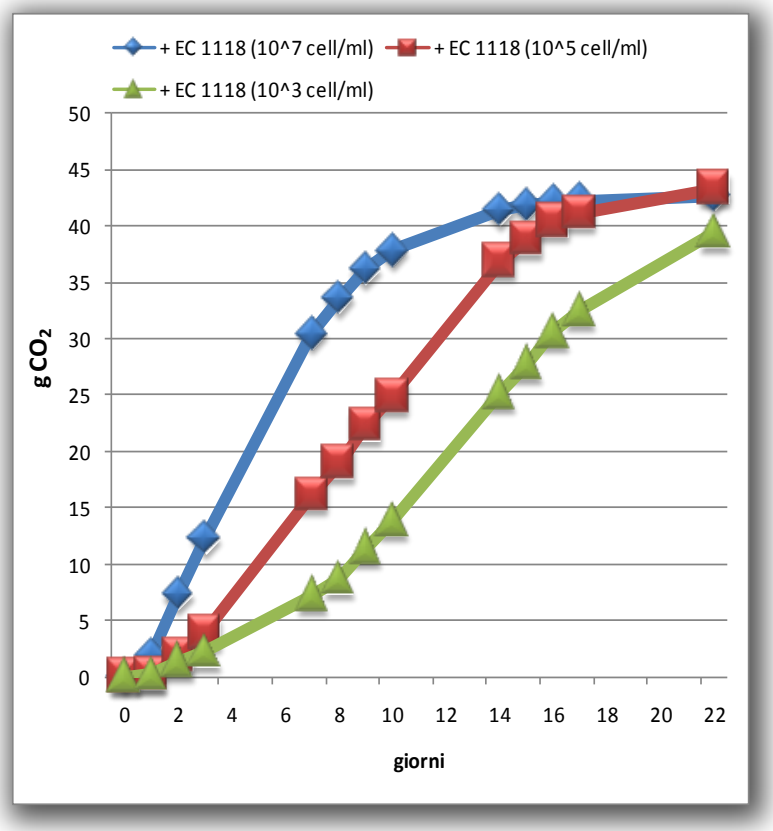


Figura 46: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con P. anomala

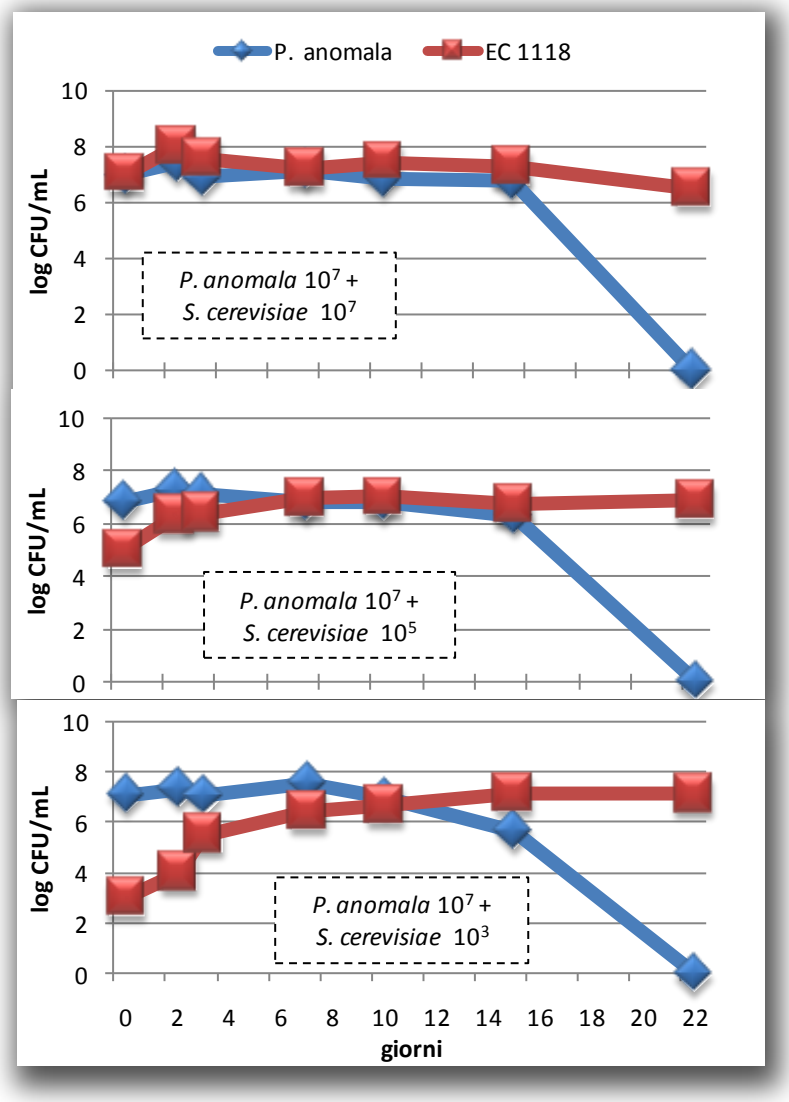


Figura 47: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 42: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con P. anomala

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,44	6,58±0,03	13,80±0,13	6,99±0,32	119±14
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,39	6,55±0,08	13,76±0,16	6,50±0,01	140±18
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,36	7,11±0,66	13,43±0,54	6,35±0,32	203±20

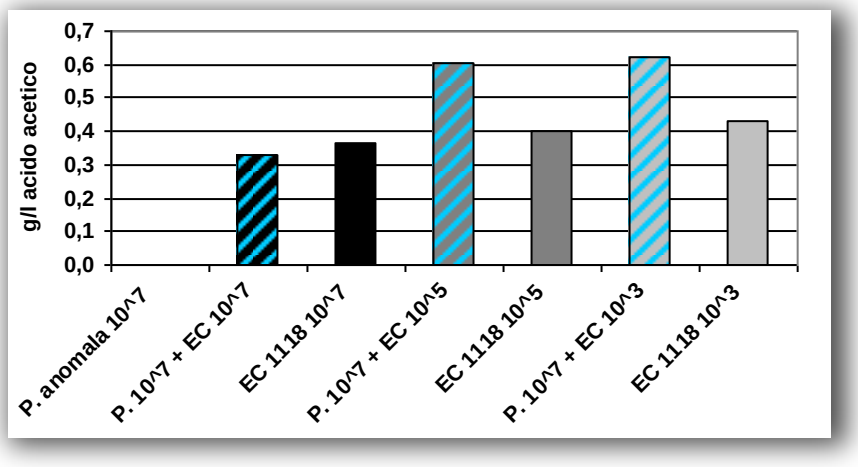


Figura 48: acidità volatile nei fermentati delle prove con P. anomala

Tabella 43: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con P. anomala

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	37,18 ±5,80	19,98 ±1,33	40,53 ±4,76	38,26 ±0,19	74,51 ±1,32	16,59 ±1,04	106,29 ±3,14
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	24,70 ±2,07	21,42 ±0,04	64,88 ±3,74	133,33 ±15,58	64,67 ±3,63	19,79 ±1,41	80,26 ±3,45
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	28,74 ±0,39	34,88 ±8,00	76,85 ±8,90	552,09 ±53,30	83,59 ±18,65	23,31 ±0,08	83,33 ±6,69

Tabella 44: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con P. anomala

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,65 ± 0,11	0,26 ± 0,03	0,38 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,88 ± 0,13	8,20 ± 1,68
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,44 ± 0,08	0,23 ± 0,02	0,39 ± 0,10	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,70 ± 0,18	5,30 ± 1,04
P.anomala 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,65 ± 0,14	0,32 ± 0,03	0,74 ± 0,18	0,14 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,22 ± 0,06	1,83 ± 0,30	6,98 ± 0,93

Saccharomycodes ludwigii ceppo 62

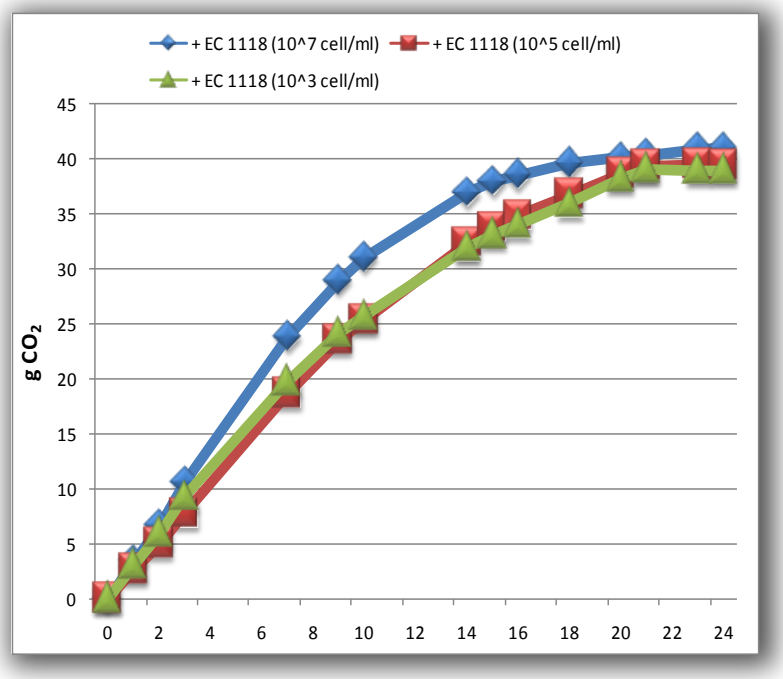


Figura 49: andamento fermentativo nelle prove multistarter con S. ludwigii

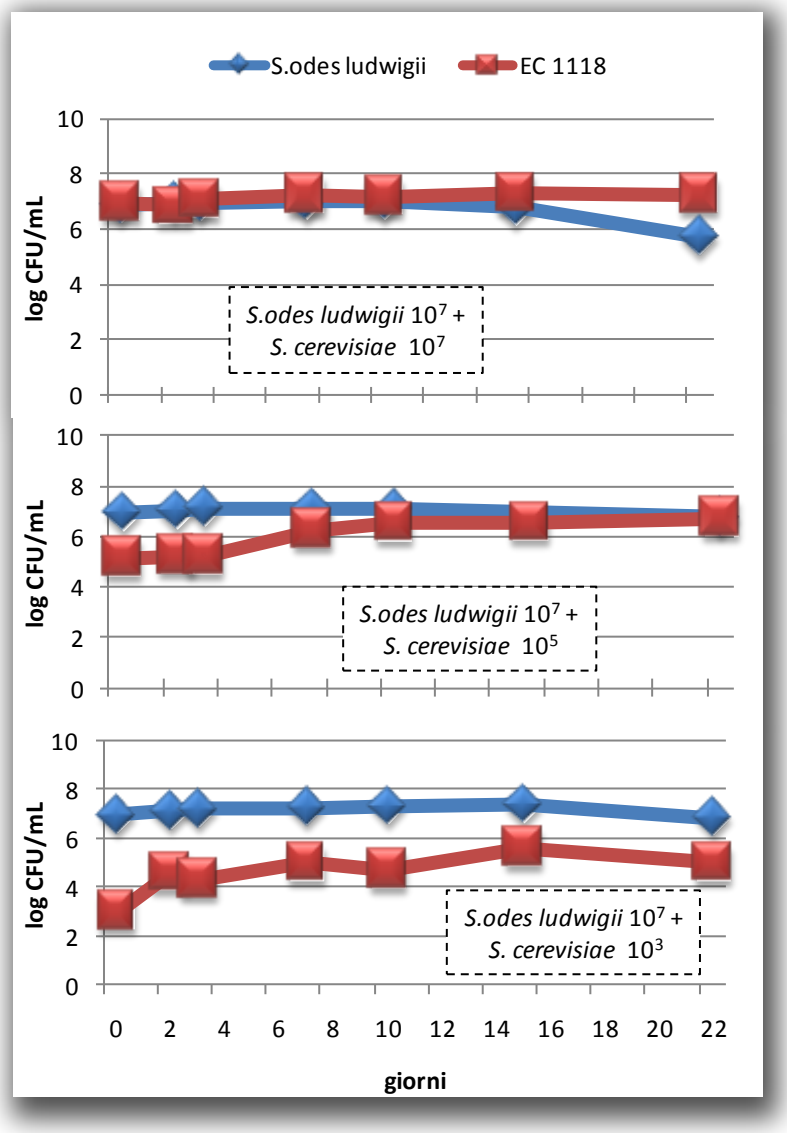


Figura 50: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 45: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con S. ludwigii

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
S. ludwigii 10^7	3,26	7,05±0,01	12,99±0,05	8,02±0,30	245±5
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,21	6,90±0,01	13,66±0,07	6,94±0,26	212±12
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,21	7,15±0,02	13,60±0,01	7,23±0,20	242±15
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,27	6,31±0,04	13,58±0,05	7,55±0,05	263±18

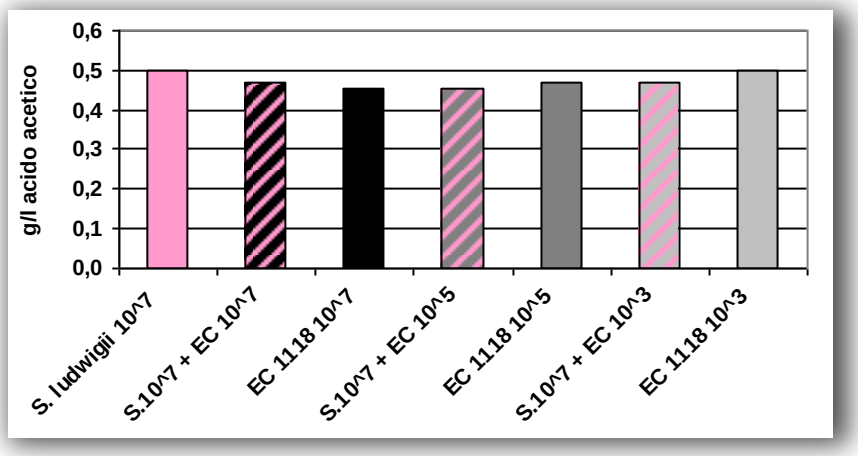


Figura 51: acidità volatile nei fermentati delle prove con S. ludwigii

Tabella 46: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. ludwigii

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
S. ludwigii 10^7	43,61 ±4,13	22,55 ±0,23	23,66 ±1,98	156,51 ±14,86	53,87 ±2,21	27,39 ±1,53	83,89 ±4,33
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	48,33 ±4,46	22,13 ±0,15	35,99 ±2,10	95,84 ±6,53	102,44 ±4,13	31,52 ±2,26	129,21 ±7,43
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	43,88 ±3,00	22,54 ±0,35	25,62 ±1,18	137,03 ±1,47	81,41 ±4,21	33,55 ±2,55	107,59 ±1,20
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	44,57 ±0,72	23,67 ±0,17	27,11 ±2,98	152,72 ±3,00	83,39 ±9,27	35,06 ±1,74	110,22 ±6,43

Saccharomycodes ludwigii ceppo 64

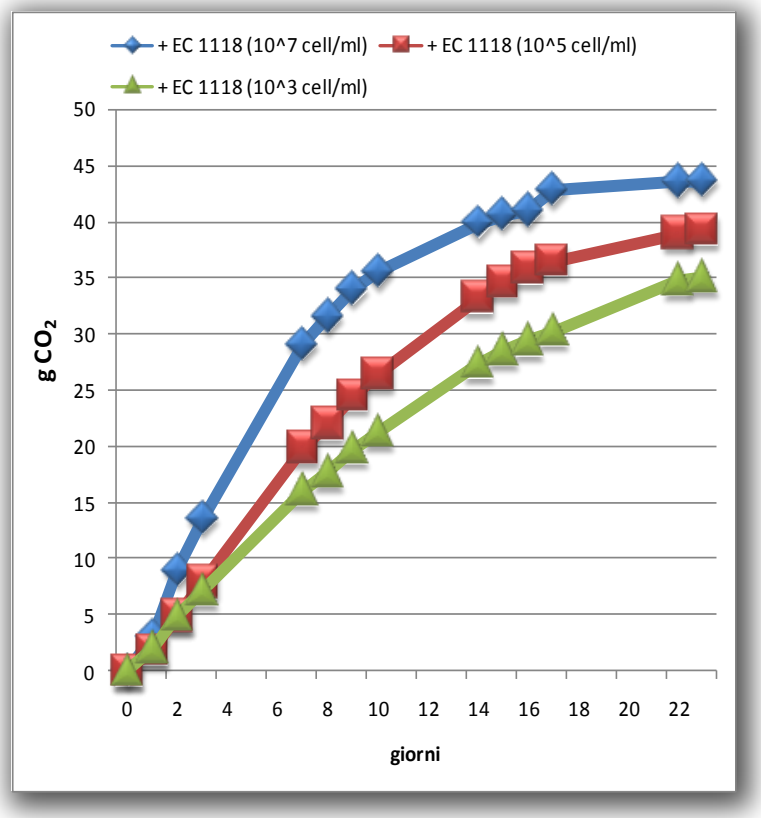


Figura 52: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con S. ludwigii

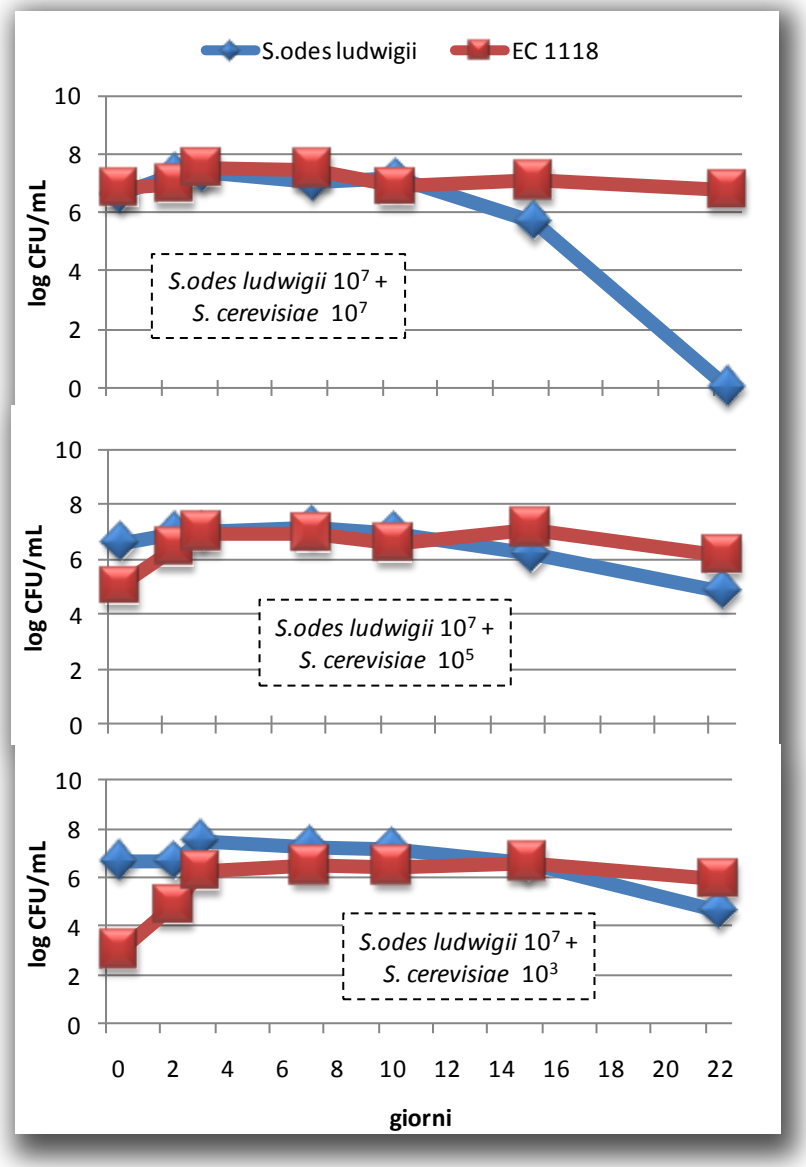


Figura 53: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 47: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con S. ludwigii

INOCULO (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
S. ludwigii 10^7	3,55	6,90±0,08	10,26±0,09	8,46±0,52	260±30
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,35	6,64±0,16	13,70±0,04	7,68±0,31	201±22
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,43	6,77±0,24	12,82±0,69	8,22±0,67	270±27
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,52	6,83±0,32	11,88±0,22	8,78±0,09	335±27

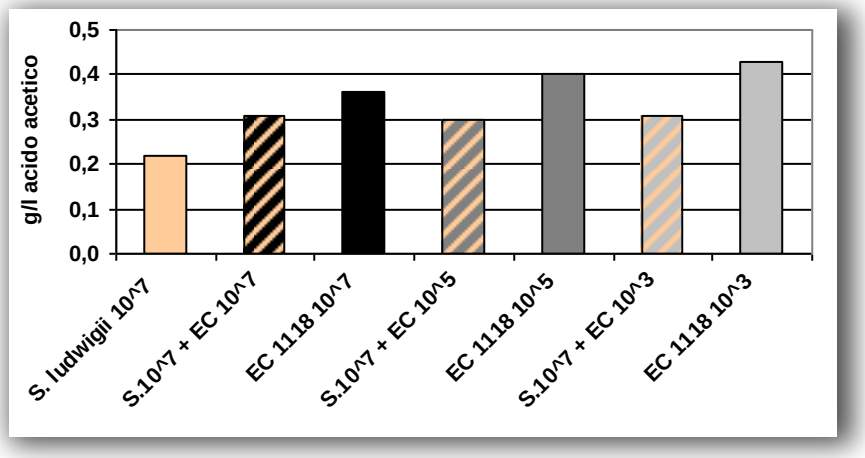


Figura 54: acidità volatile nei fermentati delle prove con S. ludwigii

Tabella 48: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. ludwigii

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
S. ludwigii 10^7	23,54 ±4,58	21,09 ±1,23	33,48 ±6,91	503,98 ±89,22	53,38 ±3,21	28,74 ±1,55	123,59 ±7,13
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	29,05 ±6,15	20,69 ±1,20	37,94 ±7,25	99,05 ±23,05	89,24 ±2,72	23,31 ±5,16	126,27 ±8,48
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	38,50 ±8,63	21,25 ±0,07	32,15 ±7,03	200,24 ±48,24	71,20 ±3,57	27,62 ±4,10	116,60 ±7,24
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	36,45 ±7,83	21,81 ±2,19	20,79 ±3,01	322,94 ±45,26	63,54 ±5,37	34,92 ±3,83	133,81 ±8,73

Tabella 49: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. ludwigii

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,59 ± 0,09	0,29 ± 0,05	1,31 ± 0,24	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,72 ± 0,20	33,08 ± 2,99
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,75 ± 0,05	0,36 ± 0,06	1,33 ± 0,16	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,72 ± 0,17	35,58 ± 6,74
S. ludwigii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,29 ± 0,06	0,19 ± 0,06	1,16 ± 0,23	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,90 ± 0,19	35,23 ± 3,02

Zygosaccharomyces florentinus ceppo 42

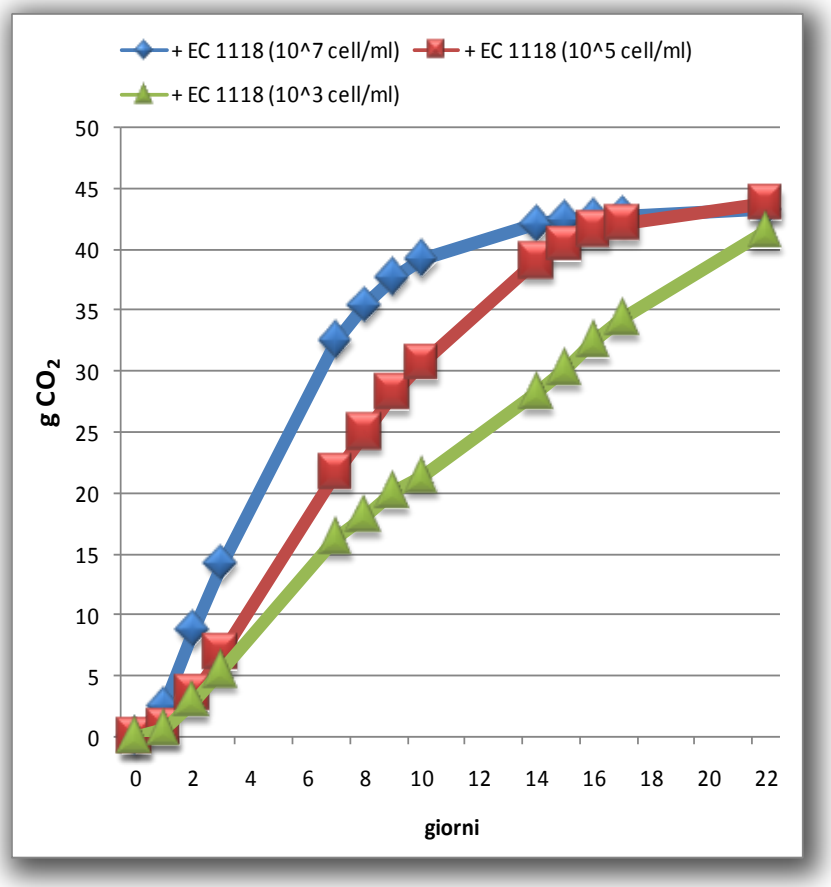


Figura 55: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con Z. florentinus

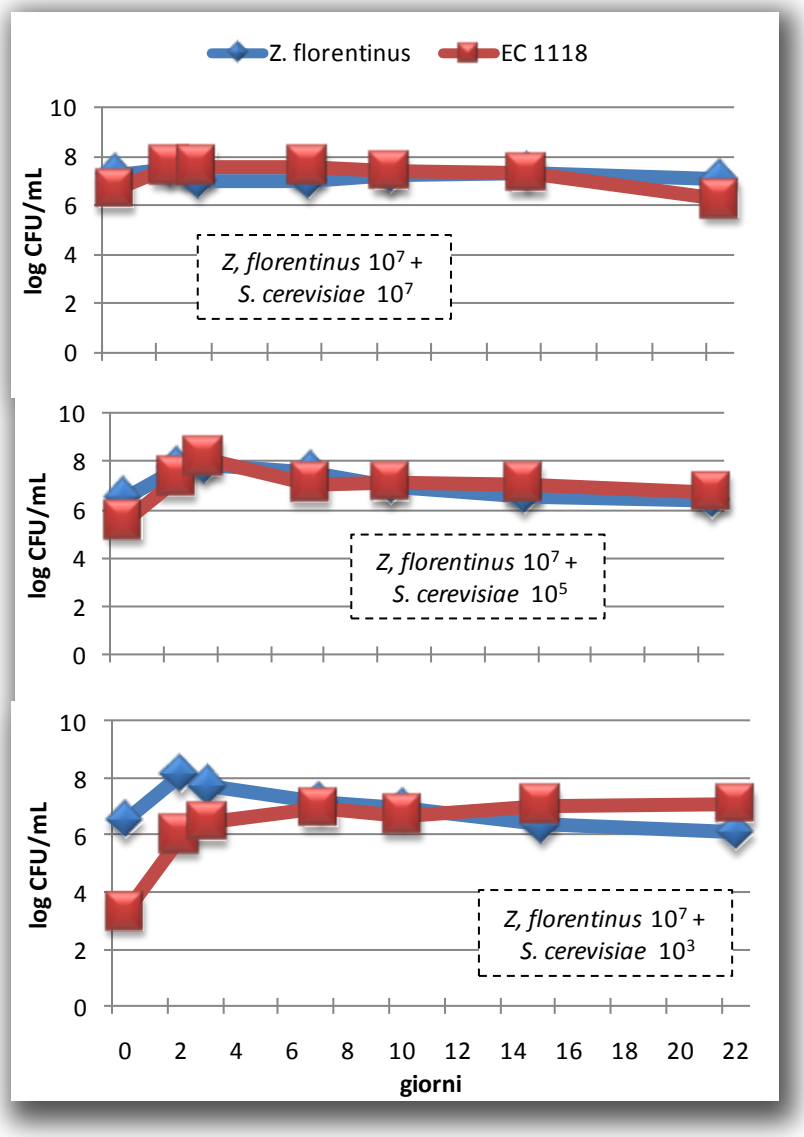


Figura 56: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 50: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con Z. florentinus

INOCULO (cell./ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
Z. florentinus 10^7	3,45	7,88±0,09	12,30±0,07	6,51±0,32	175±16
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,44	6,43±0,03	13,83±0,13	6,54±0,28	113±15
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,33	6,57±0,05	13,76±0,16	6,50±0,19	168±1
Z. florentinus 10^7+ *S. cerevisiae* 10^3	3,31	7,02±0,05	13,53±0,54	6,54±0,04	195±22

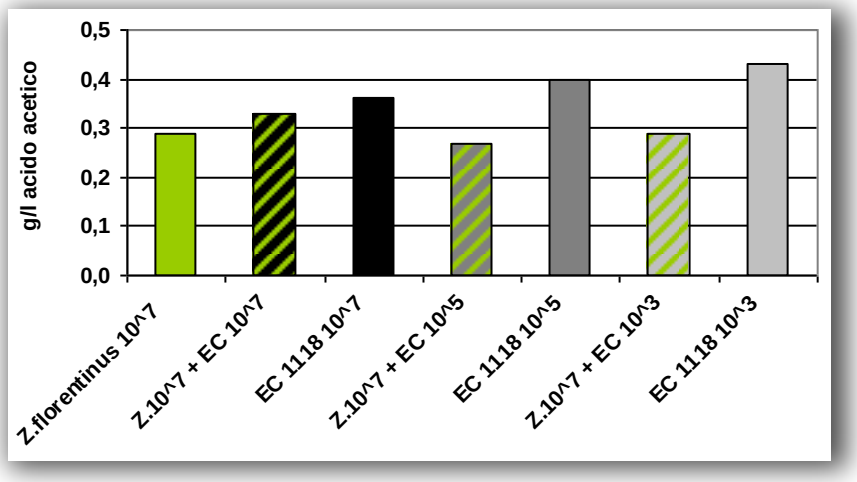


Figura 57: acidità volatile nei fermentati delle prove con Z. florentinus

Tabella 51: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con Z. florentinus

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
Z. florentinus 10^7	41,53 ±5,22	19,84 ±1,12	106,33 ±9,23	35,05 ±2,88	26,86 ±2,54	21,39 ±2,78	91,07 ±5,46
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	34,61 ±4,30	21,22 ±1,05	45,03 ±6,38	31,61 ±1,57	83,96 ±1,02	17,35 ±0,23	113,40 ±4,62
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	28,26 ±1,55	22,02 ±1,87	66,48 ±2,39	36,22 ±3,75	59,84 ±6,43	24,78 ±3,55	98,88 ±2,80
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	30,91 ±0,92	24,58 ±3,27	97,02 ±10,92	38,07 ±2,20	33,05 ±1,21	21,33 ±1,25	92,19 ±6,71

Tabella 52: altri composti i volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con Z. florentinus

Inoculo (cell/ml)	Acetato di isoamile	Etil esanoato	Esanolo	Etil ottanoato	Etil decanoato	Feniletil acetato	Acido esanoico	2-fenil etanolo
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	0,16 ±0,01	0,37 ±0,06	1,41 ±0,12	0,11 ±0,03	0,10 ±0,02	0,41 ±0,07	2,14 ±0,36	25,65 ±2,65
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	0,33 ±0,07	0,33 ±0,08	2,43 ±0,22	0,08 ±0,01	0,18 ±0,01	0,60 ±0,11	1,90 ±0,25	34,28 ±2,74
Z. florentinus 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	0,38 ±0,06	0,29 ±0,07	2,15 ±0,64	0,05 ±0,01	0,19 ±0,05	0,63 ±0,04	2,65 ±0,15	39,39 ±3,19

Zygosaccharomyces bailii ceppo 89

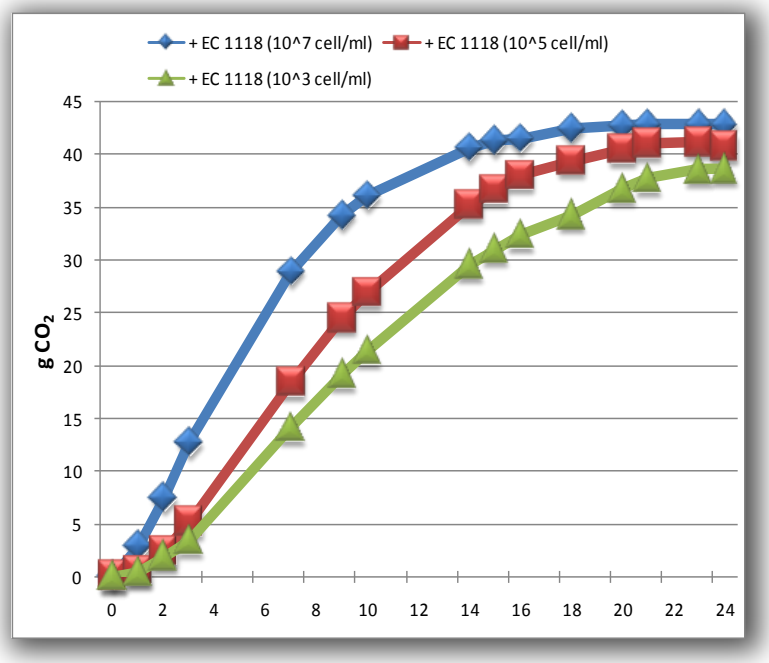


Figura 58: cinetica di fermentazione nelle prove multi starter con Z. bailii

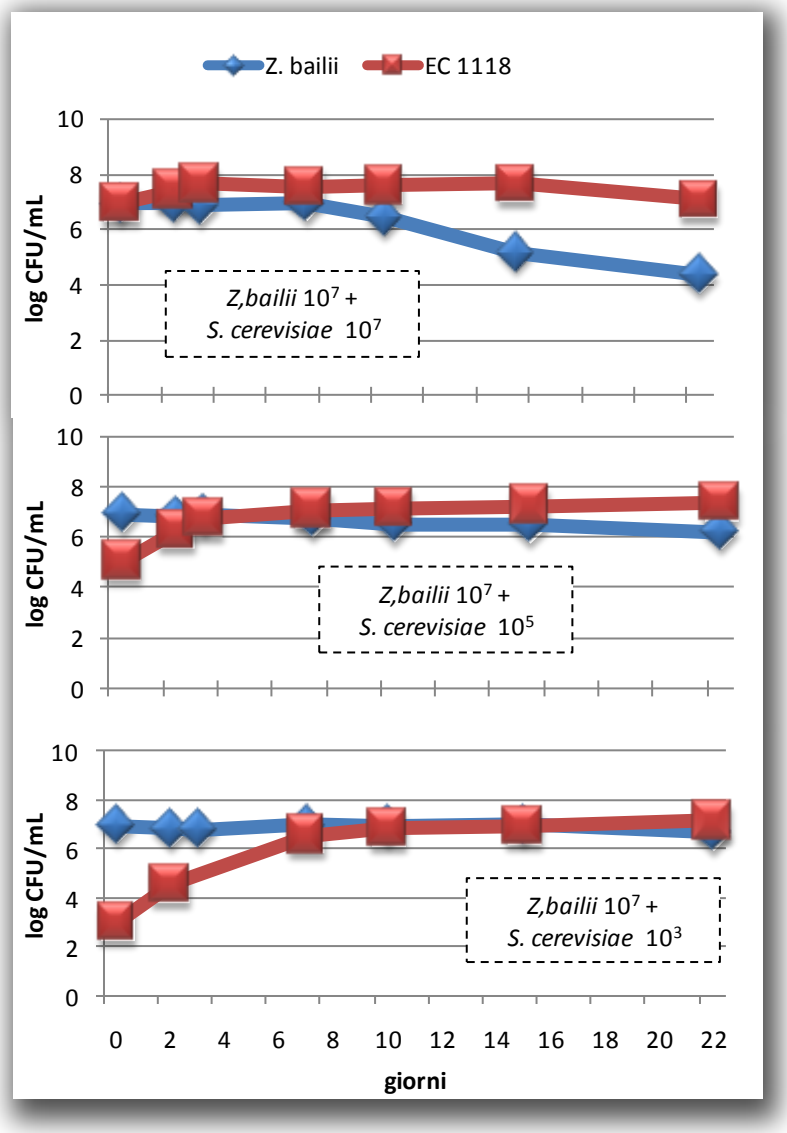


Figura 59: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml

Tabella 53: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con Z. bailii

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
Z. bailii 10^7	3,10	8,55±0,02	10,69±0,02	7,60±0,41	185±3
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,16	7,03±0,00	13,78±0,00	6,28±0,09	113±6
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,05	7,15±0,01	13,75±0,02	6,79±0,06	143±9
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,03	7,40±0,09	13,73±0,04	7,52±0,17	181±10

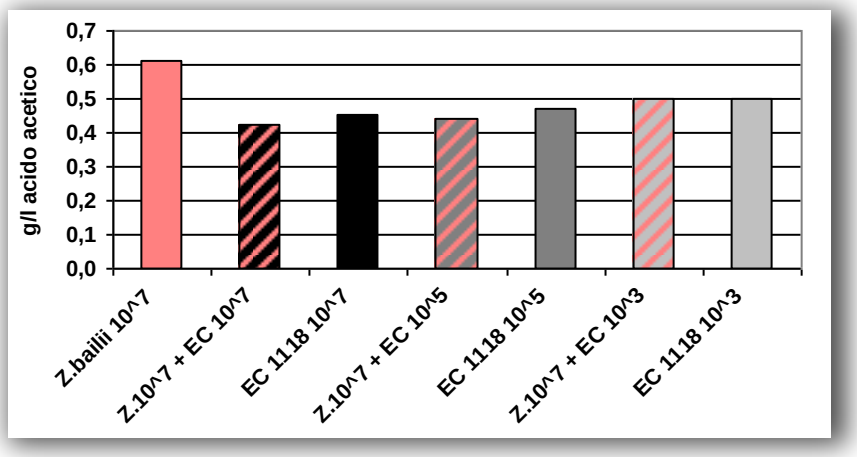


Figura 60: acidità volatile nei fermentati delle prove con Z. bailii

Tabella 54: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con Z. bailii

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
Z. bailii 10^7	25,41 ±1,73	22,14 ±0,64	36,38 ±2,82	33,89 ±1,75	79,22 ±1,27	14,16 ±0,85	110,46 ±9,76
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	34,84 ±3,52	20,92 ±0,18	38,84 ±1,80	33,71 ±0,62	80,63 ±1,80	14,54 ±0,28	121,10 ±11,36
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	25,10 ±1,02	21,38 ±0,61	50,77 ±4,06	43,22 ±3,55	98,80 ±0,75	16,33 ±1,47	92,01 ±0,09
Z. bailii 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	23,67 ±1,28	22,21 ±1,03	51,59 ±3,54	46,28 ±3,87	98,09 ±2,35	18,46 ±0,58	93,07 ±1,72

Schizosaccharomyces pombe ceppo 95

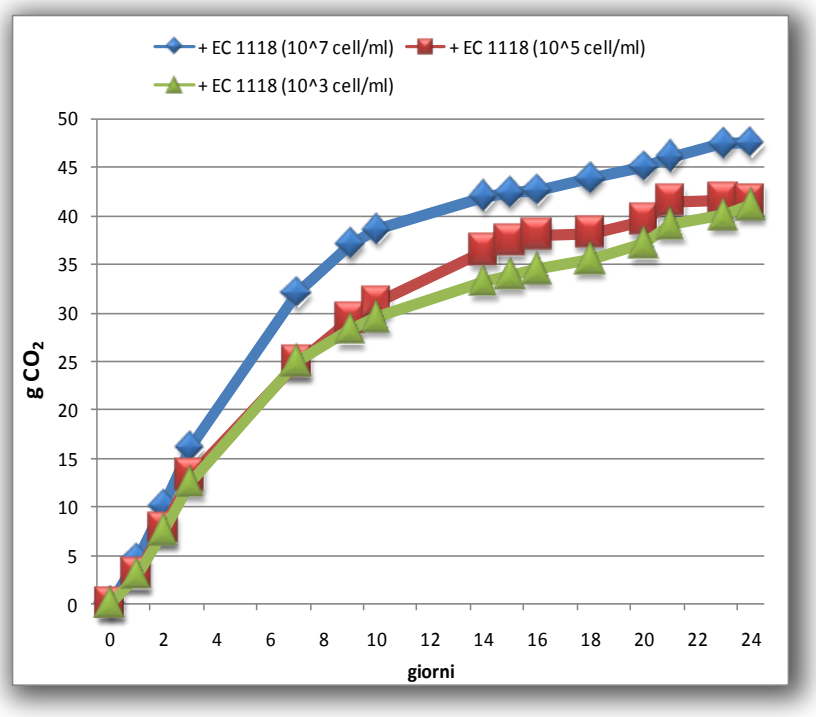


Figura 61: cinetica di fermentazione nelle prove multistarter con S. pombe

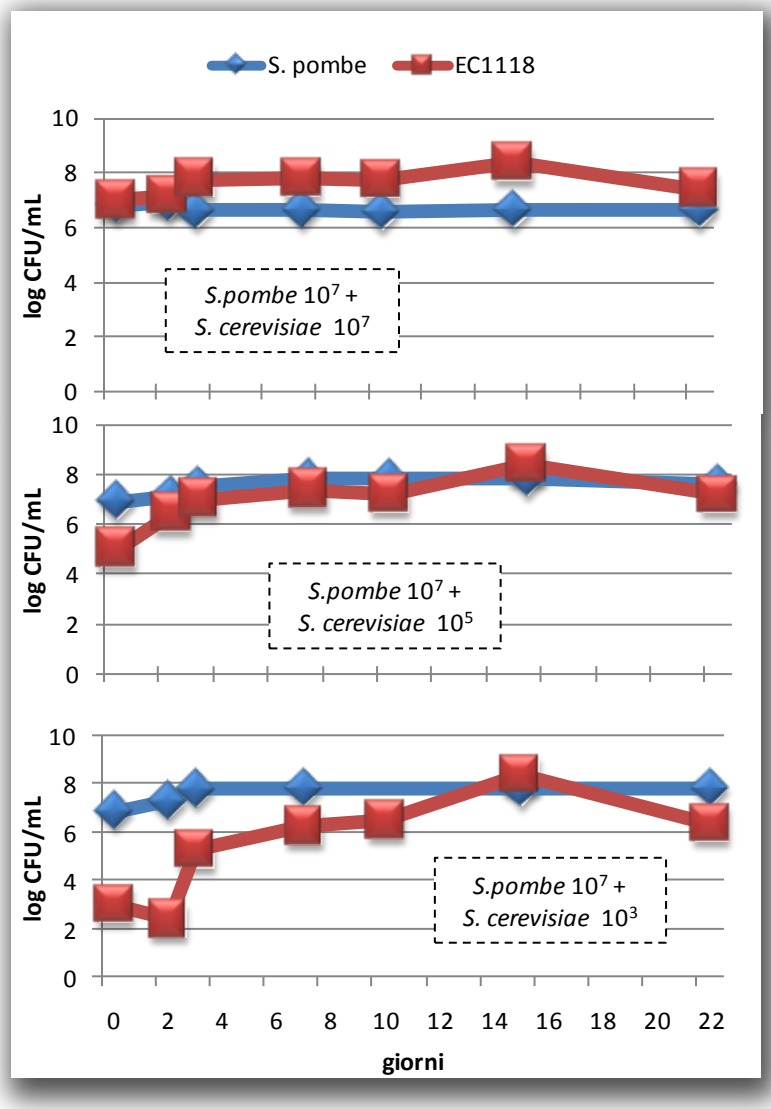


Figura 62: evoluzione della popolazione microbica nelle diverse prove: coinoculo con S. cerevisiae 10^7 cell/ml, 10^5 cell/ml, 10^3 cell/ml.

Tabella 55: principali parametri enologici dei fermentati delle prove con S. pombe

Inoculo (cell/ml)	pH	Acidità totale (g/l ac. tartarico)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (g/l)	Δ+ Polisaccaridi (mg/l)
S. pombe 10^7	3,47	5,03±0,12	12,24±0,11	11,36±1,75	1211±103
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	3,49	4,74±0,16	13,80±0,17	8,66±1,55	482±38
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	3,49	4,70±0,35	13,75±0,23	12,15±2,86	1146±96
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	3,41	5,30±0,25	13,34±0,19	13,17±1,92	1424±153

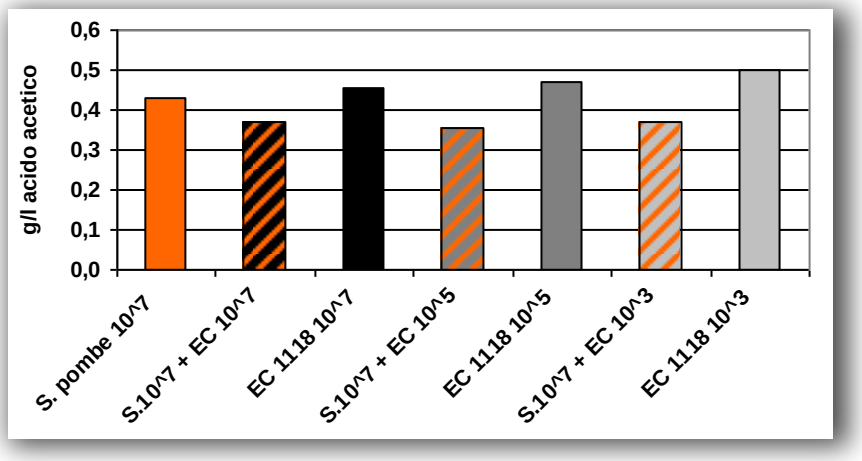


Figura 63: acidità volatile nei fermentati delle prove con S. pombe

Tabella 56: principali composti volatili (mg/l) dei fermentati delle prove con S. pombe

Inoculo (cell/ml)	Acetaldeide	Metanolo	Propanolo	Etil acetato	Iso Butanolo	Amilico attivo	Isoamilico
S. pombe 10^7	28,75 ±4,65	32,34 ±1,65	31,01 ±4,36	45,60 ±9,33	80,86 ±15,63	15,98 ±5,83	124,64 ±24,33
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^7	39,21 ±10,72	22,46 ±0,63	28,12 ±1,93	102,86 ±25,77	117,59 ±21,70	37,55 ±13,05	236,39 ±66,43
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^5	32,20 ±3,63	22,45 ±1,46	23,94 ±6,09	132,58 ±35,67	139,11 ±26,71	39,17 ±13,48	267,35 ±58,36
S. pombe 10^7 + *S. cerevisiae* 10^3	25,65 ±2,85	20,60 ±0,50	23,90 ±6,32	135,10 ±37,64	142,10 ±27,12	37,65 ±12,48	271,32 ±62,45

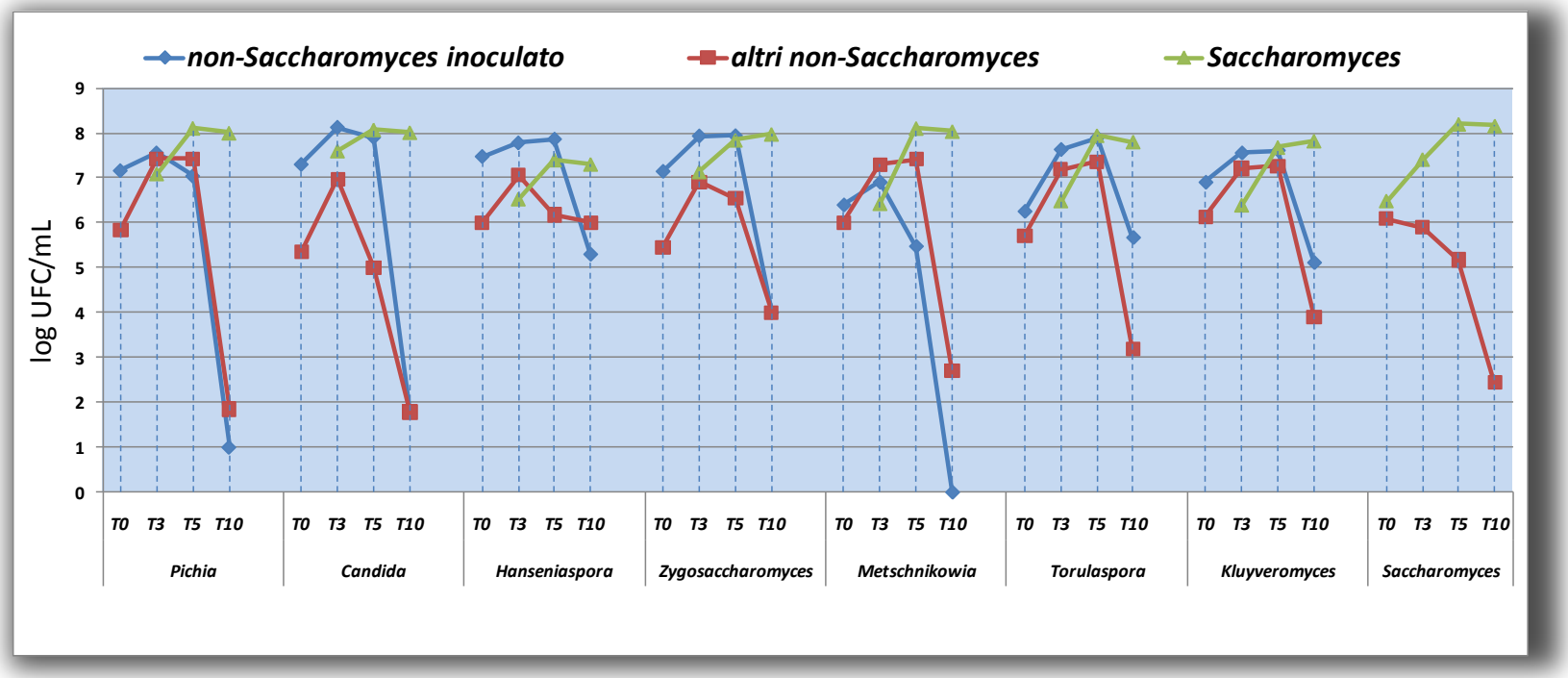


Figura 64: evoluzione della popolazione microbica nelle prove di micro vinificazione in cantina

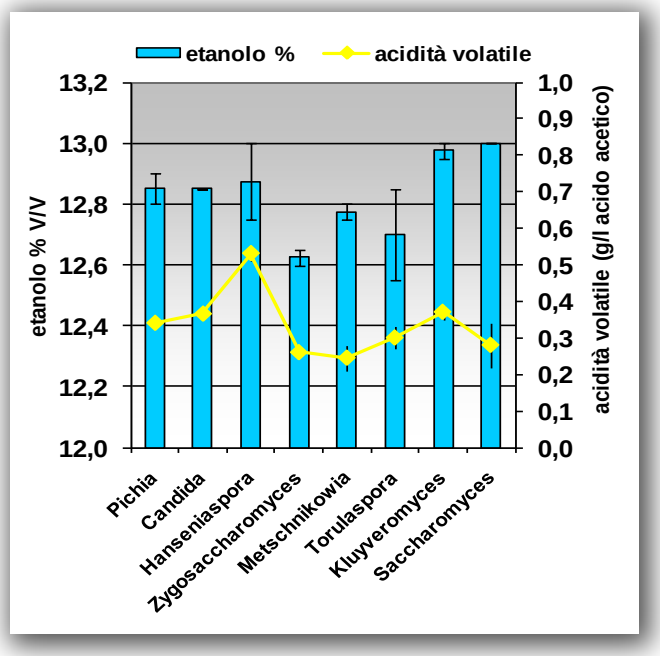


Figura 65: acidità volatile e etanolo nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

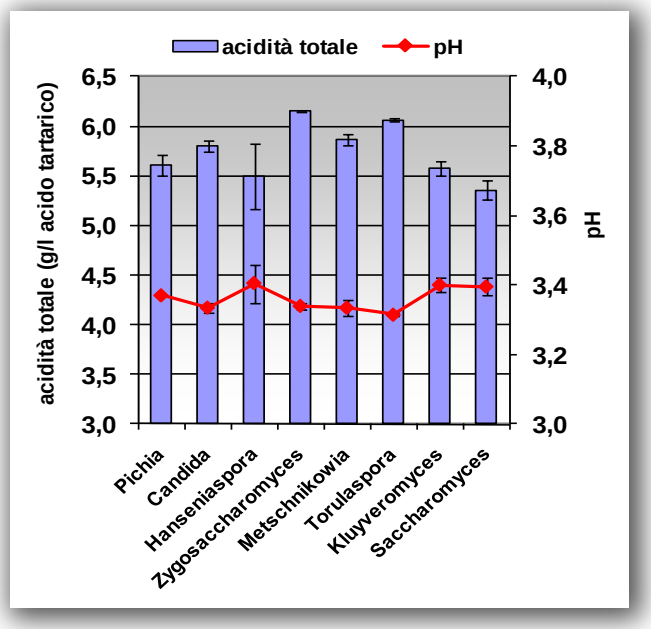


Figura 66: acidità totale e pH nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

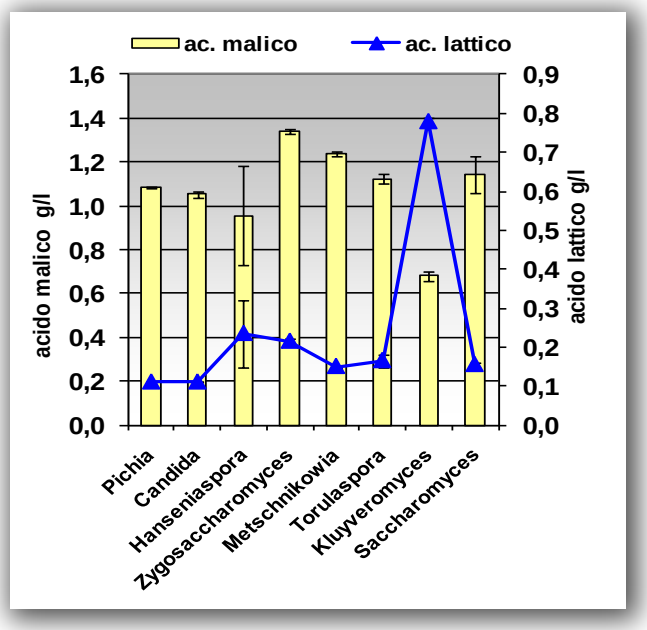


Figura 67: acido malico e lattico nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

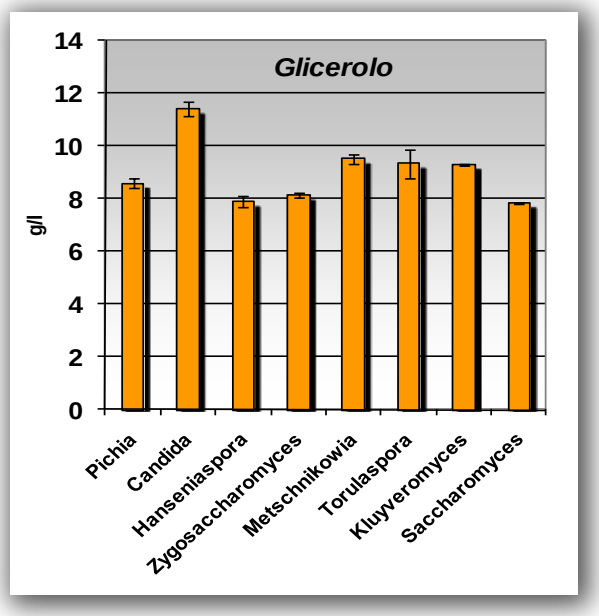


Figura 68: glicerolo nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

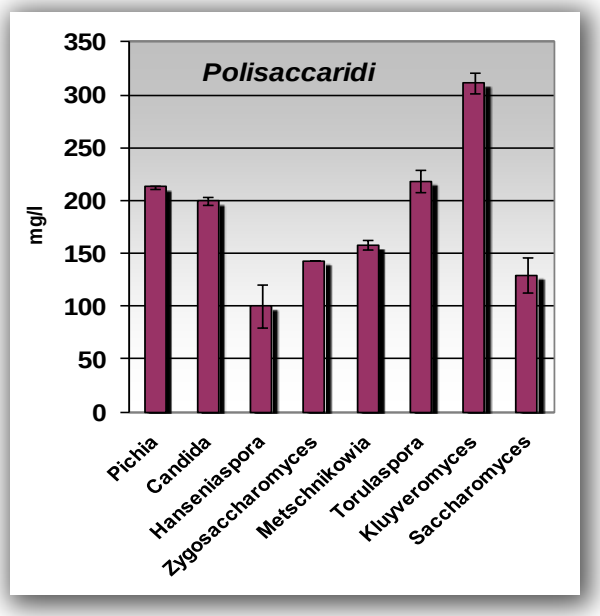


Figura 69: polisaccaridi (delta rispetto al valore iniziale nel mosto) nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

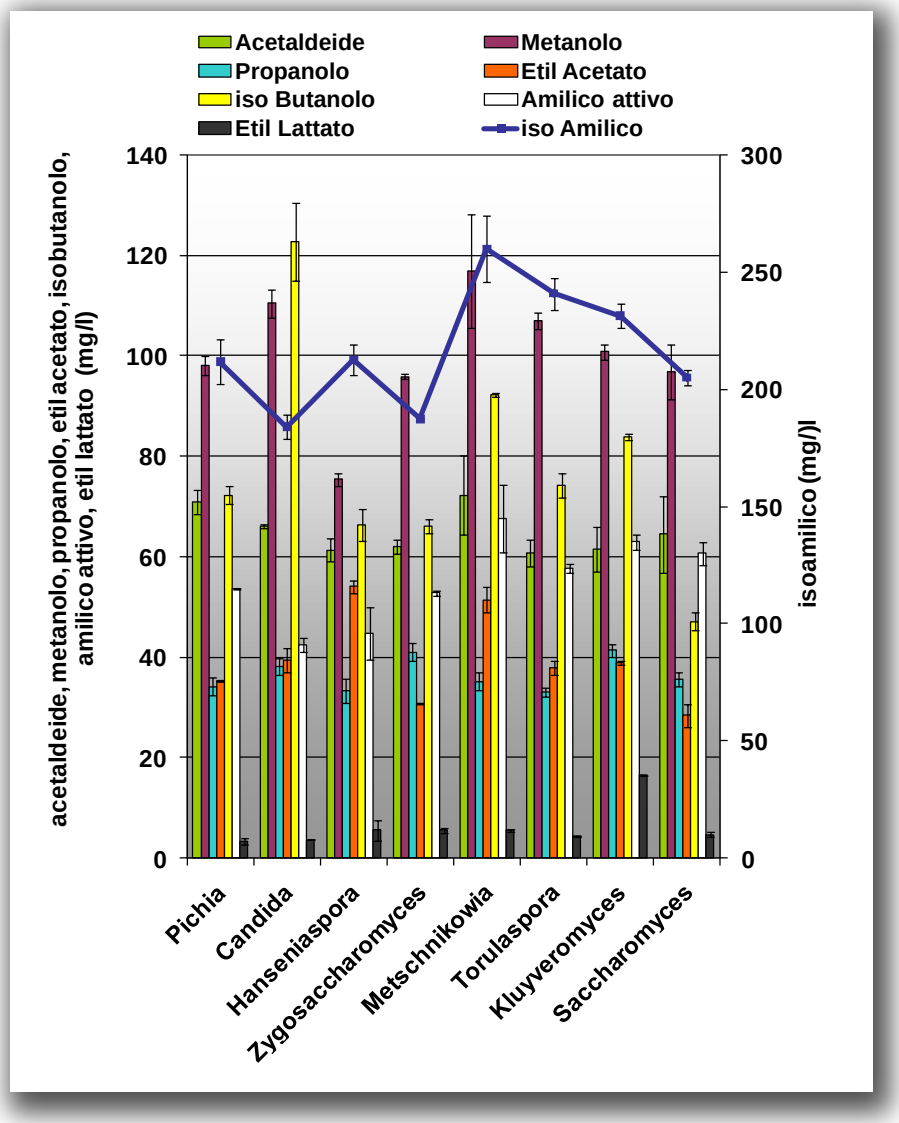


Figura 70: composti volatili (acetaldeide, metanolo, alcoli superiori, etil acetato e etil lattato) nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

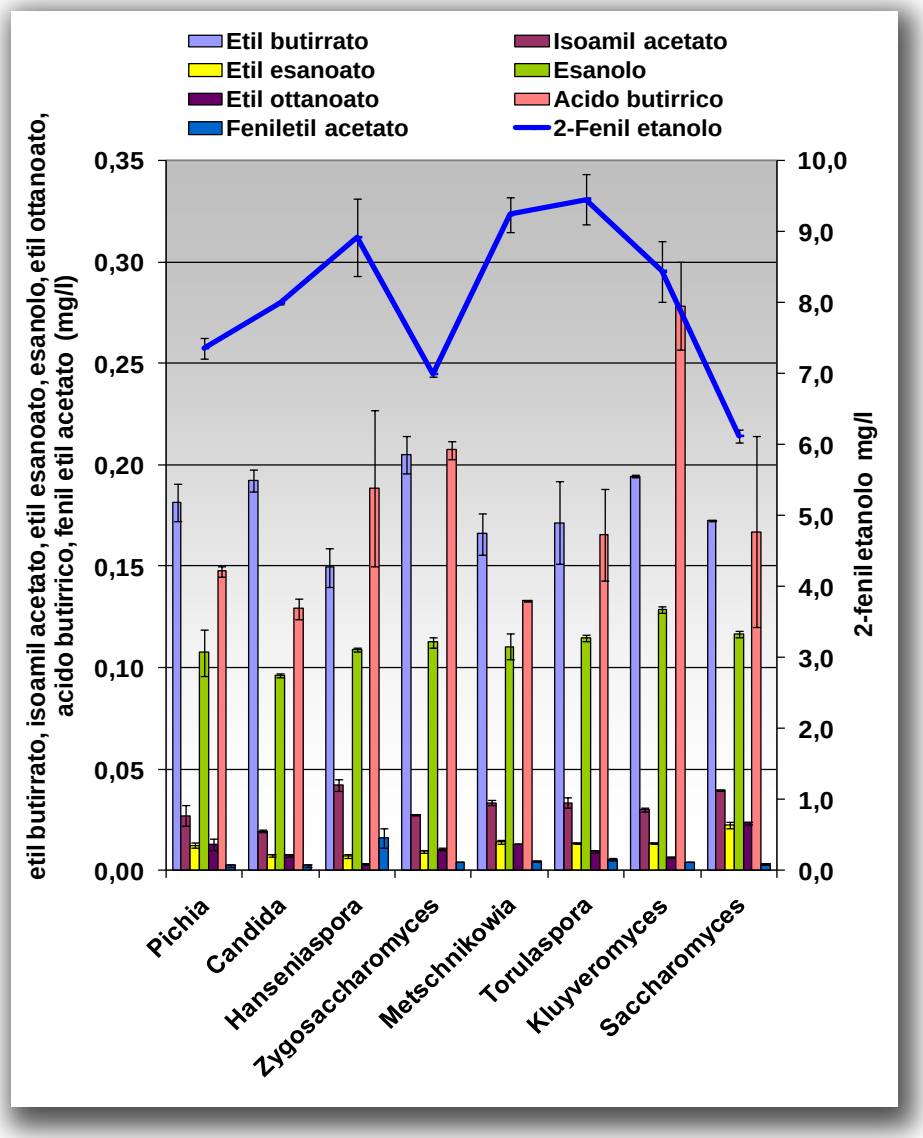


Figura 71: altri composti volatili (esteri etilici e acetati, esanolo, acido butirrico e 2-fenil etanolo) nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

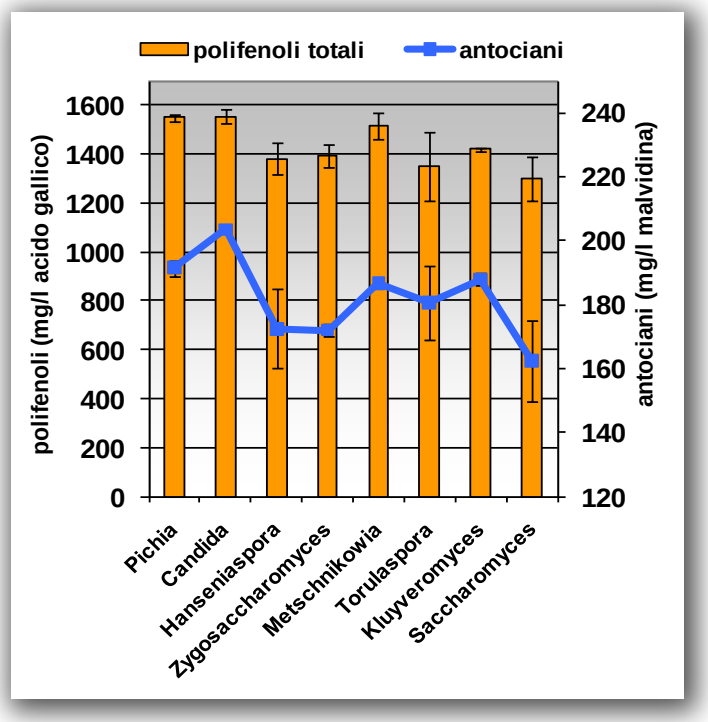


Figura 72: antociani e polifenoli totali nei vini ottenuti dalle prove di microvinificazione in cantina

4.2.4. Conclusioni II anno di sperimentazione

Nella tabella 57 sono riportate in sintesi le principali differenze, rispetto alla coltura pura di *Saccharomyces cerevisiae*, conseguenti all'impiego in coinoculo con i diversi ceppi di lievito non-*Saccharomyces,* ottenute nelle fermentazioni in scala di laboratorio.

Tabella 57: riepilogo delle variazioni dei principali caratteri e prodotti fermentativi nelle diverse tesi (coinoculo S. cerevisiae/ non-Saccharomyces) comparati con quelli dei controlli (colture pure di S. cerevisiae).

Ceppo	TESI	Cinetica di fermentazione	Competitività (persistenza)	Etanolo	Ac. volatile	Ac. totale	Glicerolo	Polisaccaridi	Composti volatili secondari	Altri volatili
Candida zemplinina 22	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ - -	≈ ≈ - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ +	+ + ++	limitato incremento di acetaldeide	incremento di 2 fenil etanolo
Candida tropicalis 69	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ - - - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈		
Hanseniaspora osmophila 32	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ - - - -	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	- - - - -	≈ ≈ +	≈ ≈ ≈	≈ ≈ +	incremento di etil acetato	riduzione generalizzata

Hanseniaspora osmophila 25	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ ≈ −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ −	− − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	incremento di etil acetato	notevole incremento di 2 fenil etanolo
Metschnikowia pulcherrima 46	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	− − − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ +		incremento generalizzato
Kluyveromyces thermotolerans 103	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − −	≈ ≈ −	≈ ≈ ≈	− − − − −	≈ ≈ +	≈ ≈ ≈	≈ ≈ + +	limitato incremento di acetaldeide	incremento di 2 fenil etanolo
Kluyveromyces thermotolerans 101	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − − − −	≈ ≈ − −	≈ ≈ ≈	− − − − − −	≈ + + +	+ + + + + +	+ + +	incremento di isoamilico	notevole incremento di 2 fenil etanolo
Pichia fermentans 4	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − − − −	≈ ≈ −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	− − − −	≈ ≈ ≈	+ + + +	notevole incremento di etil acetato	

Pichia anomala 9	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − − − −	≈ ≈ − −	≈ ≈ ≈	≈ + + + +	≈ ≈ +	≈ ≈ ≈	≈ + + +		incremento di 2 fenil etanolo (solo tesi 3)
Saccharomycodes ludwigii 62	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	− − − − − −	≈ − − − − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ +	+ ≈ ≈	+ + + + + +	incremento di etil acetato	
Saccharomycodes ludwigii 64	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	− − − − − −	≈ ≈ −	≈ − −	− − − − −	≈ ≈ ≈	+ + + + + +	+ + + + + + +		
Schizo saccharomyces pombe 95	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	− − − − − −	≈ ≈ − −	≈ ≈ ≈	− − − − − −	− − − − − − − − −	+ + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + +	notevole incremento di etil acetato butanolo e amilico	incremento generalizzato
Torulaspora delbrueckii 94	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − − − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	− − − − −	≈ ≈ +	≈ ≈ −	− ≈ +	incremento di propanolo	

Torulaspora delbrueckii 92	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	≈ − − − −	≈ − − −	≈ ≈ ≈	− − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	+ + + + +		incremento di 2 fenil etanolo
Zygosaccharomyces bailii 89	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	− − −	≈ ≈ − −	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	≈ ≈ ≈	+ + +		incremento di 2 fenil etanolo (solo tesi 1)
Zygosaccharomyces florentinus 42	Tesi 1 Tesi 2 Tesi 3	− − − − − −	≈ ≈ −	≈ ≈ ≈	− − − − −	≈ ≈ +	≈ ≈ ≈	≈ + + +	incremento di propanolo e alcoli amilici	incremento di esteri acetati e 2 fenil etanolo

≈ simile al rispettivo controllo di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura
− inferiore al rispettivo controllo di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura
+ superiore al rispettivo controllo di *Saccharomyces cerevisiae* in coltura pura

4.3. III anno di ricerca

I risultati ottenuti durante il secondo anno di sperimentazione hanno consentito di individuare due ceppi di lievito non-*Saccharomyces* con interessanti caratteristiche enologiche. In particolare, sono stati selezionati i ceppi Kl101 e Zy42, ascrivibili rispettivamente alle specie *Kluyveromyces thermotolerans* e *Zygosaccharomyces florentinus*.

Durante il terzo anno di sperimentazione sono state pertanto allestite le attività di seguito riportate.

4.3.1. Messa a punto di strumenti per il monitoraggio molecolare dei lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazione

L'obiettivo della ricerca era disegnare primer impiegabili in reazioni di Real Time PCR (RT-PCR) per il monitoraggio molecolare di lieviti non-*Saccharomyces* nel corso di fermentazioni vinarie condotte da starter misti (*S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces*).

La RT-PCR si basa sull'estrazione del DNA totale dalla matrice di interesse e sulla sua amplificazione, mediante primer specifici per la/le specie che si intende rilevare. E' una tecnica caratterizzata da elevata sensibilità e specificità e, consentendo di ottenere risultati in un giorno lavorativo, ben si presta al monitoraggio delle fermentazioni in tempo reale. Utilizzando questa tecnica con primer specie specifici è stato possibile quantificare *Dekkera bruxellensis* (Phister *et al.*, 2003) e *Saccharomyces cerevisiae* (Martorell *et al.*, 2005) in vino. Più recentemente Hierro *et al.* (2006), utilizzando primer universali, hanno quantificato la popolazione totale dei lieviti responsabili della fermentazione vinaria.

Con l'intento di disegnare primer specifici per lieviti appartenenti alle specie *Zygosaccharomyces florentinus* e

Kluyveromyces termotholerans si è proceduto con la ricerca delle sequenze nucleotidiche delle due specie disponibili in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).
Per quanto riguarda la specie *Z. florentinus* sono attualmente disponibili online le 16 sequenze riportate in tabella 58. Di queste, 11 sono sequenze di DNA ribosomale genomico o mitocondriale, 1 codifica la RNA polimerasi III DNA-dipendente e le rimanenti codificano il fattore di allungamento della traduzione 1-alfa, parte del gene mitocondriale COX2, dell'actina e di una ribonucleasi P.
Il DNA ribosomale è caratterizzato da elevata variabilità interspecifica e scarsa variabilità intraspecifica. L'analisi molecolare di alcune regioni del DNA ribosomale viene correntemente utilizzata per l'identificazione dei lieviti (Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Esteve Zarzoso *et al.*, 2003). Tuttavia il rDNA non sembra essere un bersaglio adatto al monitoraggio delle singole specie nel corso di processi fermentativi mediante RT-PCR. Si è quindi proceduto con la comparazione delle altre sequenze con tutte le sequenze disponibili in banca dati utilizzando l'applicazione BLAST (Zhang *et al.*, 2000).
E' risultato che le sequenze codificanti il fattore di allungamento della traduzione 1-alfa, la RNA polimerasi DNA dipendente, la subunità 2 della citocromo ossidasi e l'actina sono molto conservate, e presentano identità di sequenza elevatissime con le sequenze omologhe di lieviti appartenenti a specie di ambito vinario, tra cui anche *Saccharomyces cerevisiae*. Neanche queste sequenze quindi costituiscono un bersaglio utilizzabile per il monitoraggio di *Z. florentinus* in fermentazione mediante RT-PCR. La sequenza parziale del gene codificante la ribonucleasi P invece non mostra identità con alcuna sequenza nota. E' attualmente da verificare se questa sequenza può costituire un bersaglio utilizzabile per la rilevazione della specie.
Per quanto riguarda la specie *Kluyveromyces thermotolerans* dal 2005 è disponibile al sito

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/13307 la sequenza del genoma mitocondriale (Talla *et al.*, 2005) (Tab. 59) e il genoma completo è stato sequenziato, depositato in GenBank nel 2009 ed è attualmente disponibile al sito http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/12490.
Dato il suo elevato tasso di mutazione in lievito (Lynch *et al.*, 2008) si è pensato di focalizzare l'attenzione sul DNA mitocondriale e in particolare sul gene COX1, codificante la subunità 1 della citocromo C ossidasi. Questo gene contiene un numero variabile di introni nelle varie specie e presenta elevata variabilità intraspecifica (Foury *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 2003). Per questo Lopez *et al.* (2003) hanno proposto un metodo per la identificazione di differenti starter di S. cerevisiae sulla base della variazione del numero e della posizione degli introni nel gene mitocondriale COX1. Più recentemente Seifert *et al.*, (2007) e Mouhamadou *et al.*, (2008) hanno valutato la possibilità di utilizzare COX1 come marcatore molecolare fungino e Molitor *et al.*, (2010) hanno proposto di utilizzarlo per lo studio della biodiversità dei funghi del suolo. Si è quindi deciso di valutare la possibilità di utilizzare questo gene come bersaglio molecolare per monitorare la presenza e la persistenza di *K. thermotolerans* nel corso di fermentazioni vinari.
Il gene COX1 di *K. thermotolerans* contiene tre introni di 1530, 1398 e 1404 paia di basi (Talla *et al.*, 2005). Utilizzando il software Primer3, disponibile online al sito http://frodo.wi.mit.edu/primer3/, sono state disegnate tre coppie di primer che, appaiandosi agli esoni, consentissero di amplificare le sequenze complete dei tre introni (Fig. 73). Per le amplificazioni sono stati impiegati protocolli convenzionali e touch down e sono state utilizzate temperature di annealing nel range compreso tra 45 e 53°C. In tal modo è stato possibile amplificare i tre introni (Fig. 74). Tuttavia, nessuno dei protocolli utilizzati forniva risultati ripetibili. Inoltre, il sequenziamento degli ampliconi ha prodotto risultati solo nel caso dell'introne 3 dei ceppi 103, 105 e 107. Le sequenze ottenute sono state appaiate

con il mtDNA di *K. thermotolerans* utilizzando il software ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). L'allineamento multiplo delle sequenze ottenute e del DNA mitocondriale depositato in GenBank ha evidenziato alcuni possibili Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (dati non mostrati). Tuttavia, data l'impossibilità di sequenziare l'introne 3 del ceppo 101, e considerata l'instabilità del sistema di amplificazione, si è proceduto con la ricerca di altre tre coppie di primer da impiegare per l'amplificazione di porzioni delle sequenze introniche di interesse. Utilizzando il software Primer3 e le sequenze introniche depositate in banca dati sono state disegnate tre ulteriori coppie di primer che, come indicato in figura 75, consentono di amplificare porzioni interne dei 3 introni.

L'utilizzo della seconda serie di primer ha prodotto risultati ripetibili e gli ampliconi relativi a ciascun introne (Fig. 76) sono stati sequenziati. Le sequenze ottenute sono state comparate con quelle degli introni del gene COX1 depositate online e con quelle di tutte le sequenze disponibili in banca dati (dati non mostrati). I risultati indicano che le sequenze dell'introne 2 non mostrano omologie significative con altre sequenze depositate in banca dati e possono per questo costituire bersagli preferenziali per lo studio di primer specie specifici utilizzabili per il monitoraggio di *K. thermotolerans* in fermentazione.

Referenze bibliografiche

a) Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol. 1:329-337

b) Esteve-Zarzoso B, Zorman T, Belloch C, Querol A. (2003) Molecular characterisation of the species of the genus Zygosaccharomyces. Syst Appl Microbiol 26(3):404-411.

c) Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. FEBS Letters 440: 325- 331.

d) Hierro N, Esteve-Zarzoso B, Gonzalez A, Mas A, Guillamon JM. (2006) Real Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeast in wine. Appl Env Microbiol 72(11): 7148-7155.

e) Lynch M, Sung W, Morris K, Coffey N, Landry C R, Dopman E B, Dickinson WJ, Okamoto K, Kulkarni S, Hartl DL, Thomas WK. (2008) A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 105:9273-9277.

f) López V, Fernández-Espinar MT, Barrio E, Ramón D, Querol A. (2003) A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. Int J Food Microbiol 81(1): 63-71.

g) Martorell P, Querol A, Fernandez-Espinar MT. (2005) Rapid identification and enumeration of Saccharomyces cerevisiae species directly from wine by Real Time PCR. Appl Environ Microbiol 71:6823-6830.

h) Molitor C, Inthavong B, Sage L, Geremia RA, Mouhamadou B. (2010) Potentiality of the COX1 gene in the taxonomic resolution of soil fungi. FEMS Microbiol Lett 302:76-84.

i) Mouhamadou B, Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Manzi S, Gardes M (2008) Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus Tricholoma: barcoding implications. Fungal Gen Biol 45:1219-1226.
j) Phister TG, Mills DA. (2003) Real Time PCR assay for detection and enumeration of Dekkera bruxellensis in wine. Appl Environ Microbiol 69: 7430-7434.
k) Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Herbert PD. (2007) Prospect for fungus identification using COX1 barcodes, with Penicillium as a test case. Proc Natl Acad Sci USA 104:3901-3906.
l) Talla E, Anthouard V, Bouchier C, Frangeul L, Dujon B. (2005) The complete mitochondrial genome of the yeast Kluyveromyces thermotolerans. FEBS Lett 579(1):30-40.
m) Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 7(1-2):203-24.

4.3.2. Valutazione dell'attitudine enologica dei 2 ceppi selezionati di lieviti non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste su scala di laboratorio.

I due ceppi di lievito non-*Saccharomyces* selezionati, *K. thermotolerans* (Kl101) e *Z. florentinus* (Zy42), sono stati sottoposti a prove di fermentazione in triplo su scala di laboratorio, in combinazione con uno starter commerciale (EC1118) appartenente alla specie *S. cerevisiae.* Le fermentazioni sono state condotte su 750 ml di mosto pastorizzato. Il mosto in ciascuna beuta, equipaggiata di valvola Müller, è stato inoculato con un volume della precoltura di ciascun ceppo selezionato, sviluppata a 25°C per 72h nel medesimo substrato. Il volume inoculato è stato calcolato mediante conta cellulare al Thoma in modo da standardizzare l'inoculo iniziale. L'evoluzione delle fermentazioni, condotte a 25°C, è stato monitorata per via gravimetrica registrando giornalmente la perdita in peso fino al termine della fermentazione (peso costante per tre giorni consecutivi). Le colture di lievito non-*Saccharomyces/S. cerevisiae* sono state inoculate secondo il seguente schema:

Coinoculo non-*Saccharomyces*/ *Saccharomyces*	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo sequenziale con *Saccharomyces* (dopo 24 h)	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo sequenziale con *Saccharomyces* (dopo 48 h)	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo non-*Saccharomyces* (coltura pura)	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces*
Inoculo *Saccharomyces* (coltura pura)	10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*

Per valutare la cinetica di crescita dei diversi lieviti durante la fermentazione, sono stati effettuati prelievi immediatamente dopo l'inoculo e dopo 1, 2, 3, 4, 7, 11, 15 e 18 giorni di fermentazione.
In questa fase sono state condotte 30 prove di fermentazione: 18 con colture miste (due tipologie di inoculo non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* × tre modalità di inoculo, in triplo) e 12 di controllo con colture pure (due ceppi di non-*Saccharomyces* e un ceppo di *Saccharomyces*, in triplo).
Il mosto utilizzato per le prove aveva la composizione sotto riportata:

pH	Acidità totale g/l	Zuccheri g/l	Alcol potenziale %	APA mg/l	Ammonio mg/l	Polisaccaridi mg/l
3,61	5,55	224	13,45	154,4	21,68	171,12

- *Kluyveromyces thermotolerans* (ceppo 101)

Dalla figura 77, in cui sono riportati gli andamenti fermentativi delle microfermentazioni condotte con il ceppo *K. thermotolerans* (Kl101) e il ceppo *S. cerevisiae* (EC1118) in purezza, in coinoculo ed in inoculo sequenziale, si può rilevare in tutte le prove una riduzione della velocità di fermentazione solo a partire dal 7° giorno. Nelle prove con le colture miste *K. thermotolerans* + *S. cerevisiae* (coinoculo, inoculo sequenziale a 24h e a 48h) la CO_2 svolta a fine processo è risultata comparabile a quella della coltura pura di *S. cerevisiae* mentre, come atteso, la fermentazione condotta in purezza da *K. thermotolerans* ha portato una più bassa quantità finale di CO_2.
Nella figura 78 è riportata l'evoluzione della crescita microbica del ceppo Kl101. Il ceppo di *K thermotolerans* in coltura pura ha avuto un comportamento del tutto simile a quello di *S. cerevisiae* mentre, in coltura mista, ha evidenziato una certa competitività nei confronti dello starter saccaromicetico. Infatti, nelle prove in coinoculo il

ceppo Kl101 ha determinato una riduzione della crescita di *S. cerevisiae* di un ordine logaritmico mentre, nelle prove sequenziali sia a 24h che a 48h, la presenza del ceppo Kl101 non ha addirittura consentito alcun incremento di biomassa del ceppo di *S. cerevisiae,* la cui concentrazione si è mantenuta nell'ordine di 10^6 cell/ml per tutta la fermentazione.

Nella figura 79 sono riportati etanolo e zuccheri residui negli svinati dopo 23 giorni di fermentazione delle prove condotte con *K. thermotolerans* (Kl101) e *S. cerevisiae* (EC1118) in purezza, in coinoculo e in inoculo sequenziale. I dati evidenziano la maggiore difficoltà nel completamento della fermentazione sia nella prova con *K. thermolerans* in coltura pura sia nelle prove miste rispetto al controllo, evidenziata dal più basso tenore alcolico nei relativi fermentati.

Dal quadro acidico (Fig. 80) si evince che, nei fermentati con inoculi misti, l'acidità totale è risultata comparabile a quella dei fermentati con la coltura pura di *K. thermotolerans* e sensibilmente superiore rispetto al controllo. Nelle prove con inoculo sequenziale l'acidità volatile (Fig. 81) tende a diminuire rispetto sia alle prove in coinoculo che al controllo.

L'acido lattico aumenta nei vini ottenuti dalle fermentazioni in coinoculo e sequenziale, in particolare in quello a 48 ore, in linea con le alte produzioni di questo composto da parte di *Kluyveromyces* in coltura pura. Negli stessi fermentati si può osservare anche un aumento nella produzione di glicerolo (Fig. 82).

Riguardo al contenuto di mannoproteine, nella figura 83 si osserva che gli svinati delle fermentazioni miste presentano concentrazioni sensibilmente più alte rispetto agli svinati delle fermentazioni in purezza con *S. cerevisiae*; ciò è particolarmente evidente nella fermentazione con inoculo sequenziale a 48h.

Tra gli alcoli superiori e gli altri volatili (Fig. 84) si osserva un sensibile aumento di propanolo ed etile acetato, evidente

soprattutto nelle prove con inoculi sequenziali. In tutti i fermentati delle prove multi starter rispetto al controllo si è osservato una notevole diminuzione nel contenuto di alcol isoamilico e, sopratutto, di isobutanolo.
Tra gli altri composti volatili (Fig. 85), rispetto al controllo con *Saccharomyces* si osserva un sensibile incremento soprattutto nel contenuto di 2-fenil etanolo e, in minor misura, di dietil succinato. Si ha invece una diminuzione di acetato di isoamile e feniletile, esanoato ed ottanoato di etile.

- *Zygosaccharomyces florentinus* (ceppo 42)

Nella figura 86 sono riportate le cinetiche di fermentazione dei ceppi *Z. florentinus* (Zy42) e *S. cerevisiae* (EC1118) in purezza, in coinoculo e in inoculo sequenziale. L'attività fermentativa risulta rallentata sia nelle prove condotte con inoculo sequenziale, a 24h e a 48h, sia in quelle condotte in purezza con il ceppo Zy42 rispetto a quelle condotte con coinoculo (*Z. florentinus + S. cerevisiae*) e con *S. cerevisiae* (EC1118) in coltura pura; queste ultime tra loro non hanno invece evidenziato differenze. La minore produzione di CO_2, nelle prove condotte da Zy42, indica il più basso potere fermentativo di questo lievito rispetto a *S. cerevisiae*.
Per quanto riguarda l'influenza del ceppo Zy42 sullo sviluppo dello starter *S. cerevisiae* (EC1118) (Fig. 87), si può osservare che per tutte e tre le tesi in inoculo misto, il ceppo di *S. cerevisiae* ha un andamento evolutivo del tutto simile a quello esibito in coltura pura. Il ceppo di *S. cerevisiae,* al contrario, esercita un rilevante effetto negativo sulla coltura di *Z. florentinus*; questo lievito, infatti, riduce notevolmente la sua persistenza durante la fermentazione mista, passando dai 18 giorni della coltura pura agli 8 giorni in coinoculo ed a 12 giorni in coltura sequenziale (24 e 48h).

Nelle figure 88 e 89 sono riportati i contenuti di ammonio e di APA durante le microfermentazioni condotte con i ceppi *Z. florentinus* (Zy42) e *S. cerevisiae* (EC1118) sia in purezza che in coltura mista. Rispetto alla fermentazione condotta in purezza con il ceppo Zy42, si può osservare un maggiore utilizzo dell'azoto nelle fermentazioni miste, sia in coinoculo sia in inoculo sequenziale a 24h e in quella condotta con *S. cerevisiae* in coltura pura.
Dalla figura 90, dove sono riportati il contenuto di etanolo e zuccheri residui negli svinati, si può rilevare che le colture miste presentano una maggiore difficoltà a condurre a termine la fermentazione totale degli zuccheri rispetto al *Saccharomyces* in coltura pura. Anche la resa di trasformazione degli zuccheri in alcol diminuisce leggermente, specialmente nelle prove con inoculi sequenziali.
Gli svinati delle prove con inoculo misto sequenziale sono caratterizzati da un pH più basso e, parallelamente, da un valore di acidità più elevato (Fig. 91). Nelle prove in coinoculo si osserva, invece, una situazione simile a quella dei fermentati con *S. cerevisiae* in coltura pura.
Dai valori di acidità volatile (Fig. 92) riscontrati negli svinati si può rilevare che, rispetto alla fermentazione in purezza con *S. cerevisiae,* questo parametro tende a diminuire nelle prove con inoculo sequenziale di *Z. florentinus* + *S. cerevisiae* e, soprattutto, in quelle in coinoculo.
Nessuna variazione nella produzione di acido lattico è stata osservata tra le diverse prove (Fig. 93). Si osserva invece una leggera riduzione nel contenuto di glicerolo, specialmente nelle prove in coinoculo.
Riguardo alla presenza di mannoproteine (Fig. 94) si osserva che, rispetto ai fermentati delle prove in purezza con *S. cerevisiae,* gli svinati derivati dalle fermentazioni miste hanno un tenore di polisaccaridi totali sensibilmente più alto e questo è particolarmente evidente nelle prove con inoculi sequenziali.

Passando a considerare i composti volatili (Fig. 95 e 96), in tutti i fermentati con inoculi misti non si osservano variazioni nella produzione di acetaldeide. Si ha, invece, una sensibile riduzione nel contenuto di alcol isoamilico e, ancor più, di isobutanolo. Nei vini relativi alle prove con inoculo sequenziale aumenta il contenuto di alcol amilico e di propanolo. Riguardo agli altri composti volatili, si osserva un sensibile incremento del 2-fenil etanolo, soprattutto negli svinati ottenuti dalle fermentazioni miste in coinoculo. Il contenuto di fenil etil acetato è risultato maggiore negli svinati derivati dalle prove con inoculo sequenziale. In tutti i fermentati ottenuti dalle prove con inoculo misto si è osservato un aumento di esanolo e decanoato di etile e, al contrario, una diminuzione di acetato di isoamile, acetato di esile e ottanoato di etile.

4.3.3. Valutazione dell'influenza della temperatura sulle fermentazioni miste condotte con i 2 ceppi di lievito selezionati.

Per valutare l'influenza della temperatura i lieviti selezionati (Kl101 e Zy42), in combinazione con uno starter commerciale appartenente alla specie *S. cerevisiae*, sono stati sottoposti a prove di fermentazione su pigiato di uve Sangiovese e Cabernet. Per tali prove sono stati usati fermentatori da banco Braun da 3 L, equipaggiati per rilevare e controllare in continuo diversi parametri operativi quali temperatura, ossigeno disciolto e pH.
In particolare, le prove di fermentazione sono state allestite, in doppio, secondo il seguente schema:

Coinoculo non-*Saccharomyces*/ *Saccharomyces*	20°C 30°C	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo *Saccharomyces* (coltura pura)	20°C 30°C	10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*

Il mosto in ciascuna prova è stato inoculato con un volume di precoltura sviluppata per 48h nel medesimo substrato e alla temperatura utilizzata per la relativa prova (20°C e 30°C). Il volume inoculato è stato calcolato mediante conta cellulare al Thoma in modo da standardizzare l'inoculo iniziale.
In totale, in questa fase sono state allestite 12 prove di fermentazione: 8 con colture miste (due tipologie di inoculo non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* per due temperature, in doppio), e 4 di controllo con colture pure (ceppo di *Saccharomyces* per due temperature, in doppio).

In figura 97 è riportata l'evoluzione della popolazione microbica della coltura pura di *S. cerevisiae*, a 20°C e 30°C. Come atteso, a 30°C lo sviluppo microbico della coltura è risultato più rapido, determinando un più breve processo fermentativo. A 20°C il processo si è prolungato, registrando sino al 18° giorno una vitalità cellulare di 10^8 cell/ml.
La durata delle prove di fermentazione in coinoculo ha rispecchiato gli andamenti registrati nelle prove condotte in coltura pura con lo starter di *S. cerevisiae* (10 e 18 giorni, rispettivamente a 20°C e 30°C). Un leggero prolungamento si è avuto per le prove *K. thermotolerans + S. cerevisiae* (coinoculo) a 20°C.
Nella prova a 30°C, entrambi i lieviti non-*Saccharomyces* sono risultati vitali sino al quinto giorno di fermentazione (Fig. 98). In questo lasso di tempo, *K. thermotolerans* (ceppo 101) si differenzia, tuttavia, dalla coltura di *Z. florentinus* (ceppo 42) per la capacità di svilupparsi e competere con la coltura starter di *S. cerevisiae*.
Nelle prove a 20°C (Fig. 99), si è osservata una maggiore persistenza dei lieviti non-*Saccharomyces*, i quali sono risultati vitali a concentrazioni rilevanti sino al termine del processo fermentativo (20 gg) per il *K. thermotolerans* e sino al 15° giorno per il ceppo di *Z. florentinus*.
Rispetto alle fermentazioni con *S. cerevisiae* in coltura pura condotte alle stesse temperature (Fig. 100), si evince che le fermentazioni miste *K. thermotolerans/S. cerevisiae* hanno avuto un decorso fermentativo rallentato, sia alla temperatura di 30°C sia a quella di 20°C. Nonostante l'elevato tenore zuccherino del mosto di partenza (25,4% di zuccheri, equivalenti a 15,24% di alcol potenziale), sia a 20°C che a 30°C, si è avuto un prolungamento della fermentazione di circa 6 giorni, sempre rispetto alle prove con *Saccharomyces* in coltura pura. Nel caso delle prove con *Z. florentinus* (Fig. 101), invece, il rallentamento dell'attività fermentativa è evidente soltanto nelle fermentazioni condotte a 20°C.

Nella figura 102, si può osservare una sensibile riduzione del tenore alcolico nelle fermentazioni condotte a 20°C con coltura mista, rispetto a quelle di controllo con *S. cerevisiae*; tale riduzione risulta più marcata nelle fermentazioni con inoculo misto *K. thermotolerans/S. cerevisiae*. Nelle fermentazioni condotte a 30°C non si è riscontrata, invece, alcuna differenza nel tenore finale di etanolo tra le fermentazioni coinoculate e quelle condotte da *Saccharomyces* in purezza.
Riguardo al pH (Fig. 103), si osserva, rispetto al controllo, un valore più basso nei fermentati di tutte le prove miste alle due diverse temperature, particolarmente evidente nella prova a 20°C con inoculo di *Z. florentinus/S. cerevisiae.* Tali variazioni sono rispecchiate nei valori dell'acidità totale degli svinati. Dalla figura 104 si evince, infatti, che nelle colture miste si ha un innalzamento medio dell'acidità di circa 2 g/l, che raggiunge i 3 g/l nelle fermentazioni miste condotte a 20°C con *Z. florentinus.*
L'acidità volatile (Fig. 105), rispetto alle prove di controllo con *S. cerevisiae* non aumenta nelle fermentazioni miste, sia con *K. thermotolerans* sia con *Z. florentinus,* condotte a 20°C*,* mentre si riscontra una sua riduzione a 30°C*.*
Dalla figura 106 si osserva un aumento nella produzione di acido lattico, valutato mediante confronto tra analisi HPLC (DL-lattico) ed enzimatica (solo L-lattico). Tale produzione è risultata particolarmente evidente nelle fermentazioni condotte alla temperatura più bassa (20°C) e soprattutto nel caso delle fermentazioni miste *K. thermotolerans/S. cerevisiae.* In quest'ultima combinazione si osserva anche una sensibile diminuzione nel contenuto di acido malico (Fig. 107). In tutte le fermentazioni miste si è avuto un aumento della concentrazione di glicerolo (Fig. 108).
Nei fermentati ottenuti dalle fermentazioni miste condotte sia a 20° che a 30°C, ed in particolare in quelle inoculate con *Kluyveromyces/Saccharomyces,* si osserva un discreto aumento del tenore di mannoproteine rispetto al controllo con *S. cerevisiae* (Fig. 109).

Dalla figura 110, relativa al contenuto di alcol superiori e altri volatili, si osserva che negli svinati ottenuti da tutte le fermentazioni condotte a 20°C con inoculi misti, si è avuto una leggera diminuzione del tenore di acetaldeide. Nei fermentati con inoculo misto *K. thermotolerans/S. cerevisiae* condotti a 20°C si osserva anche un incremento del tenore di propanolo e, ancor più, di acetato di etile. Questi composti, invece, nelle fermentazioni miste *Z. florentinus/S. cerevisiae* risultano leggermente inferiori o ad un livello simile a quello delle relative fermentazioni di controllo con *S. cerevisiae*. Un più elevato tenore in lattato di etile, rispetto al controllo, si osserva nei fermentati ottenuti dalle fermentazioni miste *K. thermotolerans/S. cerevisiae* a 20°C, mentre un livello maggiore di alcol amilico si è avuto in tutte le fermentazioni con inoculo misto, ad eccezione di quelle con *Z. florentinus/S. cerevisiae* condotte a 20°C.

4.3.4. Prove di vinificazione su scala semi-industriale

Lo starter commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* e i due lieviti non-*Saccharomyces*, *K. thermotolerans* ceppo 101 e *Z. florentinus* ceppo 42 sono stati inoculati in fermentini da 10 HL secondo il seguente schema:

Coinoculo non-*Saccharomyces*/ *Saccharomyces*	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo sequenziale *Saccharomyces* (dopo 48 h)	10^7 cell/ml di non-*Saccharomyces* + 10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*
Inoculo *Saccharomyces*	10^6 cell/ml di *S. cerevisiae*

In questa fase sono state condotte 12 prove di fermentazioni (2 ceppi di non-*Saccharomyces* per 2 modalità di inoculo -sequenziale e contemporaneo, x 3 repliche) + 3 prove di fermentazioni di controllo (1 ceppo commerciale di *Saccharomyces* x 3 repliche).
Il mosto di Sangiovese utilizzato per le prove aveva la composizione media sotto riportata:

Mosto Sangiovese		
	media vasche	*SD*
pH	3.24	0.01
acidità totale g/l	7.35	0.31
zuccheri %	22.23	0.40
SO2 mg/l	39.50	2.98

L'evoluzione della crescita della popolazione microbica, valutata mediante le conte vitali, è riportata nelle figure 111, 112 e 113. Come nelle vinificazioni condotte in cantina nella vendemmia precedente, nelle diverse vasche è stata rilevata un'elevata carica iniziale di lieviti non-*Saccharomyces* "selvaggi", presenti in tutte le prove intorno a concentrazioni di 10^7 cell/ml sino al 4° giorno; nel periodo successivo tale carica si è ridotta drasticamente fino a concentrazioni inferiori a 10^2 cell/ml.
S. cerevisiae, inoculato come unico starter, ha mostrato la tipica evoluzione in fermentazioni vinarie con un rapido sviluppo e successivo assestamento a concentrazioni vitali superiori a 10^7 cell/ml per tutto l'arco del processo fermentativo (Fig. 111). Nelle prove in coinoculo con entrambi i ceppi di non-*Saccharomyces* (Kl101 e Zy42), l'evoluzione del ceppo di *S. cerevisiae* (Fig. 112) è risultata simile a quella delle fermentazioni da lui condotte come unico starter, anche se con concentrazioni cellulari leggermente inferiori non superando mai il valore di 10^7 cell/ml. Nelle prove con inoculo sequenziale (Fig. 113), questo andamento è risultato più marcato in entrambe le prove: la crescita di *S. cerevisiae* è limitata nella fermentazione condotta con *Z. florentinus/S. cerevisiae* e praticamente assente in quella condotta con *K. thermotolerans/S. cerevisiae*.
Nelle fermentazioni condotte in coinoculo con *S. cerevisiae,* entrambi i lieviti non-*Saccharomyces* si sono sviluppati durante i primi 4 giorni di fermentazione, risultando in questa fase le specie dominanti. Dopo tale fase si è avuta una riduzione progressiva sino al termine della fermentazione. Tale dominanza è stata più evidente nelle prove con inoculo sequenziale; entrambi i lieviti *non-Saccharomyces,* infatti, si sono mantenuti a concentrazioni elevate (~10^6 cell/ml) sino al settimo giorno di fermentazione.
Dai dati sintetizzati nella figura 114 si evince che, rispetto alla fermentazione inoculata con *S. cerevisiae*, nelle

fermentazioni miste in coinoculo si è avuta una leggera riduzione del tenore di etanolo degli svinati. Tale diminuzione è stata più consistente negli svinati ottenuti dalle prove con inoculi sequenziali e, in particolare, in quelli con *K. thermotolerans/S. cerevisiae,* nei quali si è registrata una diminuzione media di circa il 9%. Nei fermentati delle prove con inoculo misto *Z. florentinus/S. cerevisiae* non si osservano variazioni sensibili nel pH. Il valore di tale parametro, invece, tende a diminuire nelle prove condotte con *K. thermotolerans/S. cerevisiae*, in particolare nelle prove con inoculo sequenziale di *Saccharomyces* (pH 3,2). Parallelamente, negli svinati delle prove con inoculi misti si osserva un incremento dei valori di acidità totale, particolarmente evidente nelle prove *K. thermotolerans/S. cerevisiae* con inoculo sequenziale. Nel caso delle prove con inoculo sequenziale, negli svinati si osserva anche un incremento sensibile del tenore di acidità volatile rispetto alle vinificazioni condotte con il solo inoculo di *Saccharomyces,* con valori che si avvicinano a circa 0,5 g/l nel caso dell'associazione di *Saccharomyces* con *Z. florentinus.*

Dalla figura 115 si osserva che, parallelamente con l'incremento di acidità totale, negli svinati ottenuti dalle prove di inoculo misto *K. thermotolerans/S. cerevisiae* si ha un sensibile incremento dei valori di acido lattico, che risulta molto evidente nel caso di inoculo sequenziale con *Saccharomyces*.

Riguardo al contenuto in glicerolo (Fig. 116), rispetto alle fermentazioni condotte con inoculo di *Saccharomyces*, si osserva un suo significativo incremento soltanto nelle fermentazioni miste con inoculo sequenziale.

Relativamente alla produzione di alcoli superiori e di altri composti volatili, in figura 117 si osserva che, rispetto alle vinificazioni in cui è stato inoculato solo *Saccharomyces*, negli svinati delle fermentazioni con inoculo sequenziale si ha una leggera diminuzione del tenore di propanolo e un incremento di isobutanolo. Nelle fermentazioni miste *Z.*

florentinus/S. cerevisiae con inoculo sequenziale, rispetto al relativo controllo con *Saccharomyces* si è avuto un incremento di acetato di etile, che invece è diminuito nelle fermentazioni condotte in coinoculo. In tutte le fermentazioni con inoculo misto non si rilevano significative variazioni per gli alcoli amilici; si è registrato, invece, un forte incremento nella produzione di lattato di etile nelle fermentazioni miste con *K. thermotolerans/S. cerevisiae,* specialmente in quelle con inoculo sequenziale.
Dalle figure 118 e 119 si nota che, rispetto alle fermentazioni di controllo con inoculo di *Saccharomyces*, l'indice di fenoli totali risulta più basso negli svinati derivati dalle fermentazioni miste *Z. florentinus/S. cerevisiae* e specialmente in quelle con inoculo sequenziale. I flavani totali e quelli non antocianici tendono a diminuire nelle fermentazioni miste con coinoculo ed anche in quella *Z. florentinus/S. cerevisiae* con inoculo sequenziale. Riguardo al contenuto di antociani totali non sono state osservate variazioni significative rispetto al controllo, se non valori leggermente superiori negli svinati derivanti dall'associazione *K. thermotolerans/S. cerevisiae* con inoculo sequenziale e valori leggermente più bassi in tutte le altre fermentazioni miste. Questa tendenza è confermata dai valori dell'indice di intensità di colore. L'indice tonalità di colore risulta diminuire nelle fermentazioni miste con *K. thermotolerans,* particolarmente in quelle con inoculo sequenziale.

Dopo la svinatura, 200 litri del vino fiore di ciascuna prova sono stati suddivisi in due serbatoi di acciaio da 100 litri.

Per standardizzare le prove nei confronti della fermentazione malolattica, in 15 serbatoi sono stati inoculati batteri lattici del commercio (previo adattamento). Al fine di valutare un'eventuale influenza delle colture miste sull'avvio della FML spontanea, nei restanti 15 serbatoi non è stato effettuato alcun inoculo.

I serbatoi sono stati quindi collocati in stanza termostatata a 20°C in attesa del termine della fermentazione malolattica, per una loro successiva valutazione sensoriale dopo opportuna stabilizzazione.

4.3.5. Figure e tabelle III anno di sperimentazione

Tabella 58. Sequenze di Z. florentinus disponibili su GenBank.

Product Name	Length	Accession	GeneID
- 26S rRNA gene partial sequence	583	FR693805.1	307777603
- 26S rRNA gene partial sequence	557	FJ873511.1	227461085
- 26S rRNA gene partial sequence	557	FJ527242.1	223930891
- Translation elongation factor 1-alpha	1127	AF402032.1	32563295
- 5.8S rRNA gene	495	AY046168.1	31746826
- 26S rRNA gene partial sequence	379	AY046099.1	31746757
- Actin, partial cds	897	AF527929.1	31581463
- 26S rRNA gene partial sequence	669	AF399774.1	31581096
- Small subunit rRNA mt genome	650	AF442302.1	31581316
- 26S rRNA gene partial sequence	582	U72165.1	4038811
- DNA-dependent RNApolII	681	AF527900.1	31581405
- Cytochrome oxidase subunit 2 (COX2) gene	585	AF442228.1	31581189
- Ribonucleasi P RNA gene, partial sequence	262	AF186232.1	14164580
- 18S rRNA	1768	X91086.1	1488659
- ITS2 rDNA	173	Z48363.1	1403116
- ITS1 rDNA	166	Z48348.1	1771976

Tabella 59: sequenze geniche nel genoma mitocondriale di K. thermotolerans

Product Name	Length	Accession	Locus	Locus_ tag
- Putative apocytochrome b	385	YP_184719.1	cob	Klthfp01
- Putative cytochrome c oxydase, subunit 1	534	YP_184720.1	cox1	Klthfp02
- Putative DNA endonuclease	542	YP_184721.1	io-cox1.2	Klthfp03
- Putative DNA endonuclease	415	YP_184722.1	io-cox1.1	Klthfp04
- Putative DNA endonuclase	314	YP_184723.1	io-cox1.3	Klthfp05
- Putative ATP synthase, subunit 8	48	YP_184724.1	atp8	Klthfp06
- Putative ATP synthase, subunit 6	260	YP_184725.1	atp6	Klthfp07
- Putative ATP synthase, subunit 9	76	YP_184726.1	atp9	Klthfp08
- Putative cytochrome c oxydase, subunit 2	251	YP_184727.1	cox2	Klthfp09
- Putative cytochrome c oxydase, subunit 3	269	YP_184728.1	cox3	Klthfp10
- Putative mitochondrial ribosomal protein VAR1	373	YP_184729.1	var1	Klthfp11

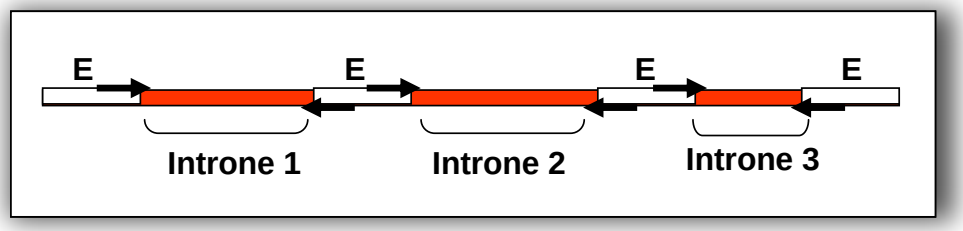


Figura 73: schematizzazione delle regioni di appaiamento dei primer utilizzati per amplificare le sequenze complete degli introni 1, 2 e 3 del gene COX1 di K. thermotolerans. La lettera E indica gli esoni.

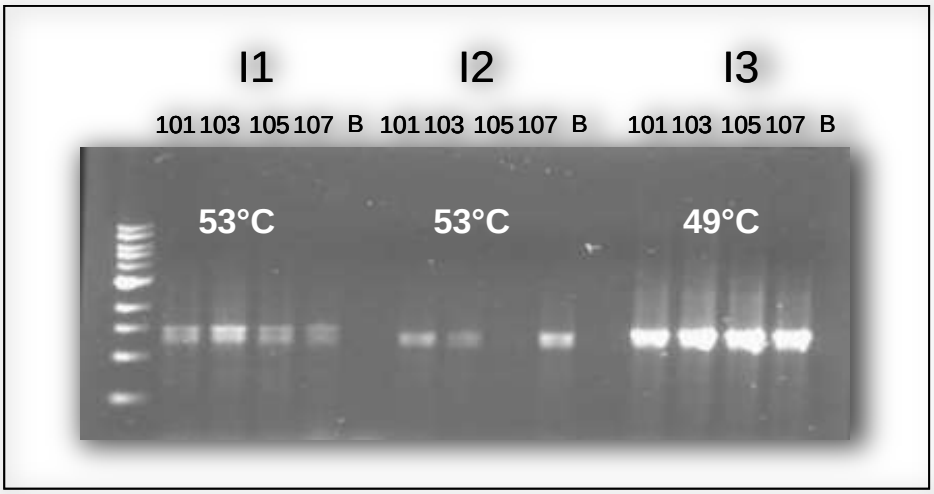


Figura 74: amplificazione delle sequenze complete degli introni 1, 2 e 3 (I1, I2 e I3) del gene COX1 di K. thermotolerans. Sul gel sono riportate le temperature di annealing utilizzate per le coppie di primer relative a ciascun introne. 101, 103, 105, 107: ceppi di K. thermotolerans. L: marcatore di peso molecolare 1Kb, B: controllo negativo di amplificazione.

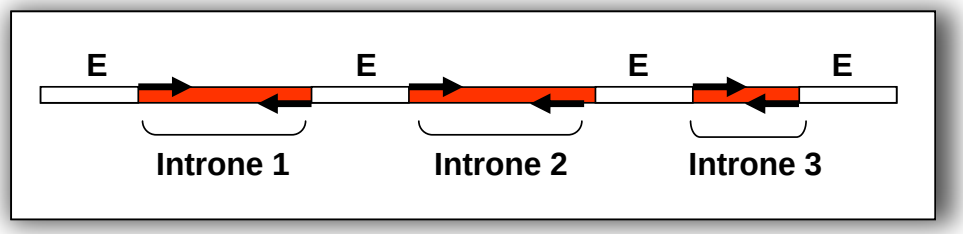


Figura 75: schematizzazione delle regioni di appaiamento dei primer utilizzati per amplificare porzioni degli introni 1, 2 e 3 del gene COX1 di K. thermotolerans. La lettera E indica gli esoni.

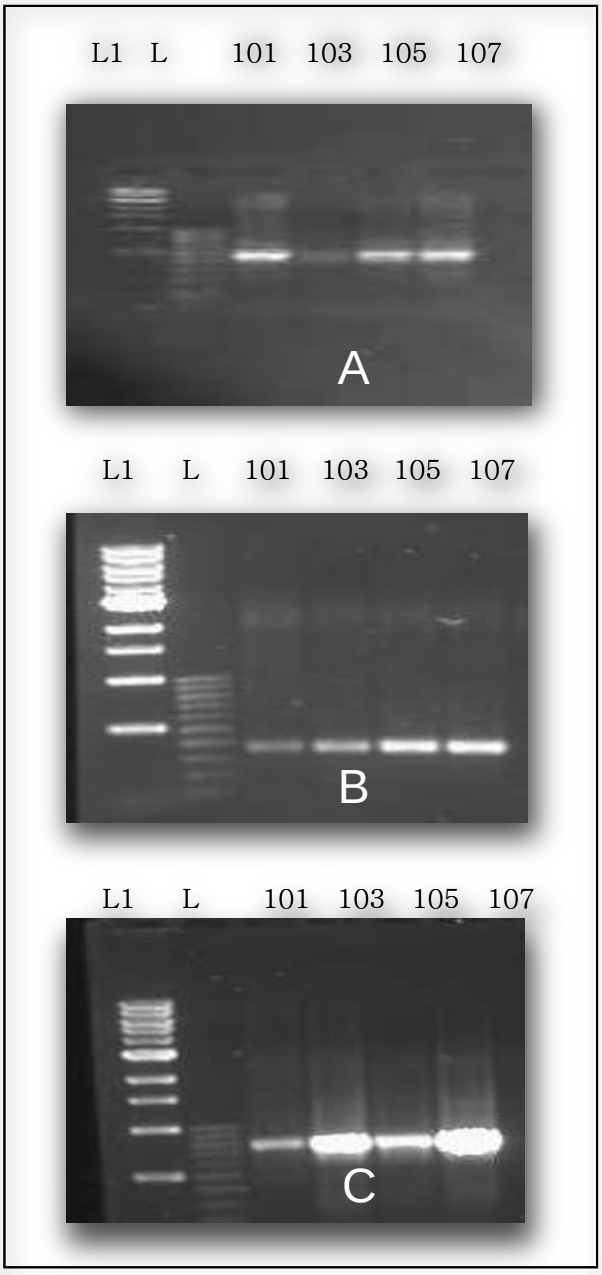


Figura 76: amplificazione delle sequenze interne agli introni 1, 2 e 3 (rispettivamente nei gel A, B e C) del gene COX1 di K. thermotolerans. 101, 103, 105, 107: indicano i ceppi di K. thermotolerans. L: marcatore di peso molecolare 1Kb.

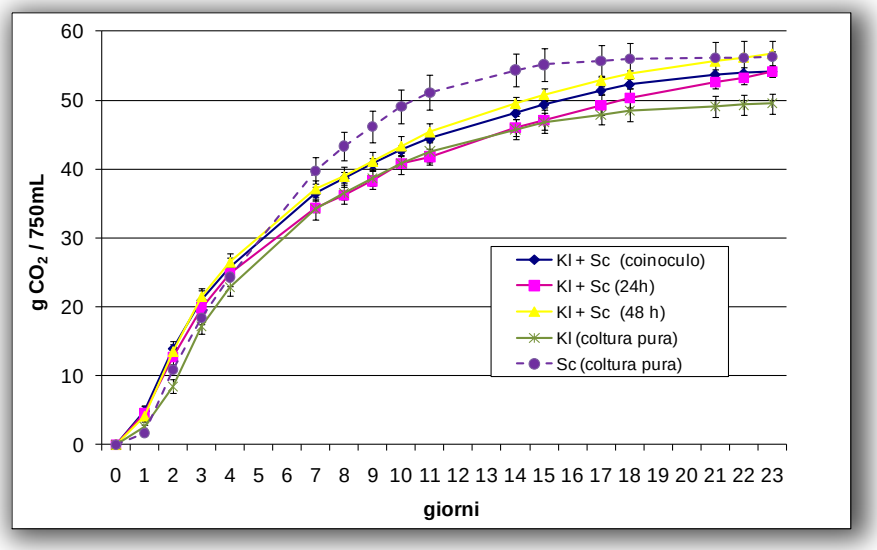


Figura 77: cinetiche di fermentazione di K. thermotolerans e S. cerevisiae in coltura pura e in coltura mista

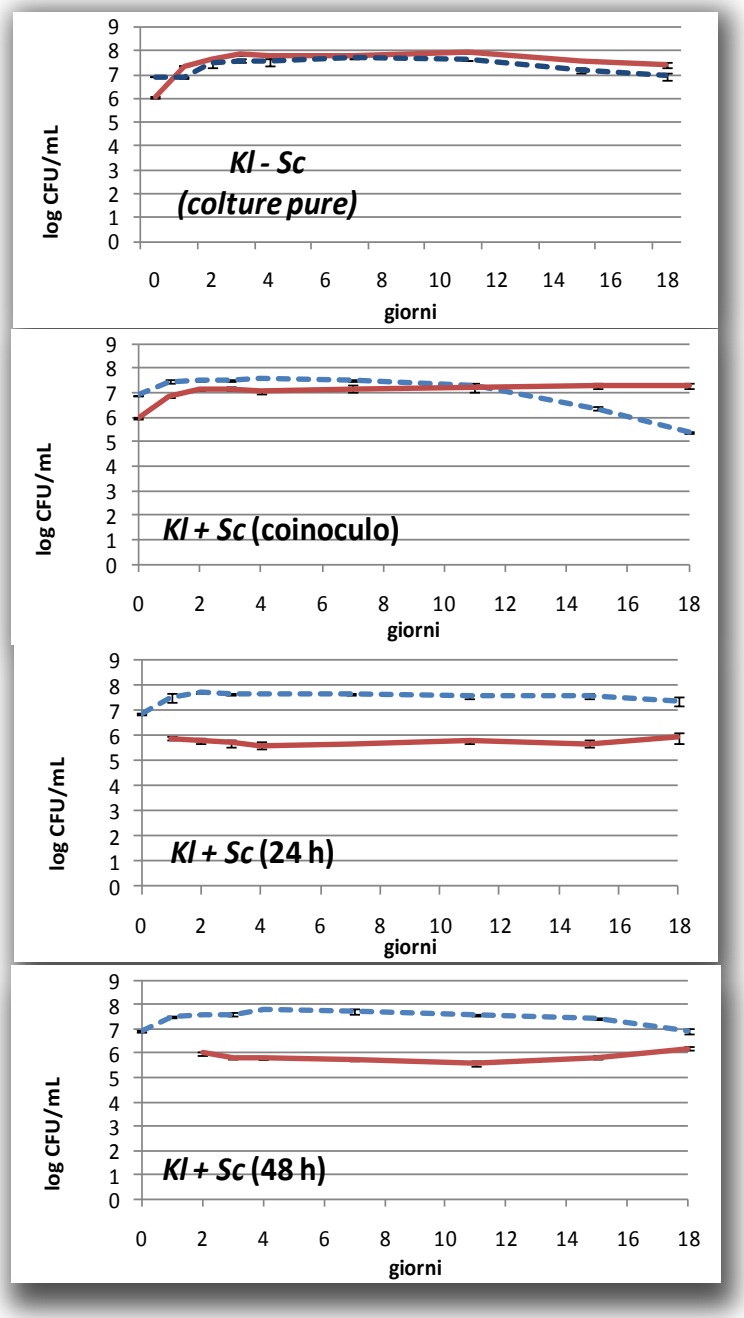


Figura 78: cinetiche di crescita di K. thermotolerans (---) e S. cerevisiae (—) in coltura pura e in coltura mista

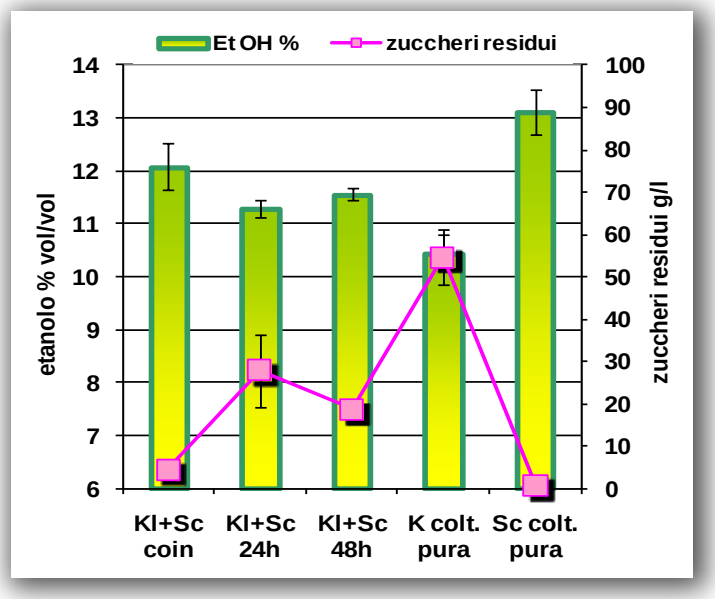


Figura 79: etanolo e zuccheri residui negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

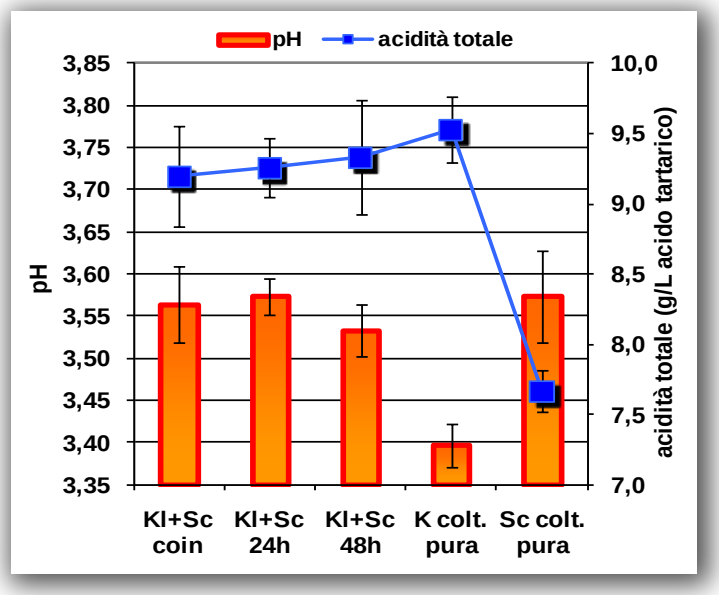


Figura 80: acidità totale e pH negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

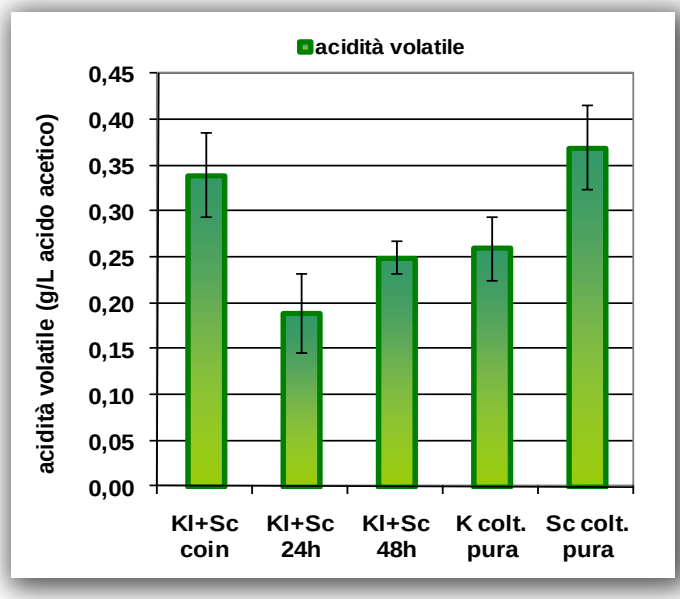


Figura 81: acidità volatile negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

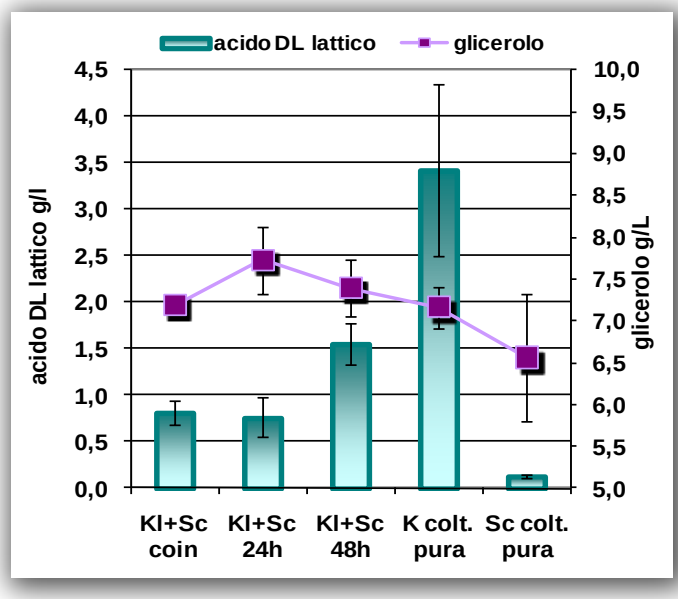


Figura 82: acido lattico e glicerolo negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

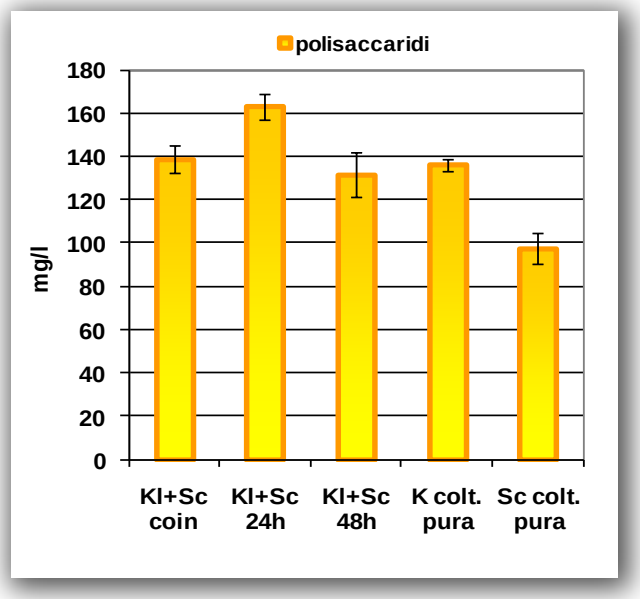


Figura 83: polisaccaridi (delta rispetto al valore iniziale nel mosto) negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

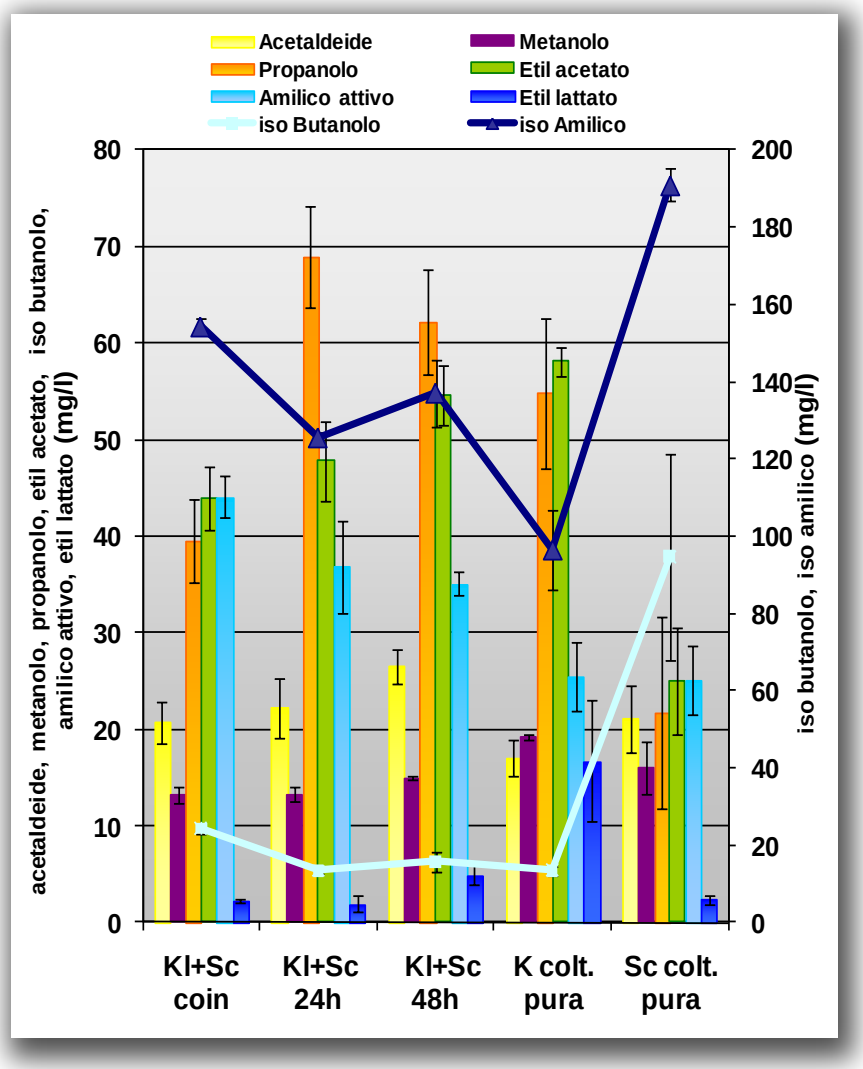


Figura 84: composti volatili negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

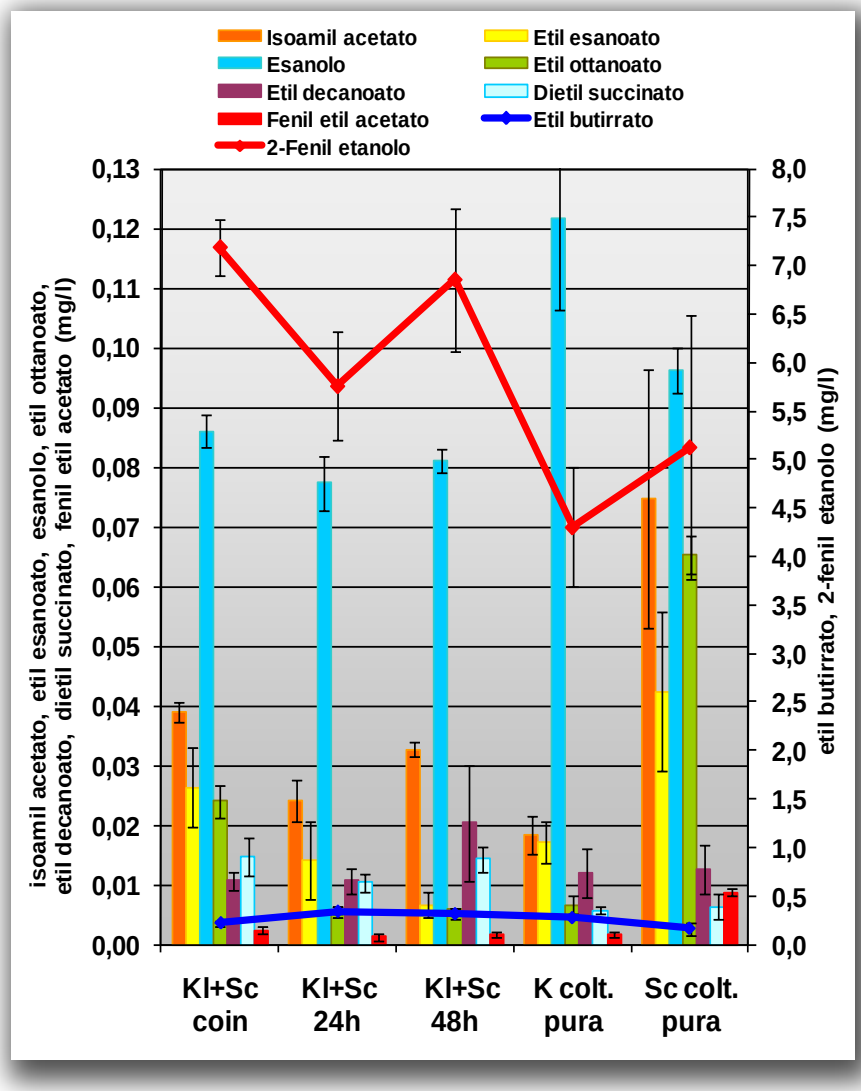


Figura 85: altri composti volatili negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e K. thermotolerans in coltura pura e in coltura mista

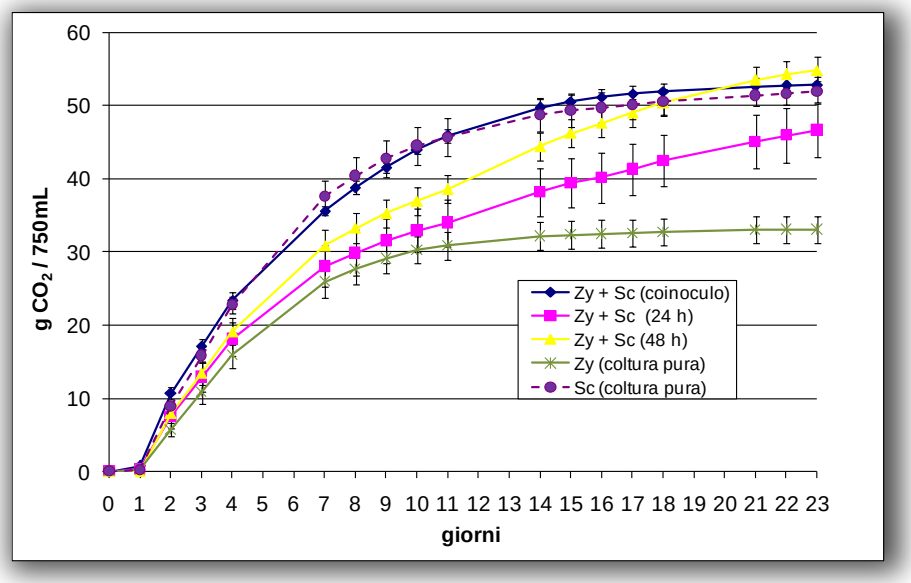


Figura 86: cinetiche di fermentazione di Z. florentinus e S. cerevisiae in coltura pura e in coltura mista

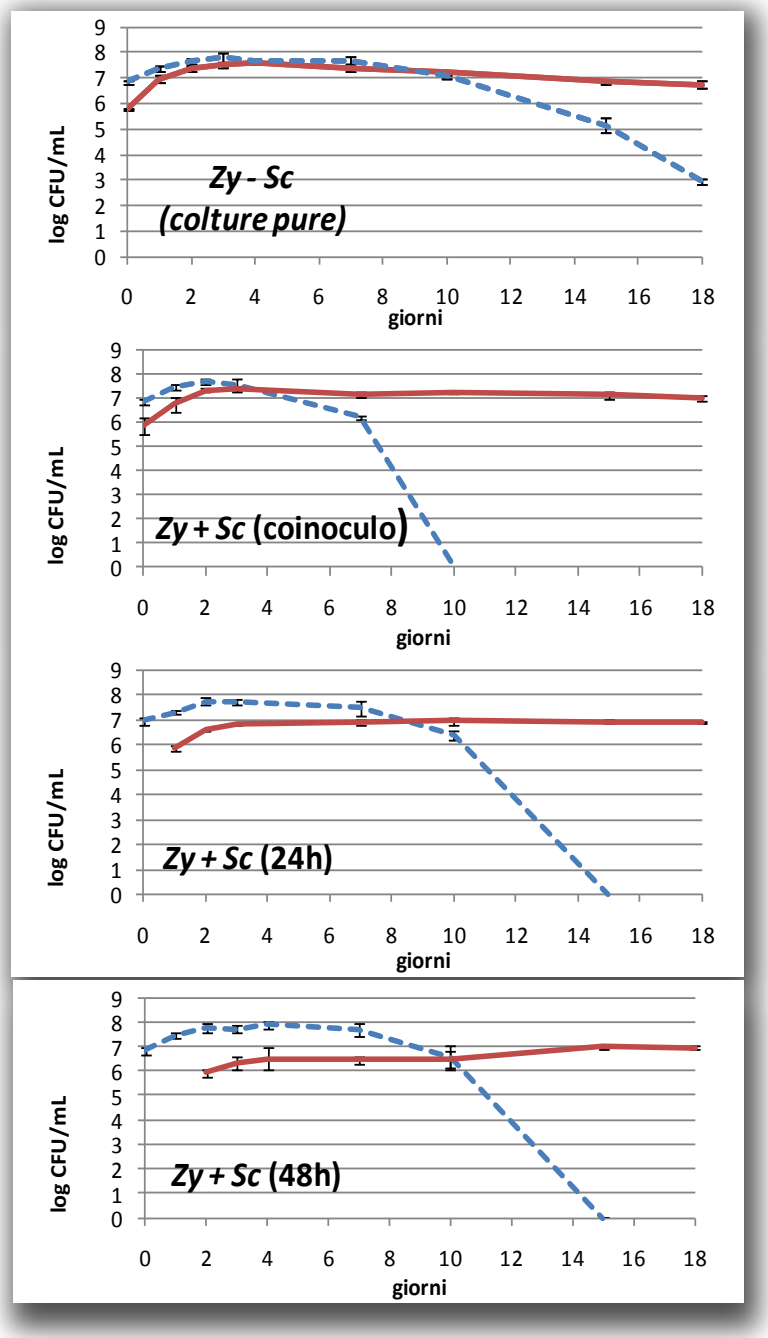


Figura 87: cinetiche di crescita di Z. florentinus (---) e S. cerevisiae (—) in coltura pura e in coltura mista

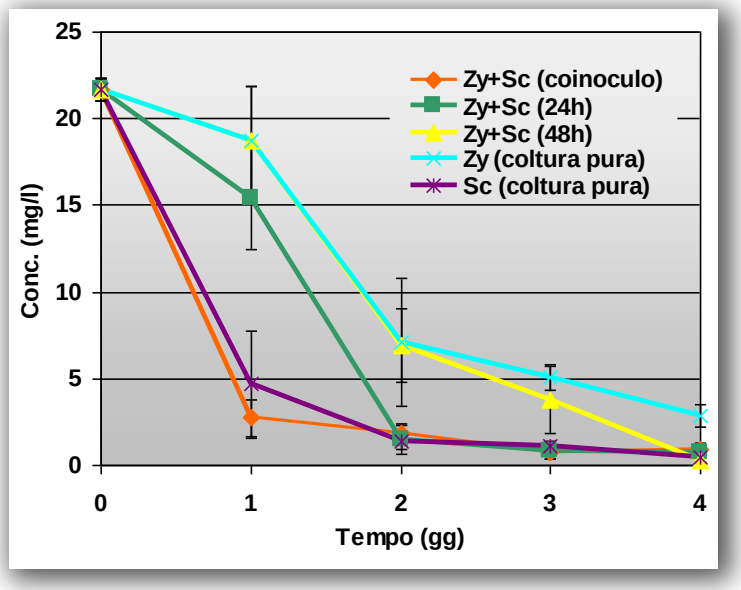


Figura 88: consumo dell'ammonio nelle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

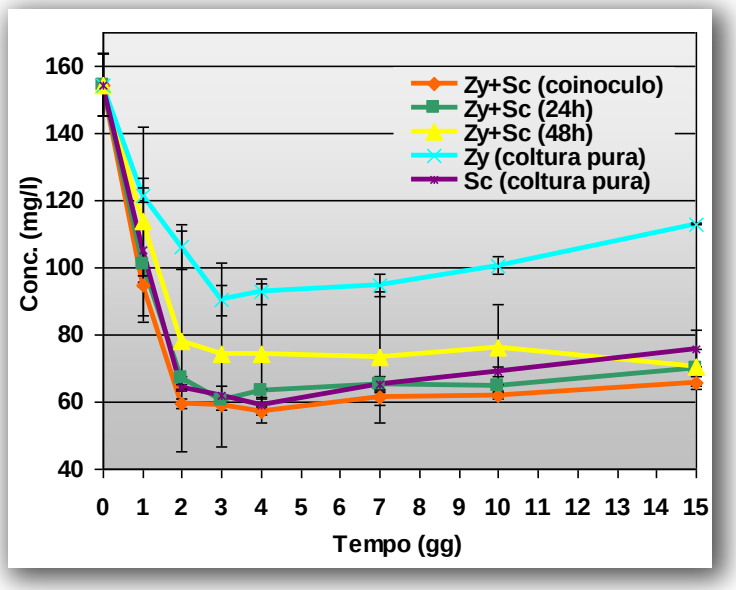


Figura 89: consumo dell'APA (Azoto Prontamente Assimilabile) nelle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

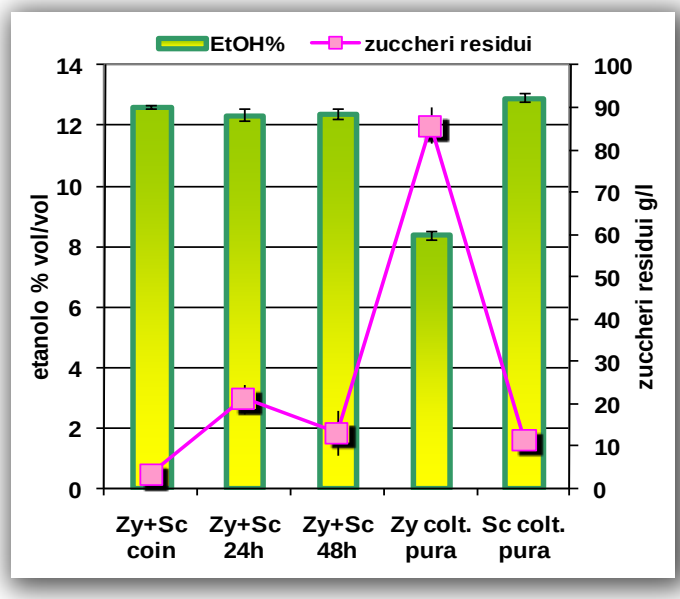


Figura 90: etanolo e zuccheri residui negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

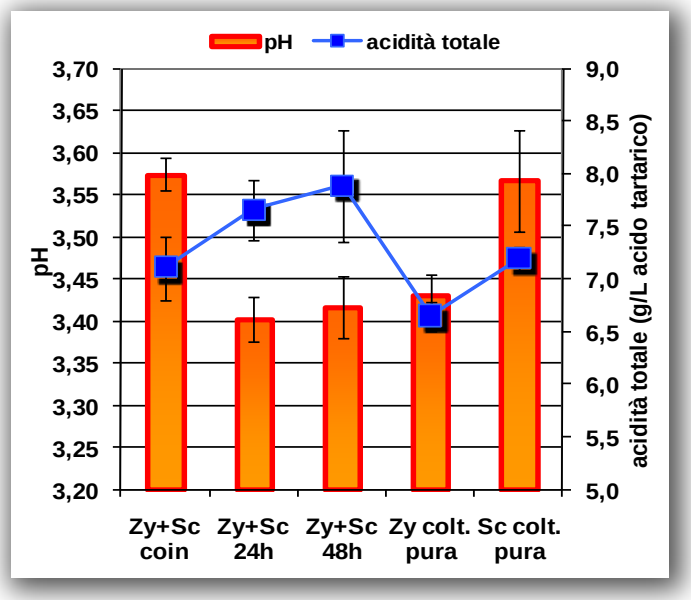


Figura 91: acidità totale e pH negli svinati dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

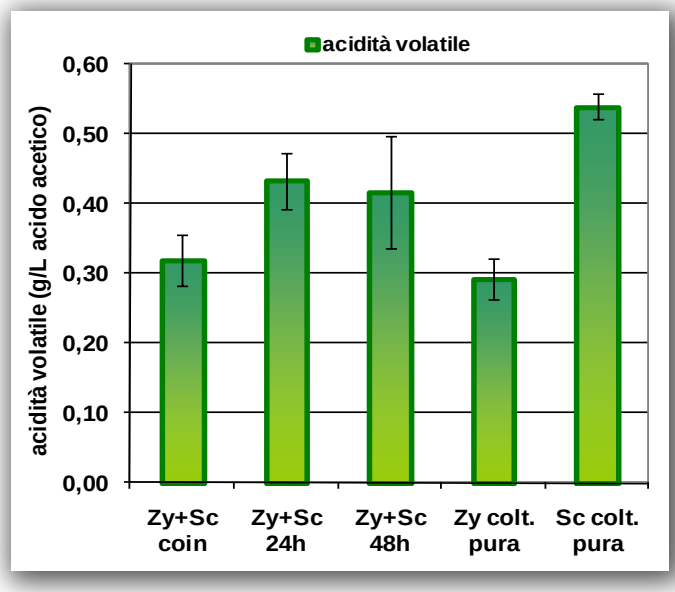


Figura 92: acidità volatile negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

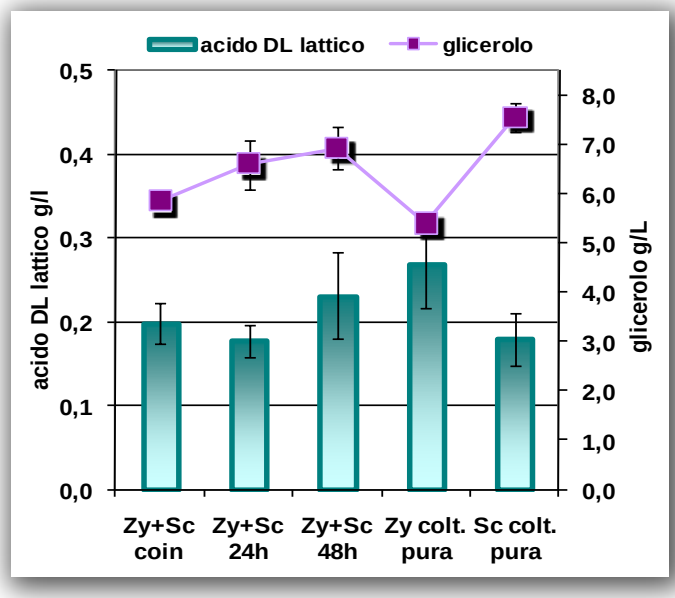


Figura 93: acido lattico e glicerolo negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

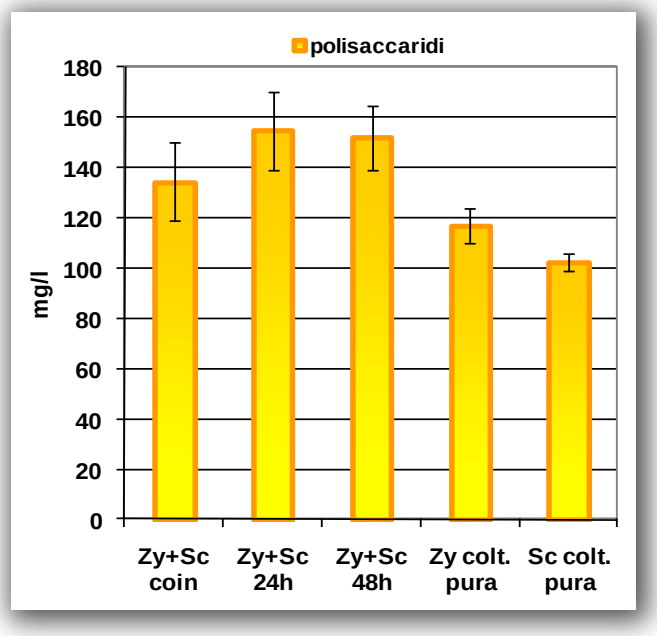


Figura 94: polisaccaridi (delta rispetto al valore iniziale nel mosto) negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

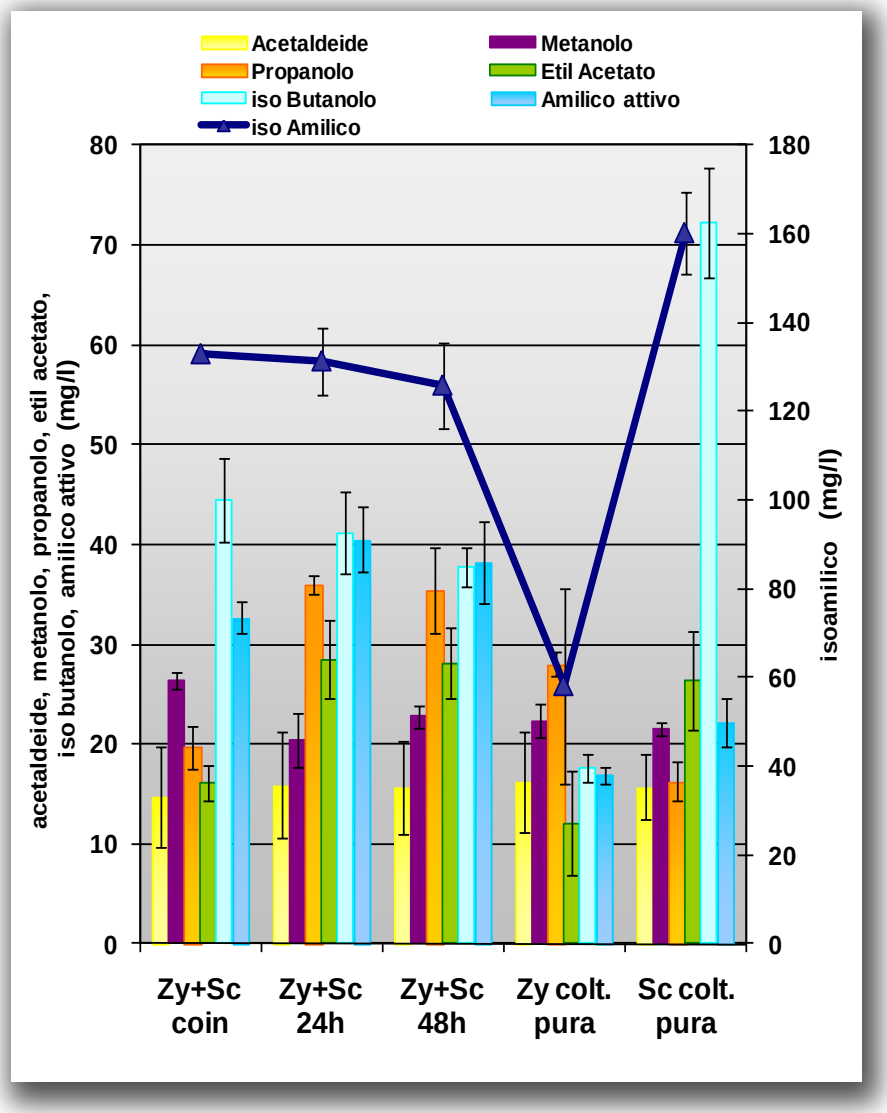


Figura 95: composti volatili negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

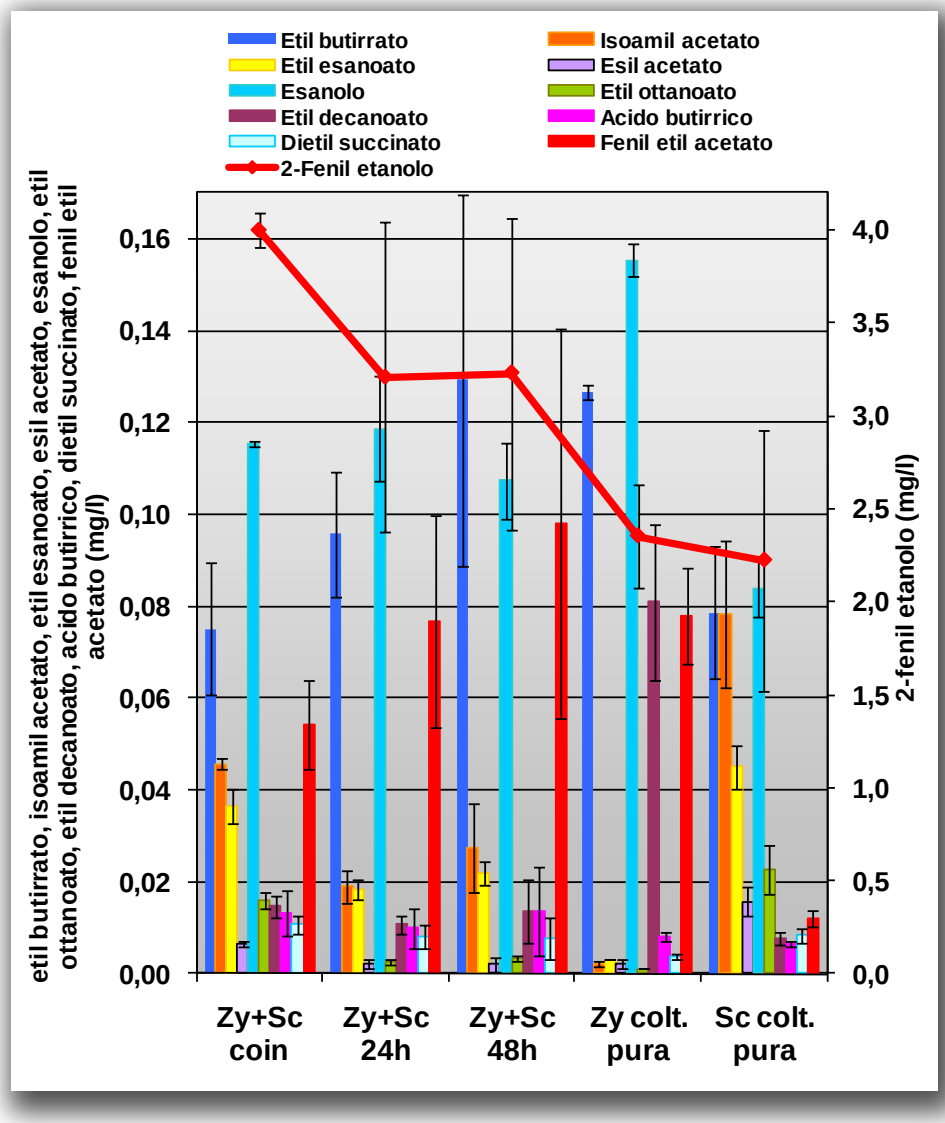


Figura 96: altri composti volatili negli svinati ottenuti dalle fermentazioni con S. cerevisiae e Z.florentinus in coltura pura e in coltura mista

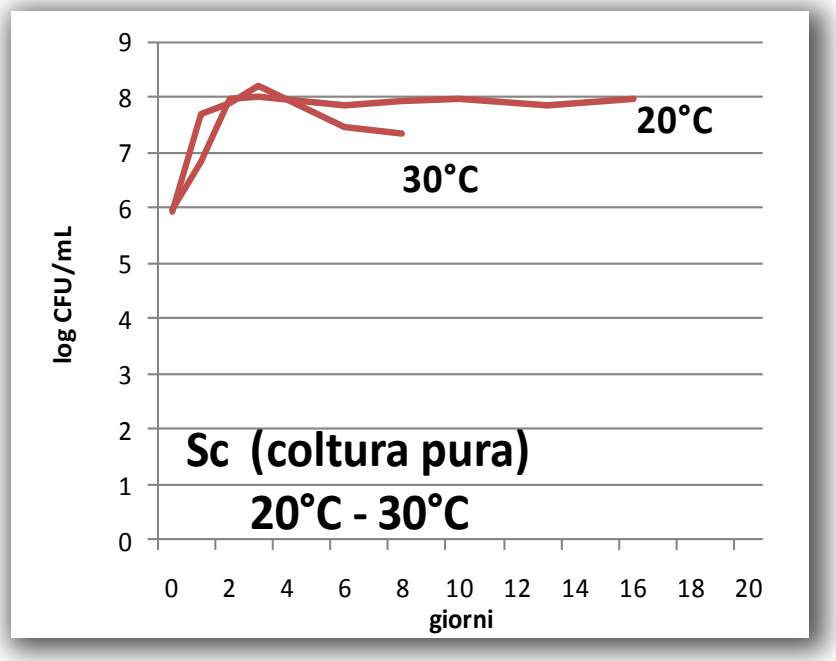


Figura 97: cinetiche di crescita di S. cerevisiae in coltura pura alla temperatura di 20°C e 30°C

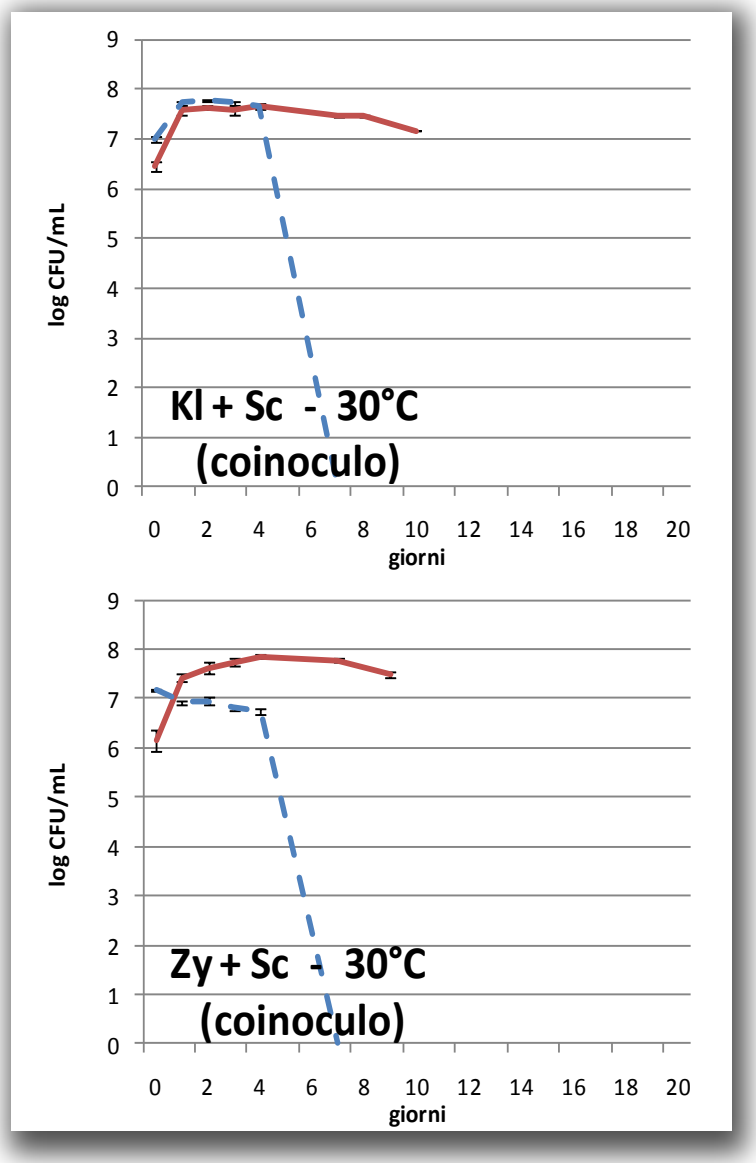


Figura 98: cinetiche di crescita dei lieviti inoculati di Saccharomyces (—) e non-Saccharomyces (--) nel corso delle fermentazioni miste condotte alla temperatura di 30°C

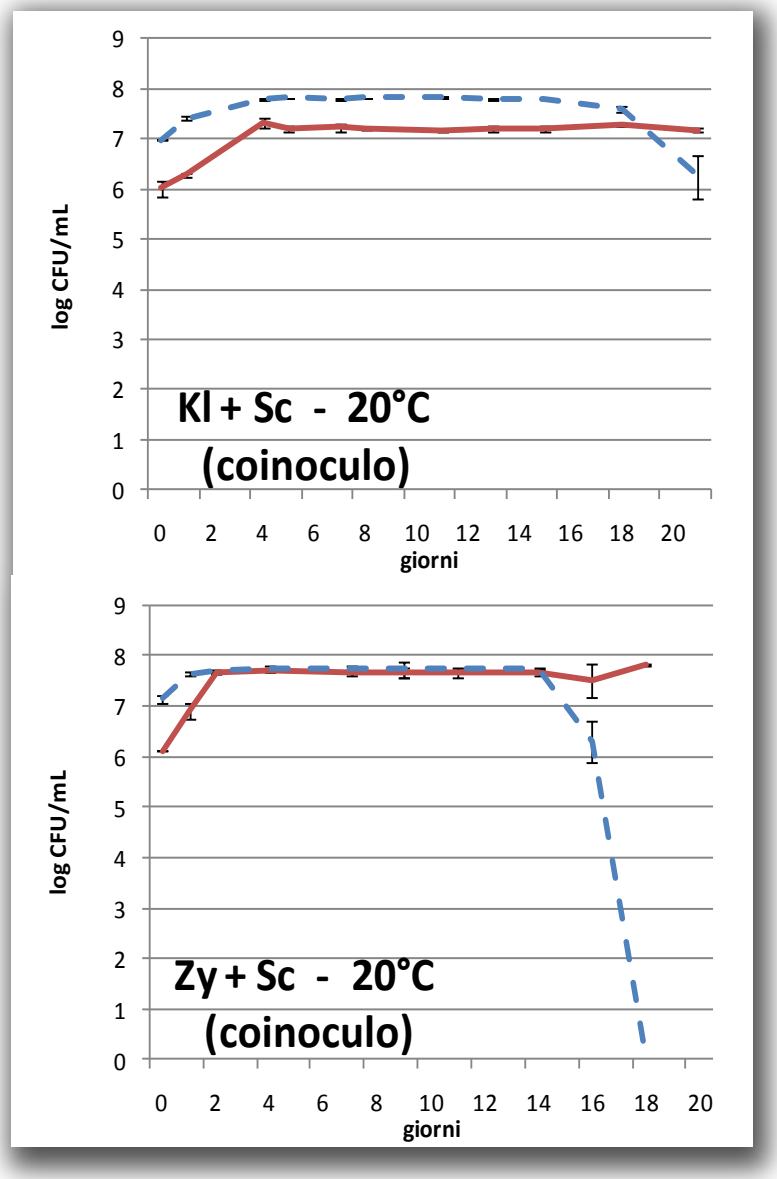


Figura 99: cinetiche di crescita dei lieviti inoculati di Saccharomyces (—) e non-Saccharomyces (--) nel corso delle fermentazioni miste condotte alla temperatura di 20°C

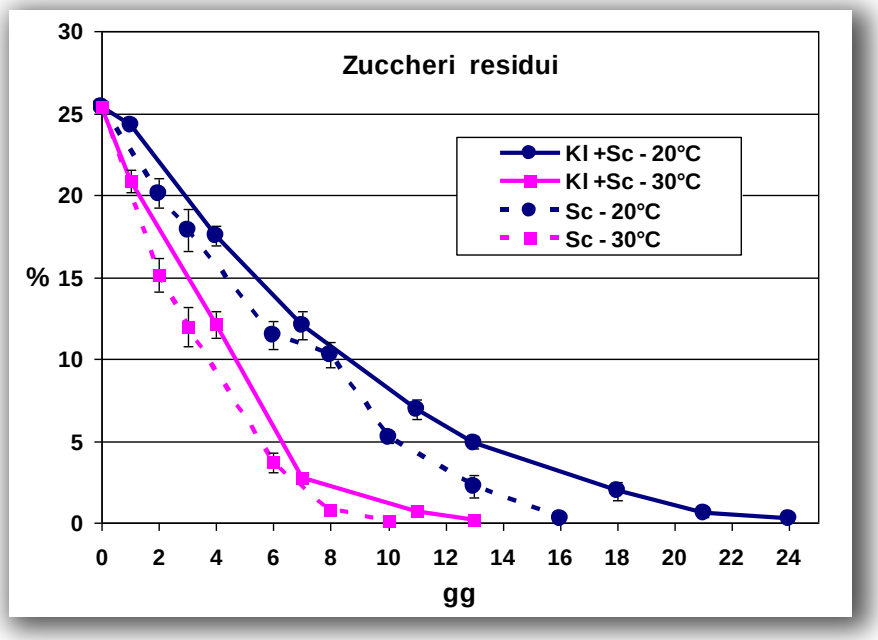


Figura 100: consumo degli zuccheri durante le fermentazioni a 20 °C e 30°C

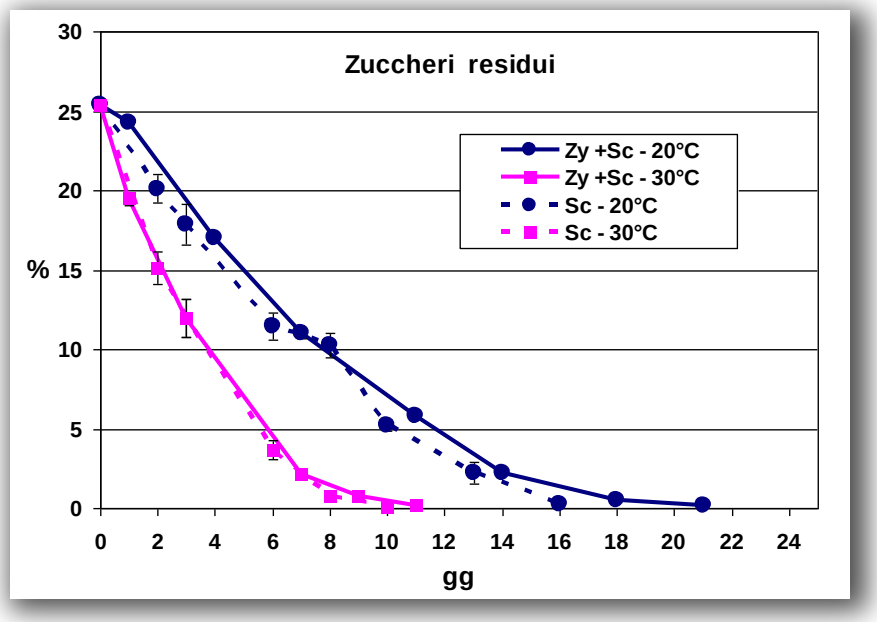


Figura 101: consumo degli zuccheri durante le fermentazioni a 20 °C e 30°C

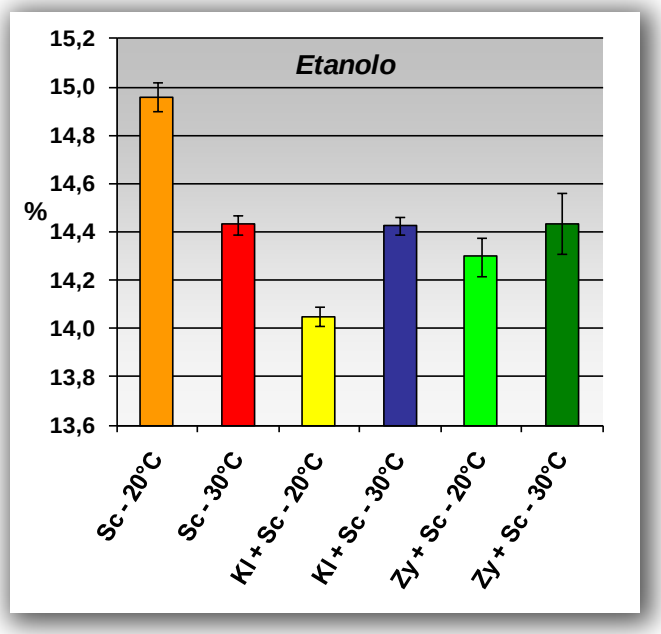


Figura 102: etanolo negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

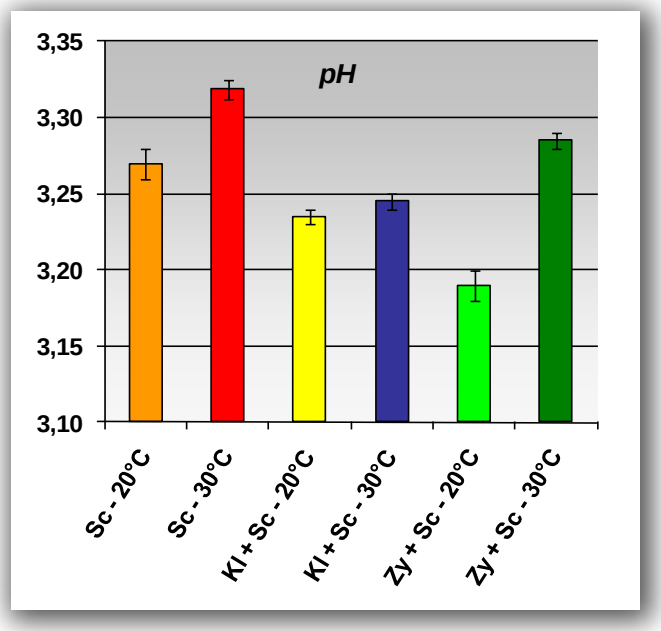


Figura 103: pH negli svinati negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

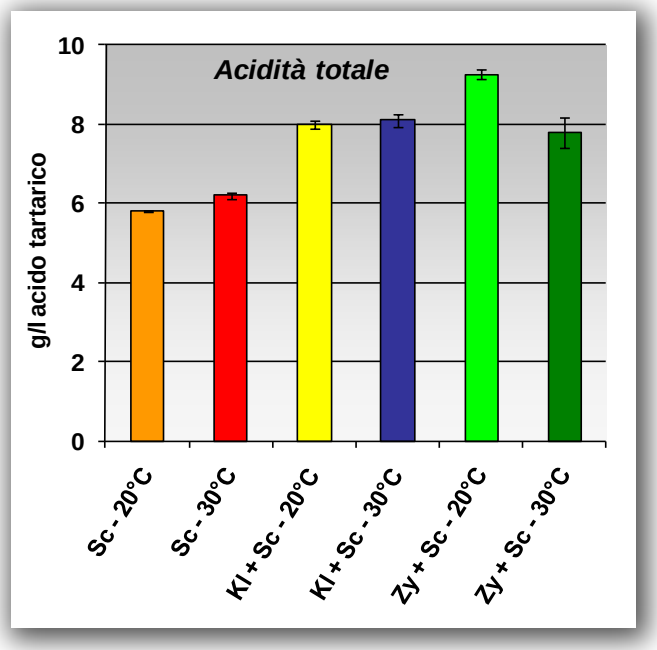


Figura 104: acidità totale (espressa come g/l di acido tartarico) negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

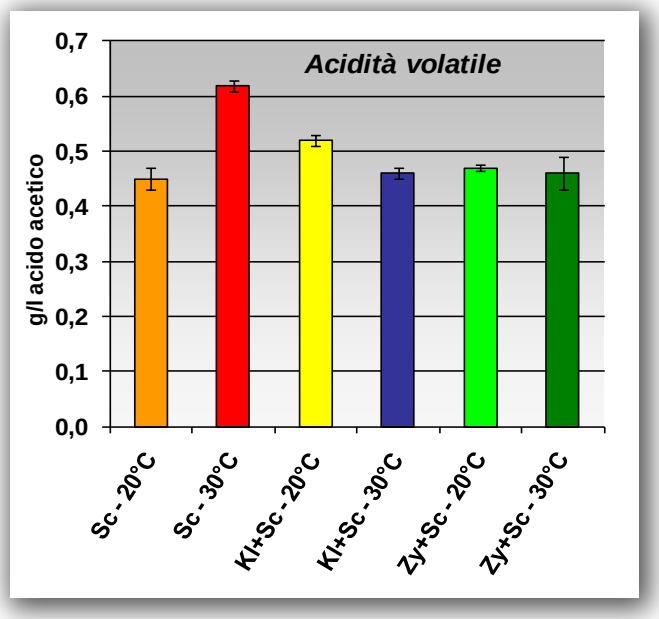


Figura 105: acidità volatile (espressa come g/l di acido acetico) negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

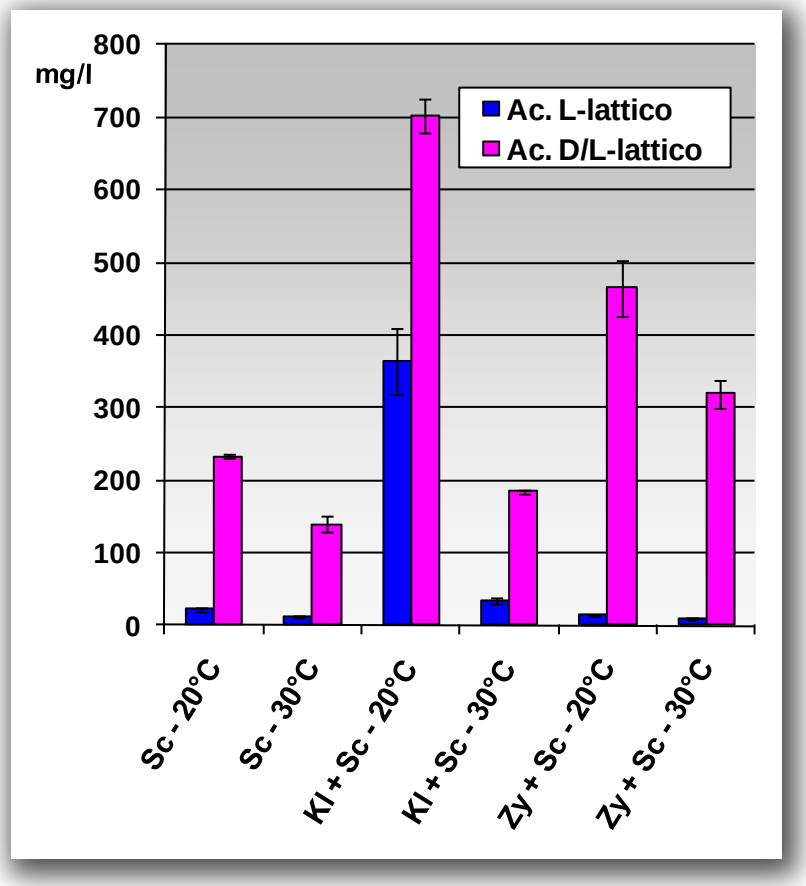


Figura 106: acido lattico negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

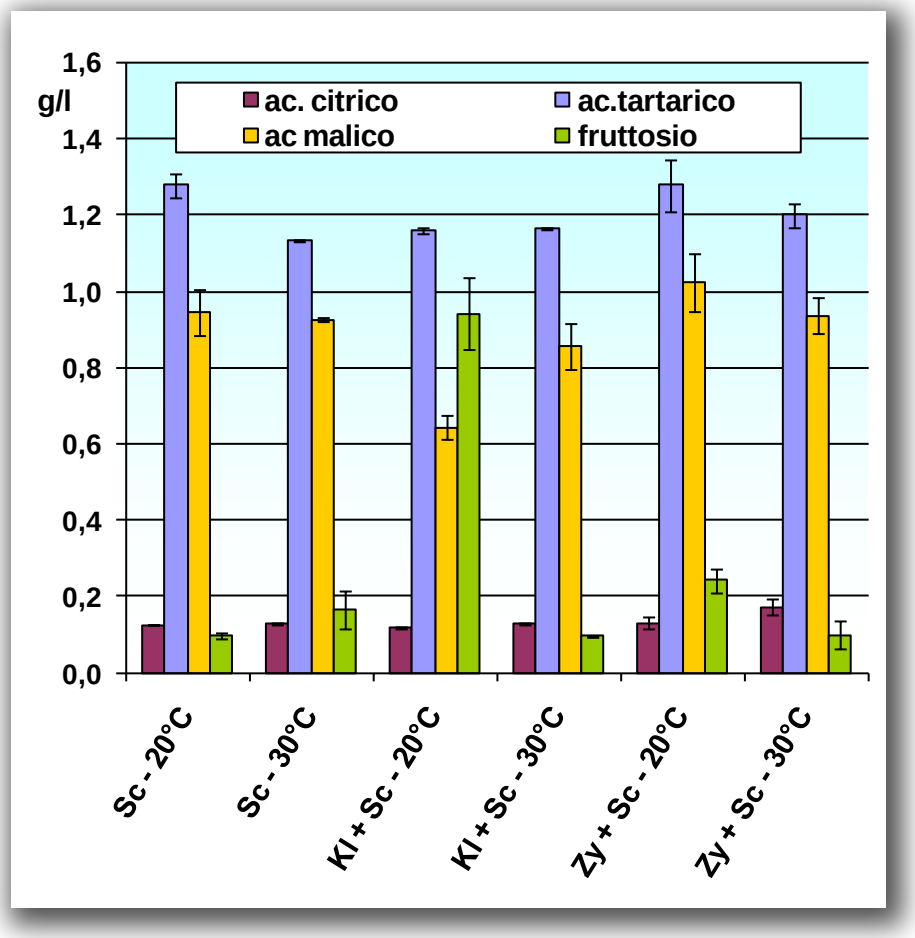


Figura 107: acidi organici e zuccheri residui negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

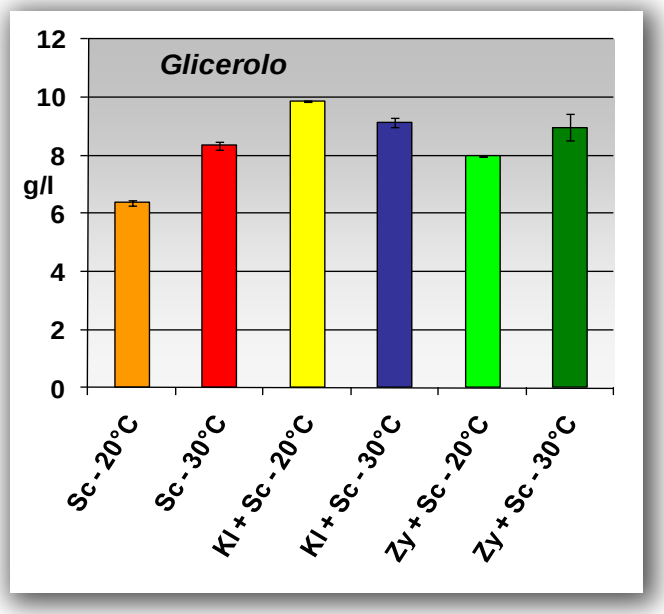


Figura 108: glicerolo negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

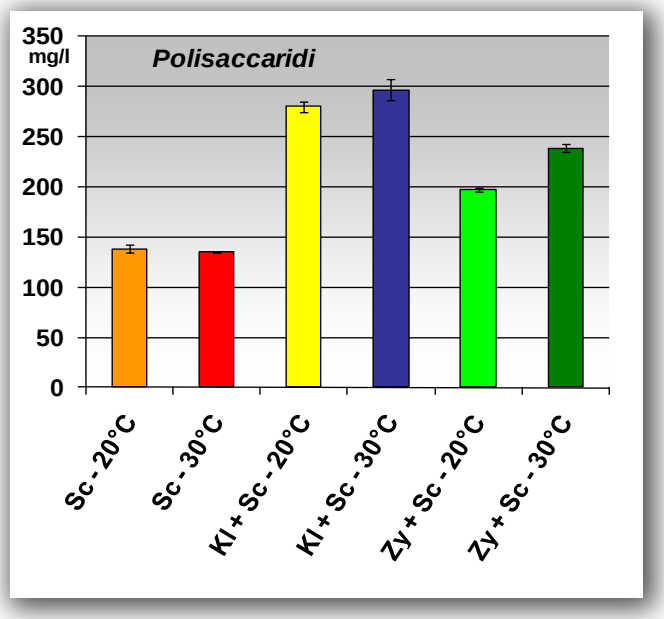


Figura 109: polisaccaridi (delta rispetto al valore iniziale nel mosto) negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°

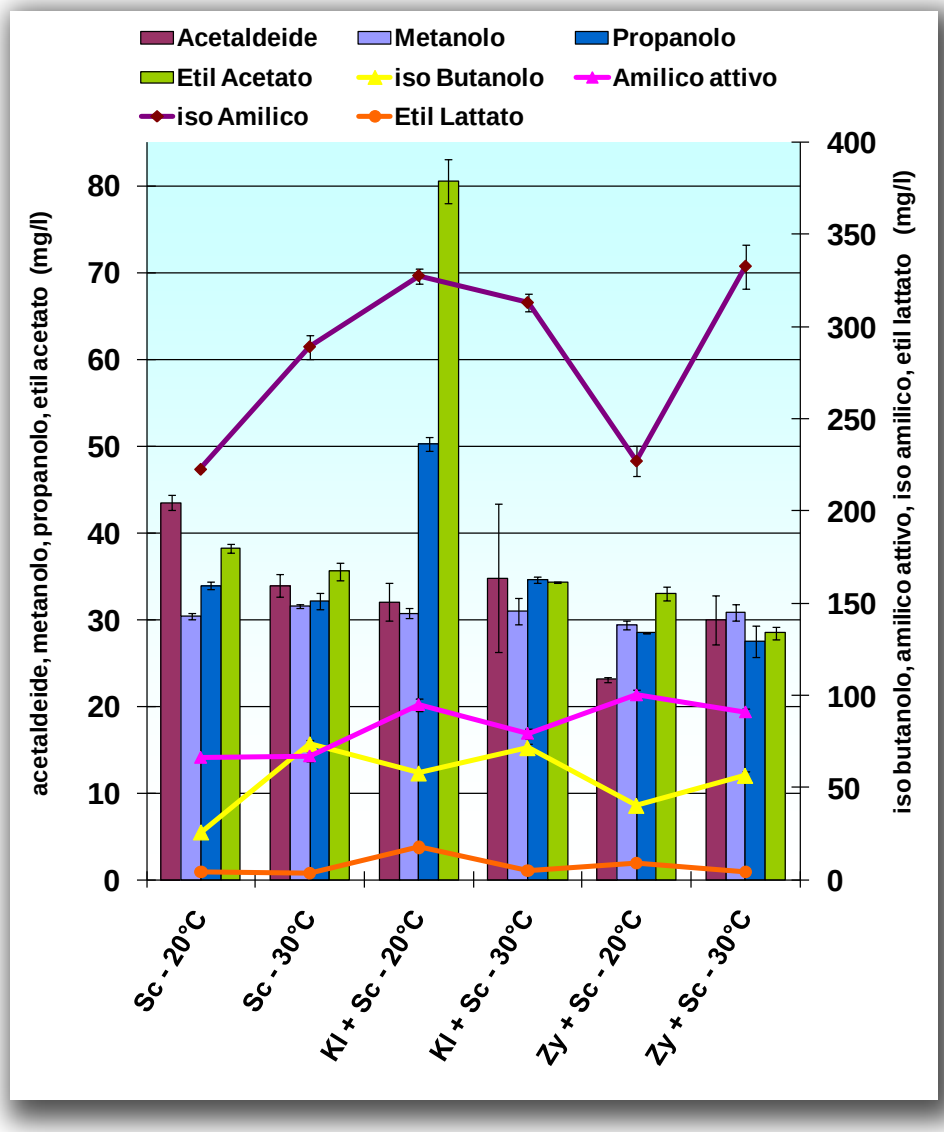


Figura 110: composti volatili negli svinati delle prove di fermentazione condotte a 20 °C e 30°C

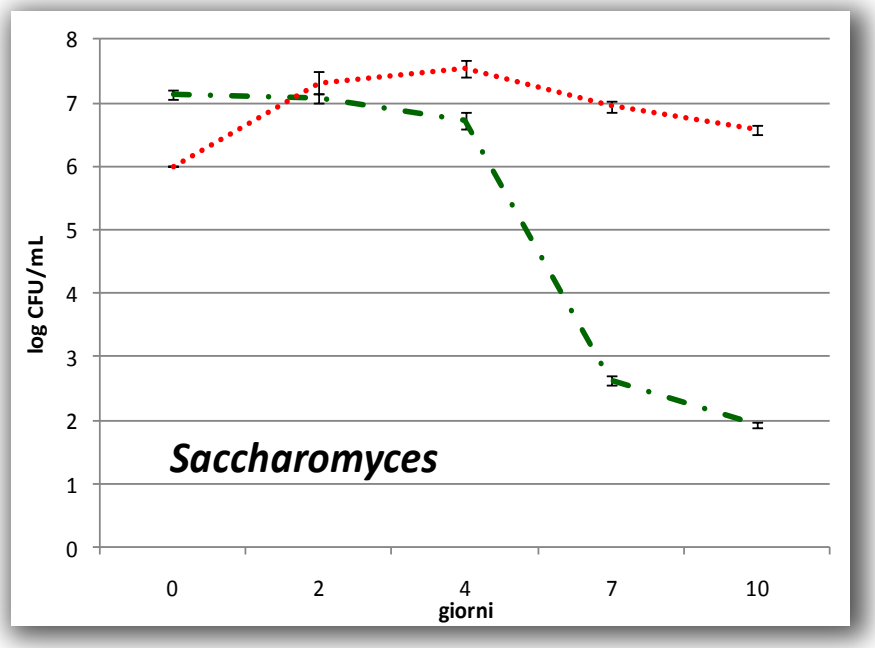


Figura 111: cinetica di crescita di S.cerevisiae (·····) e dei lieviti non-Saccharomyces indigeni (- - - -) durante la fermentazione nelle prove inoculate con solo S. cerevisiae

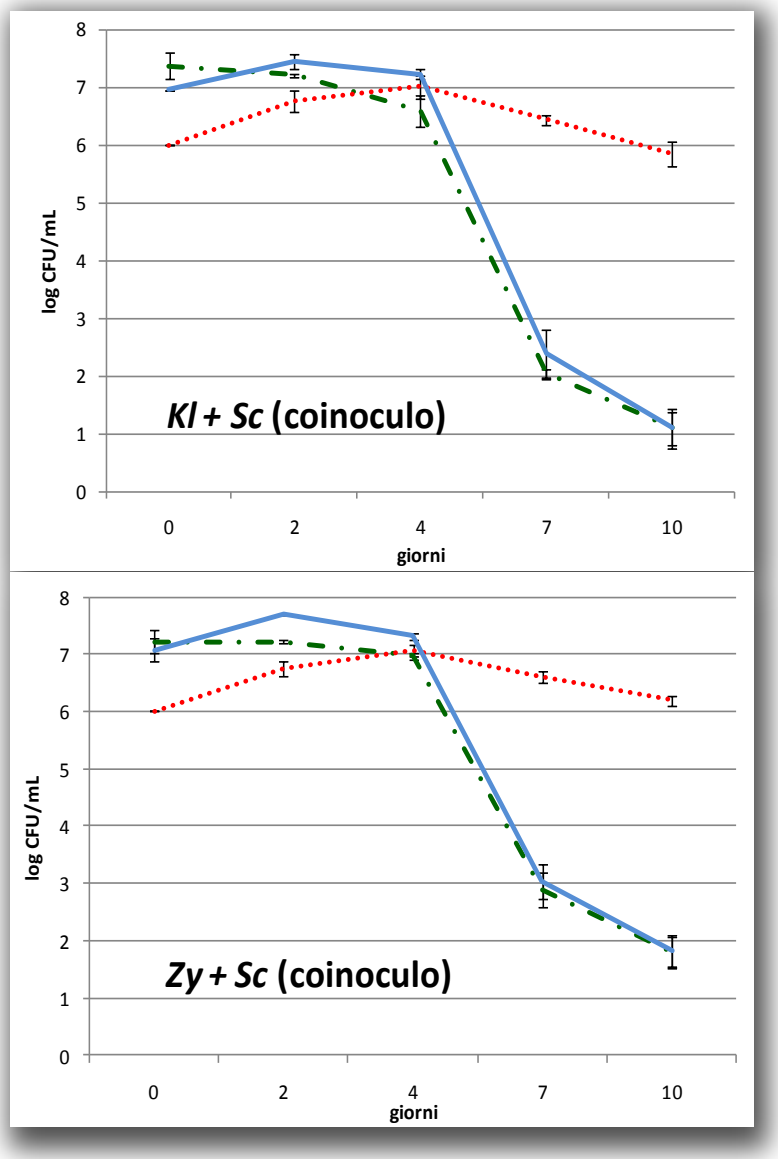


Figura 112: cinetica di crescita di S. cerevisiae (……), dei lieviti non-Saccharomyces inoculati (—) e dei lieviti non-Saccharomyces indigeni (– – – –) durante la fermentazione nelle prove coinoculate con K.thermotolerans/S.cerevisiae e Z. florentinus/S.cerevisiae

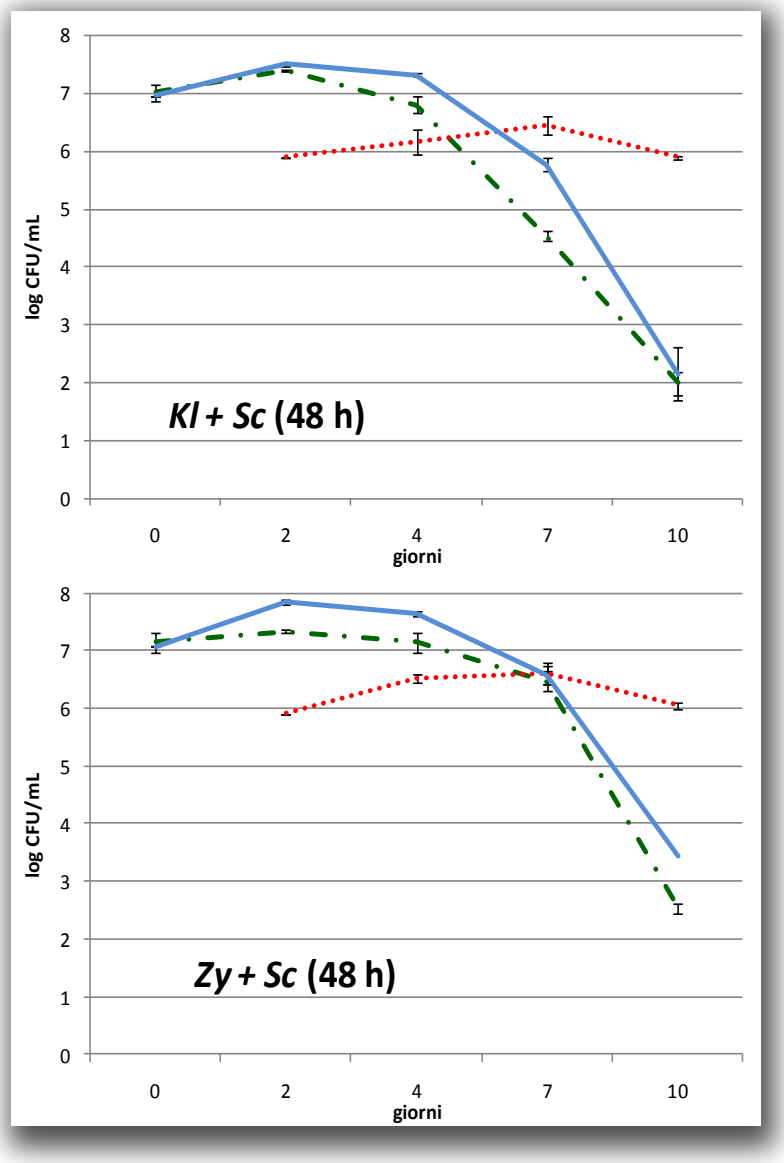


Figura 113: cinetica di crescita di S. cerevisiae (……), dei lieviti non-Saccharomyces inoculati (—) e dei lieviti non-Saccharomyces indigeni (– – – –) durante la fermentazione nelle prove inoculate con K. thermotolerans/S.cerevisiae e Z. florentinus/S.cerevisiae, in modalità sequenziale

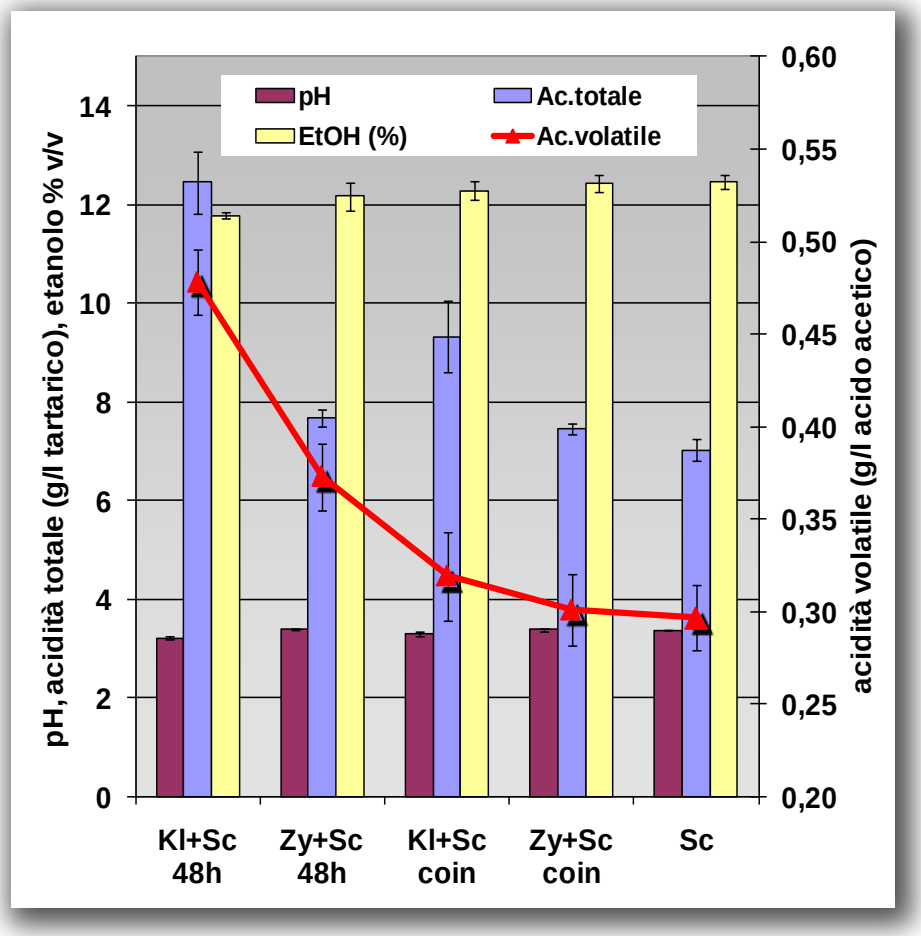


Figura 114: pH, acidità totale e volatile ed etanolo negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

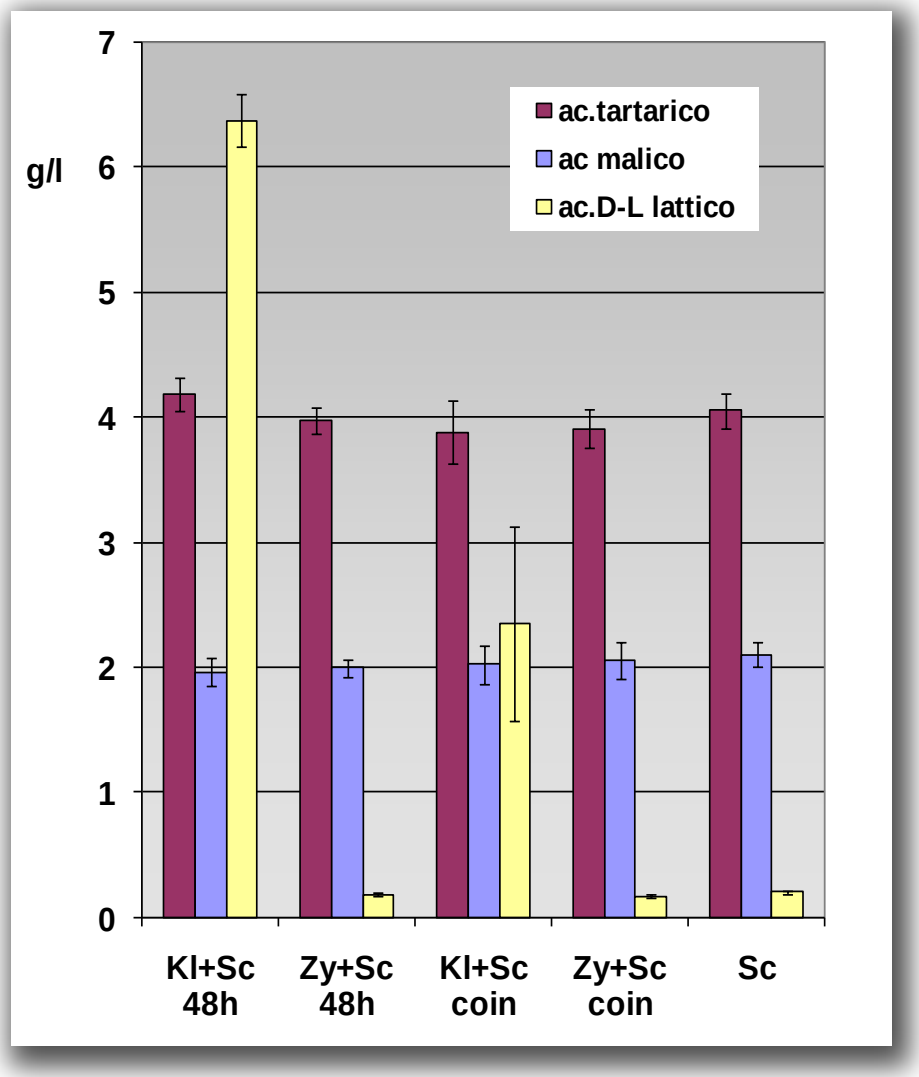


Figura 115: acidi organici negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

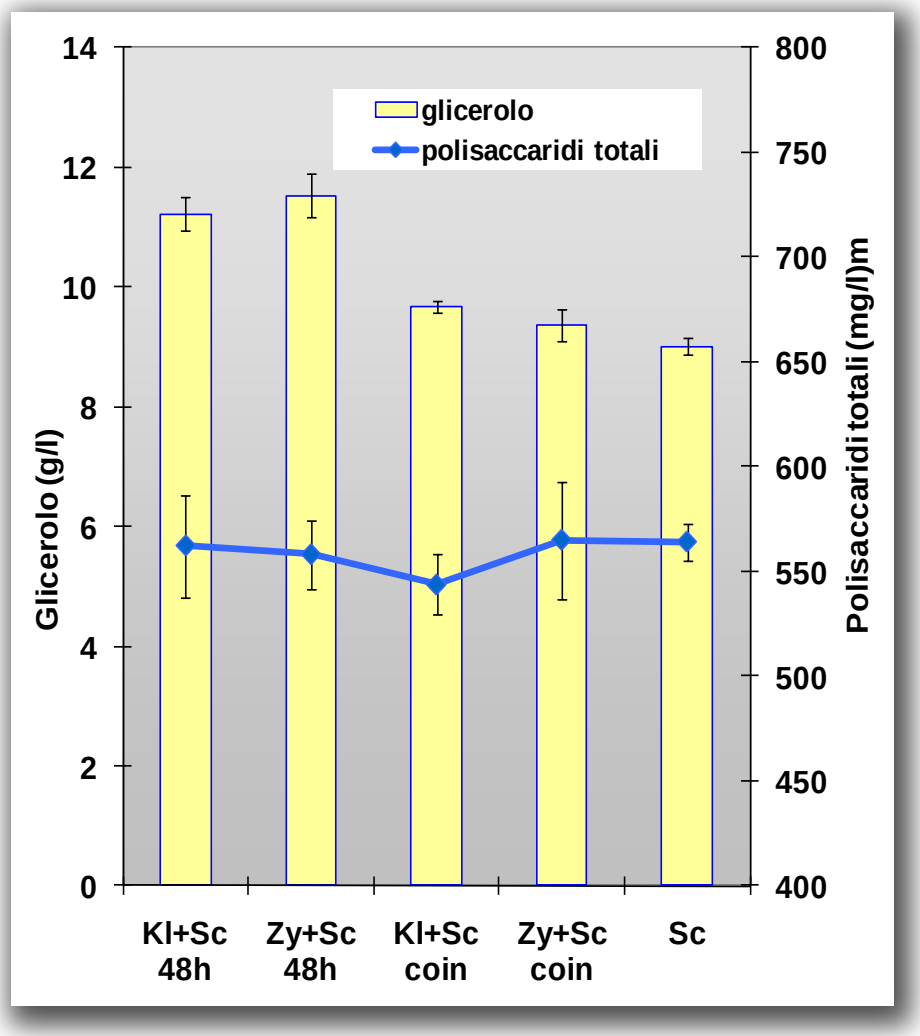


Figura 116: glicerolo e polisaccaridi totali negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

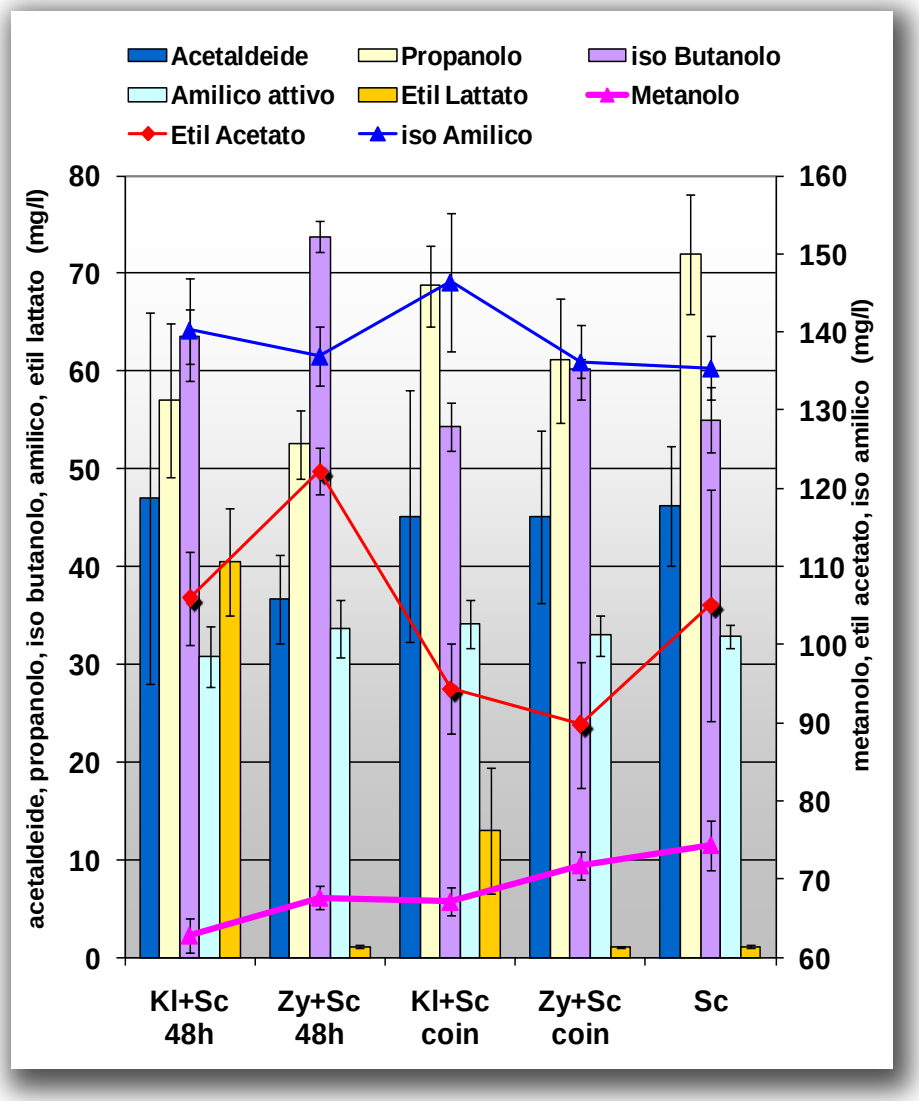


Figura 117: composti volatili negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

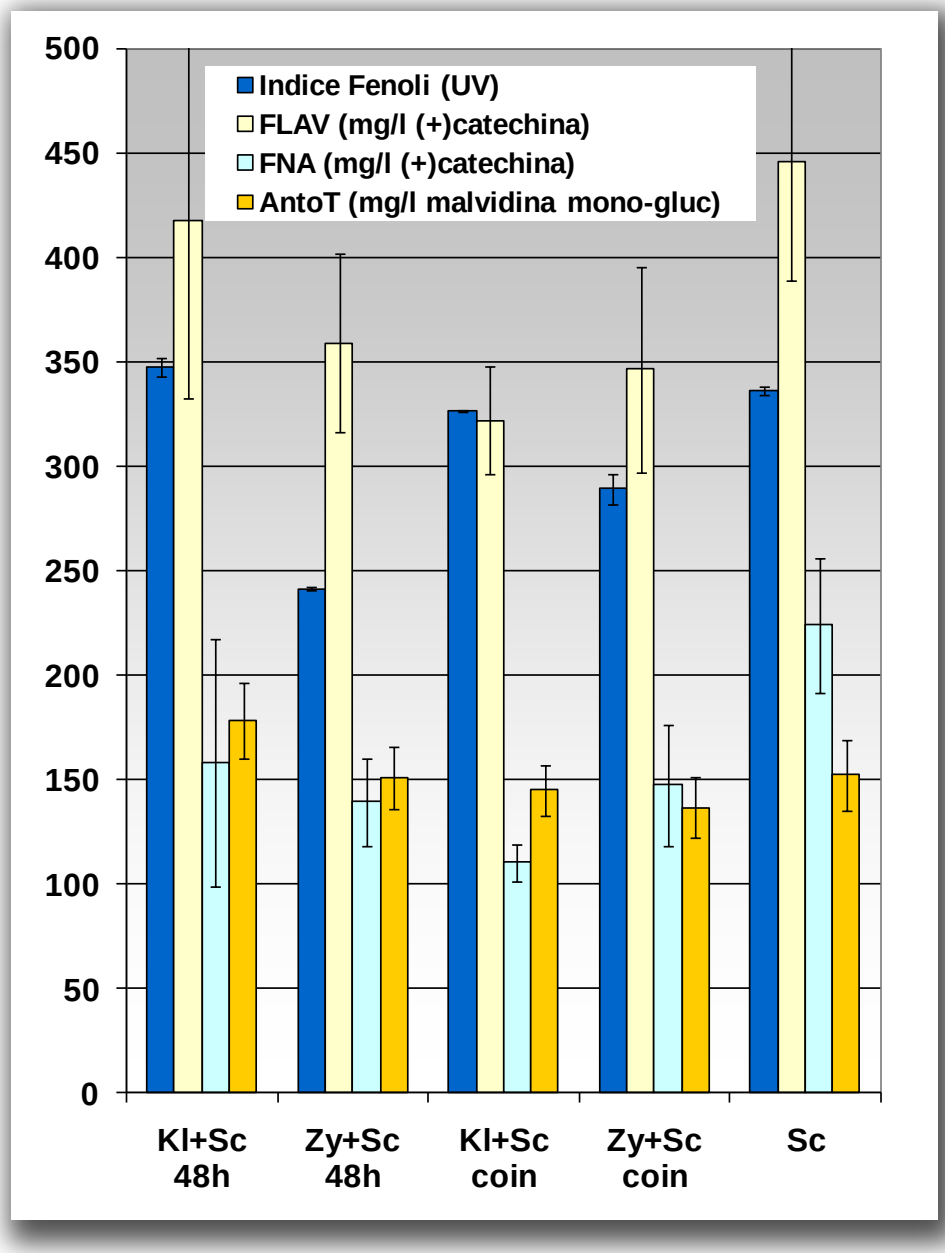


Figura 118 : indice di fenoli totali e altri parametri fenolici negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

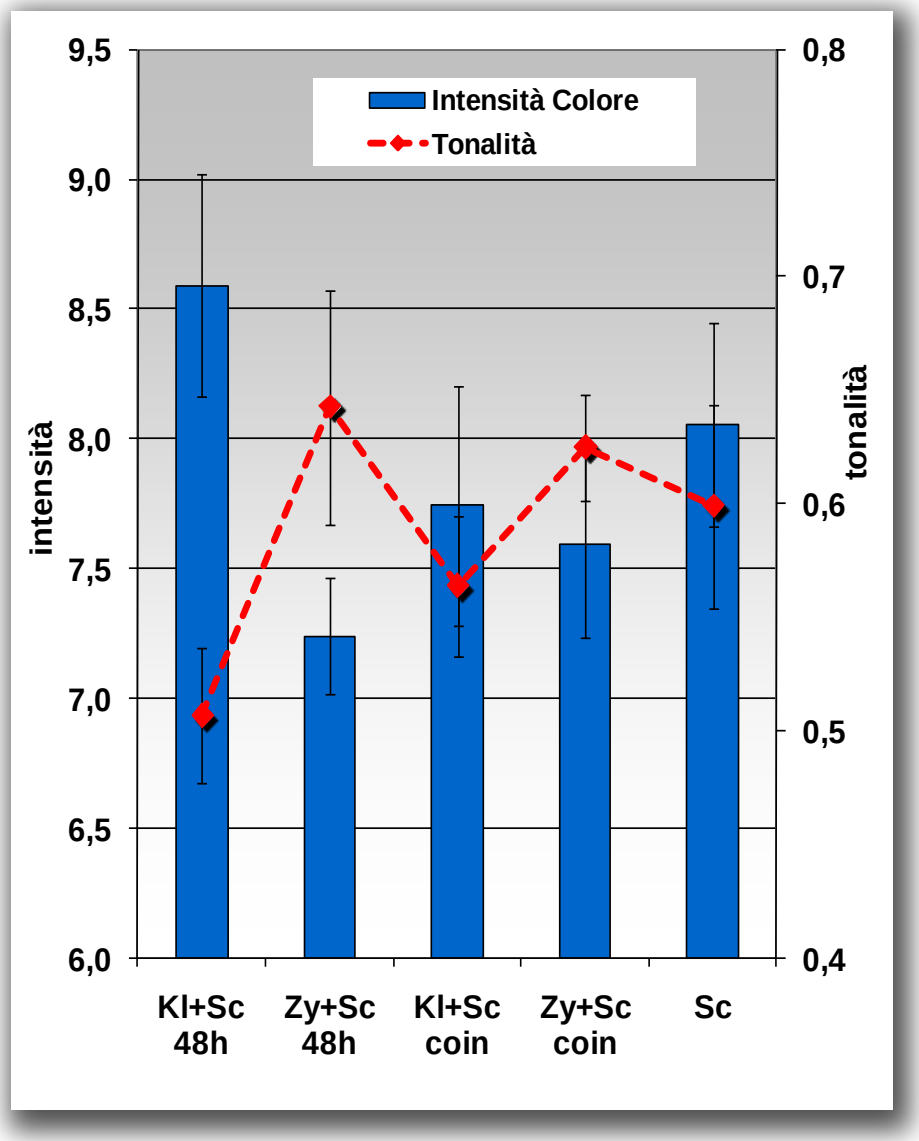


Figura 119: indici di colore negli svinati delle prove di vinificazione su scala semi-industriale

5. Conclusioni

Nella presente ricerca è stata valutata la possibilità di utilizzare i lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario in combinazione con colture starter di *S. cerevisiae* per l'allestimento di fermentazioni miste. L'aggiunta di lieviti non-*Saccharomyces* nella preparazione degli starter di vinificazione può consentire non solo il controllo microbiologico del processo ma anche l'ottenimento di particolari profili analitici e sensoriali dei vini.

In tale contesto, abbiamo inizialmente reperito e classificato i ceppi di non-*Saccharomyces* che sono stati quindi sottoposti ad uno screening iniziale per selezionare, tra i cento ceppi saggiati, quelli più interessanti dal punto di vista enologico. Analizzando le attitudini enologiche e alcuni caratteri utili ai fini fermentativi, sono stati scelti due ceppi di lievito per ognuno dei generi valutati, ad eccezione dei generi *Schizosaccharomyces* e *Metschnikowia* per i quali ne è stata selezionata solo una specie. Le analisi condotte hanno messo in evidenza un'ampia variabilità intra ed interspecifica per i caratteri enologici presi in esame. Questo ci ha consentito di scegliere i ceppi più interessanti con caratteristiche utili a migliorare e caratterizzare i vini.

La seconda fase è stata quella di verificare il comportamento fermentativo delle 16 colture non-*Saccharomyces* prescelte, in microfermentazioni condotte in coltura mista. Mentre la coltura non-saccaromicetica è stata inoculata alla concentrazione fissa di 10^7 cell/ml, il ceppo starter di *S. cerevisiae* è stato saggiato a tre livelli di inoculo (10^3; 10^5; 10^7 cell/ml) per ottenere rapporti tali da mimare le

fermentazioni in coinoculo e sequenziali. Da questa seconda serie di prove sono stati ottenuti utili informazioni sulla cinetica di crescita e attività fermentativa, corroborate dai dati analitici dei fermentati. Questi risultati ci hanno ulteriormente permesso di selezionare sette ceppi appartenenti a generi differenti. Abbiamo escluso dalla selezione il ceppo appartenente al genere *Schizosaccharomyces* che, pur presentando interessanti caratteristiche enologiche (in particolare un'elevata produzione di polisaccaridi), ha impartito in coltura mista al fermentato finale una serie di caratteri negativi.

I ceppi selezionati sono stati quindi valutati in fermentazioni miste in cantina, in fermentini da 100 L.

Le fermentazioni, sia su scala di laboratorio sia pilota, si sono svolte regolarmente senza arresti di fermentazione e le analisi dei relativi fermentati non hanno evidenziato la presenza di composti con possibile impatto negativo ad un livello tale da superare la soglia di percezione sensoriale (es: etil acetato per *Hanseniaspora*). Al contrario, abbiamo individuato per ogni associazione non-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae* alcuni caratteri enologici interessanti. In particolare, in coltura mista, in funzione anche dei diversi rapporti di inoculo, sono state osservate per i diversi ceppi di lievito, le seguenti peculiarità:

- riduzione della concentrazione di etanolo finale (*Saccharomycodes*)
- riduzione dell'acidità volatile (*Torulaspora*)
- incremento di acidità totale (*Kluyveromyces*)
- incremento di polisaccaridi nei fermentati (vari generi)
- incremento di esteri e composti volatili (isoamil acetato, 2-fenil etanolo, fenil etil acetato) nei fermentati (vari generi).

Anche la competitività (intesa come presenza e persistenza durante il processo fermentativo) dei lieviti non-*Saccharomyces* è risultata differente tra i diversi ceppi di lievito ed è stato un altro parametro tenuto in considerazione per la scelta dei ceppi da utilizzare nelle successive prove.

In base a questa serie di considerazioni sono stati scelti per le indagini successive due ceppi appartenenti alle specie *K. thermotolerans* (101) e *Z. florentinus* (42).

La prima specie è stata scelta per l'ottima competitività in coltura mista, la riduzione dell'acidità volatile, la capacità acidificante (già nota in letteratura), l'incremento di glicerolo, polisaccaridi anche in coltura mista e di composti volatili come il 2-fenil etanolo.

La coltura di *Z. florentinus* oltre alla buona competitività con lo starter di *S. cerevisiae* ha mostrato bassa produzione di acidità volatile (anche rispetto a *Saccharomyces* in coltura pura) e incrementi nei relativi fermentati di polisaccaridi e composti volatili (2-fenil etanolo e fenil etil acetato).

Anche i ceppi di lievito appartenenti alle altre specie esaminate hanno comunque mostrato interessanti caratteri come:

- la riduzione dell'acidità volatile e la produzione di composti volatili per i ceppi di *T. delbrueckii*
- la produzione di composti volatili e l'attività esterasica e beta-glucosidasica (che andrebbe ulteriormente valutata in substrati dove siano presenti precursori dei composti aromatici) per il ceppo di *M. pulcherrima*.

Anche le colture appartenenti ai generi *Pichia* e *Hanseniaspora* (in particolare la specie *H. osmophila*) hanno mostrato in fermentazioni miste la capacità di interagire positivamente con la coltura di *S. cerevisiae,* migliorando il profilo dei prodotti di fermentazione

analizzati e che meritano quindi ulteriori approfondimenti in futuro.
Nel prosieguo delle indagini abbiamo quindi focalizzato l'attenzione sui due ceppi precedentemente indicati, *K thermotolerans* (101) e *Z. florentinus* (42). Su tali ceppi sono in corso metodiche di individuazione e di messa a punto del sistema di monitoraggio specie-specifico per il rilevamento del ceppo inoculato in fermentazione mediante Real Time PCR (RT-PCR) utilizzando primer specifici.
Parallelamente sono stati valutati i diversi tempi di inoculo (coinoculo e sequenziale a 24 e 48h).
In coltura mista il ceppo di *Z. florentinus* ha confermato la sua buona competitività, senza comunque interferire sullo sviluppo della coltura starter saccaromicetica. In tali prove ha inoltre confermato la riduzione dell'acidità volatile e dell'alcol isoamilico rispetto alla fermentazione condotta con il ceppo di *S. cerevisiae* e incrementi del 2-fenil etanolo e fenil etil acetato. Inoltre è stato rilevato un minor consumo di azoto assimilabile, carattere che potrebbe rilevarsi interessante in condizioni di carenza in particolare di aminoacidi assimilabili nel mosto. Anche il ceppo 101 di *K. thermotolerans* ha confermato un'alta competitività con il ceppo starter di *S. cerevisiae* influenzandone negativamente lo sviluppo, soprattutto nelle fermentazioni sequenziali. Nelle fermentazioni miste il ceppo di *Kluyveromyces* ha prodotto rilevanti quantitativi di acido L-lattico. Anche in queste prove è stata confermata la sua capacità di incrementare il livello di polisaccaridi e glicerolo e di produrre bassi livelli di acidità volatile.
Le prove in fermentatore da laboratorio sono state condotte con mosto di Sangiovese e Cabernet ad una concentrazione zuccherina del 25,4% per valutare l'effetto della temperatura (20°C e 30°C) e del substrato. In tali condizioni, sono stati confermati sia la cinetica di

crescita dei diversi ceppi sia i profili analitici dei fermentati condotti in coltura mista rispetto alle prove di controllo. Inoltre, in tali prove è stato rilevato un effetto temperatura-dipendente nei riguardi della produzione di acido L-lattico da parte di *K. thermotolerans*. Infatti, in coinoculo tale produzione è risultata evidente solo a 20°C. In tali condizioni si è inoltre osservata una differente utilizzazione degli zuccheri nelle prove in coinoculo con *Z. florentinus*. Tale lievito fruttosofilo interagisce positivamente con il ceppo di *S. cerevisiae* glucosofilo con il risultato di una utilizzazione più rapida degli zuccheri.
Infine, nelle prove di vinificazione a livello semi-industriale sono stati confermati i livelli cellulari e le caratteristiche enologiche dei due ceppi di non-*Saccharomyces* in fermentazioni miste, anche in presenza di una rilevante microflora spontanea, già osservata nelle precedenti microvinificazioni di cantina su scala pilota (mosti non pastorizzati).
Questi ultimi risultati hanno confermato quelli osservati nelle precedenti prove.
Le evidenze sperimentali fin qui ottenute sono di grande importanza in vista dell'utilizzazione di colture selezionate di non-*Saccharomyces* in vinificazioni multi starter controllate per un miglioramento della complessità e qualità dei vini.

L'analisi sensoriale che verrà effettuata nei vini (dopo fermentazione malolattica e stabilizzazione) ottenuti nelle prove sperimentali su scala semi-industriale, ci fornirà ulteriori indicazioni sul possibile impiego di tali lieviti selezionati.

6. Pubblicazioni prodotte

1. Domizio P., Lencioni L., Romani C., Ciani M., Comitini F., Landolfo S., Mannazzu I. (2009) "Miglioramento della qualità dei vini mediante l'impiego di inoculi misti" Atti Convegno Enoforum "Innovazione ed eccellenza" Piacenza 21-23 aprile 2009, p. 104

2. Domizio P., Romani C., Comitini F., Gobbi M., Ciani M., Lencioni L., Mannazzu I. (2009) "Characterization of potential spoilage wine yeasts and their possible use in winemaking process" Atti "II International Symposium Microsafetywine: wine microbiology and safety: from the vineyard to the bottle," Martina Franca (Taranto), 19-20 November 2009, p. 83

3. Domizio P., Romani C., Comitini F., Gobbi M., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2010) "Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*" Ann. Microbiol. 61:137-144

4. Domizio P., Ciani M., Mannazzu I., Romani C., Gobbi M., Comitini F., Lencioni L. (2010) "Alla ricerca della complessità perduta" VQ numero cinque - giugno 2010 pp. 36-39

5. Romani C., Domizio P., Lencioni L., Gobbi M., Comitini F., Ciani M., Mannazzu I. (2010) "Polysaccharides and glycerol production by non-*Saccharomyces* wine yeasts" Atti: "Third International Symposium MACROWINE 2010 on macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine". Torino 16-18 june 2010, p. 86

6. Gobbi M., Comitini F., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. "Non-*Saccharomyces* yeasts in controlled mixed culture fermentation in winemaking : the role of metabolic interactions" Atti IBS 2010 "14th International Biotechnology Symposium and Exhibition: Biotechnology for the Sustainability of Human Society", Rimini 14-18 settembre 2010

7. Romani C., Domizio P., Lencioni L., Gobbi M., Comitini F., Ciani M., Mannazzu I. "Polysaccharides and glycerol production by non-*Saccharomyce*s wine yeasts in mixed fermentation". Proceeding of "Third International Symposium MACROWINE 2010 on macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine. Torino 16-18 June 2010". Accettato per la stampa su Quad Vitic Enol Univ TORINO

8. Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011) "Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*". Food Mycrobiology doi:10.1016/j.fm.2010.12.001.

9. Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M. Outlining a future for non-*Saccharomyces yeasts:* selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for must fermentation. Inviato per la stampa su: International Journal of Food Microbiology