

"Controllo della evoluzione delle popolazioni microbiche con attività di monitoraggio in linea"

Linea B.4.1

Granchi L., Bronzini M., Lupi M., Collina L.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie Sezione di Microbiologia Piazzale delle Cascine 24, 50144 Firenze e-mail: lisa.granchi@unifi.it



06 dicembre 2010

Granchi *et al.* Linea B4.1

06/10/2010

Indice generale

Capitolo 1. Descrizione del progetto	
1.1 Stato dell'arte	4
1.2 Obiettivo della ricerca	6
Capitolo 2. Articolazione delle attività e metodiche op	erative
ed analitiche	7
2.1 Induzione della fermentazione alcolica	7
2.2 Induzione della fermentazione malolattica	7
2.3 Campionamenti del mosto-vino durante la fermentazi	one10
2.4 Analisi microbiologiche	12
2.5 Analisi chimiche	
2.6 Analisi statistica dei dati	14
Capitolo 3. Risultati	15
3.1 Linea di ricerca B1.1 (anno 2008)	16
3.1.1 Composizione chimica di uve e mosti	
3.1.2 Valutazione dell'inoculo	
3.1.3 Valutazione degli andamenti fermentativi	18
3.1.4 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione	
e dopo la svinatura	38
3.1.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla	0.0
svinatura	
3.1.6 Analisi statistica dei dati	
3.1.7 Conclusioni del I anno di attività	38
3.2 Linea di ricerca B1.1 (anno 2009)	30
3.2.1 Composizione chimica dei mosti	
3.2.2. Valutazione dell'inoculo	
3.2.3 Valutazione dell'inoculo	
3.2.4 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione	
e dopo la svinatura	38
3.2.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla	
svinatura	38
3.2.6 Analisi statistica dei dati	
3.2.7 Conclusioni del II anno di attività	38

3.3 Linea di ricerca B1.2 (anno 2008)	63
3.3.1 Composizione chimica dei mosti	16
3.3.2 Valutazione dell'inoculo	18
3.3.3 Valutazione degli andamenti fermentativi	
3.3.4 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione e dopo	
la svinatura	38
3.3.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura	···38
3.3.6 Analisi statistica dei dati	38
3.3.7 Conclusioni del I anno di attività	38
3.4 Linea di ricerca B1.2 (anno 2009)	63
3.2.1 Composizione chimica dei mosti	16
3.2.2. Valutazione dell'inoculo	18
3.2.3 Valutazione degli andamenti fermentativi	18
3.2.4 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione e dopo	
la svinatura3	8
3.2.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla	
svinatura38	
3.2.6 Analisi statistica dei dati	
3.2.7 Conclusioni del II anno di attività38	
3.5 Linea di ricerca B.4 (anno 2008)	63
3.5.1 Composizione chimica dei mosti16	
3.5.2 Valutazione dei profili termici delle diverse	
tesi16	
3.5.3 Valutazione dell'inoculo	
3.5.4 Valutazione degli andamenti fermentativi	
3.5.5 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione e dopo l	a
svinatura38	
3.5.6 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla	
svinatura	
3.5.7 Analisi statistica dei dati	
3.5.8 Conclusioni del I anno di attività38	
3.6 Linea di ricerca B.4 (anno 2009)	63
3.6.1 Composizione chimica dei mosti16	
3.6.2 Valutazione dei profili termici delle diverse tesi16	
3.6.3 Valutazione dell'inoculo18	
3.6.4 Valutazione degli andamenti fermentativi	

3.6.5 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione e dopo la
svinatura38
3.6.6 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla
svinatura38
3.6.7 Analisi statistica dei dati
3.6.8 Conclusioni del II anno di attività38
3.7 Linea di ricerca B.4 (anno 2010)63
3.7.1 Composizione chimica delle uve e dei mosti16
3.7.2 Valutazione dei profili termici delle diverse tesi16
3.7.3 Valutazione della flora indigena della cantina18
3.7.4 Valutazione dell'inoculo
3.7.5 Valutazione degli andamenti fermentativi18
3.7.6 Popolazioni dei lieviti durante la fermentazione e
dopo la svinatura38
3.7.7 Valutazione della dominanza del ceppo <i>starter</i>
inoculato38
3.7.8 Identificazione e Quantificazione speciologica dei lieviti
Non-Saccharomyces38
3.7.9 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla
svinatura38
3.7.10 Popolazioni dei lieviti e dei batteri lattici
al momento dell'inoculo della fermentazione malolattica38
3.7.11 Analisi Statistica dei dati relativi alle tesi
condotte a 20°C38
3.7.12 Analisi Statistica dei dati relativi alle tesi
condotte a 30°C38
3.7.13 Conclusioni del III anno di attività
Bibliografia

Capitolo 1. Descrizione del progetto 1.1. Stato dell'arte

Nel processo di vinificazione la fermentazione alcolica è una fase chiave ed è caratterizzata dallo sviluppo e dall'attività metabolica di diverse specie di lieviti che, oltre all'etanolo, formano composti secondari che concorrono alla definizione della qualità organolettica e salutistica del vino.

Tali lieviti che derivano principalmente dalla superficie dell'uva, dall'ambiente di cantina e dalle colture *starter* che vengono inoculate nel mosto, sono fortemente influenzati, per tipologia, entità numerica e persistenza, da numerosi fattori, fisici, chimici e biotici.

Sulle uve generalmente predominano lieviti appartenenti al genere Kloeckera o Hanseniaspora, mentre altri generi quali Metschnikowia, Candida e Pichia sono presenti in minor quantità e con diversa frequenza. Saccharomyces cerevisiae, la principale specie di lievito responsabile della fermentazione vinaria, è assai rara sulla superficie di uve sane ed integre. Tuttavia, l'entità della popolazione totale di lieviti così come le proporzioni delle singole specie presenti sulle uve sono variabili in funzione della varietà, del grado di maturazione, dello stato sanitario dell'uva, e di numerosi altri fattori che includono fattori climatici (temperatura, precipitazioni, umidità ed altri eventi), pratiche colturali (fertilizzazione, irrigazione, trattamenti fitosanitari, gestione della chioma) e tecniche di raccolta (manuale, meccanica) (Fleet, 1990, Pretorius, 2000). Di conseguenza sulle uve si possono trovare densità cellulari che variano da poche centinaia a 10⁵ cellule mL⁻¹.

Nell'ambiente di cantina, la presenza e lo sviluppo di determinate specie di lievito sono strettamente dipendenti dalla natura della superficie dei vasi vinari e dalle operazioni di sanitizzazione. In genere, contrariamente a quanto riscontrato in vigneto, in cantina, ed in particolare all'interno dei vasi vinari e sulle varie attrezzature, S.

cerevisiae è la specie prevalente costituendo la cosiddetta microflora "residente" che deriva sia dalle uve che dalle eventuali colture *starter* impiegate nel tempo durante le varie vinificazioni (Martini, 1993,). Inoltre, possono essere presenti lieviti appartenenti ai generi *Candida*, *Dekkera*, *Pichia*, *Brettanomyces* ed altri ancora.

Pertanto, la tipologia e l'entità delle specie di lieviti presenti nel mosto sono influenzate indirettamente dai molteplici fattori sopra elencati e, più direttamente, dalle diverse pratiche enologiche eseguite quali, l'aggiunta di anidride solforosa o di altri additivi, i trattamenti di prefermentazione (macerazione a freddo o a caldo) la temperatura e il grado di ossigenazione e soprattutto l'aggiunta di colture *starter* della specie *S. cerevisiae*, pratica molto diffusa per garantire un più rapido avvio e un maggiore controllo del processo fermentativo.

Quindi, in mosti freschi i lieviti sono variabili per numero, da poche centinaia ad alcuni milioni per millilitro. Malgrado questa variabilità nella composizione della popolazione iniziale di lieviti, i numerosi studi sulla ecologia della vinificazione sono concordi nel tracciare un comune quadro microbiologico qualitativo che vede nelle prime fasi della fermentazione, sia spontanea che indotta, la presenza di lieviti non-Saccharomyces (Kloeckera, Hanseniaspora, Metschnikowia, Candida etc.) caratterizzati da una bassa attività fermentativa e da una elevata sensibilità nei confronti dell'etanolo. Generalmente, proprio per queste caratteristiche, tali lieviti sono destinati, con il procedere della fermentazione alcolica, ad una fase di declino fino alla completa inibizione cellulare. Tuttavia, la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna specie di lievito dipendono dalle condizioni chimico-fisiche nutrizionali dell'ambiente "vino" così come dalle interazioni tra le singole specie diverse. E' stato infatti dimostrato che anche nelle fermentazioni inoculate, dove dovrebbe essere garantita la dominanza della specie S. cerevisiae all'inizio del processo fermentativo, i lieviti non-Saccharomyces possono raggiungere densità cellulari elevate (10⁶–10⁷ UFCmL⁻¹) e produrre, in seguito alla loro attività biochimica, composti secondari che possono influenzare positivamente o negativamente le caratteristiche organolettiche del prodotto finito (Mora et al., 1990; Lema et al., 1996; Granchi et al., 1998, Combina et al., 2005, Zott et al., 2008). In definitiva, da quanto esposto, appare evidente l'importanza di individuare e quantificare le singole specie di lievito presenti nelle varie fasi del processo di vinificazione, dal momento che la qualità sensoriale del vino è strettamente dipendente dalle loro proprietà metaboliche (Lambrechts e Pretorius, 2000; Howell et al., 2006; Fleet, 2008).

1.2. Obiettivo del progetto di ricerca

L'attività di ricerca è stata finalizzata ad evidenziare eventuali effetti di diverse pratiche enologiche sulla dinamica delle singole popolazioni di lievito durante il processo di vinificazione.

A tal fine è stato effettuato il monitoraggio delle popolazioni di lievito presenti nel corso di vinificazioni condotte, presso la cantina sperimentale del Consorzio Tuscania situata a Sambuca Val di Pesa (Firenze), secondo le diverse pratiche enologiche previste dalle seguenti linee di ricerca:

- a) <u>Linea B.1.1</u>: Effetti di diversi livelli di MOG¹ e ASM² sulla qualità del vino
- b) <u>Linea B1.2</u>: Effetti di diverse modalità di raccolta sulla qualità dell'uva
- c) <u>Linea B.4</u>: Massimizzazione del potenziale enologico attraverso diverse tecniche di vinificazione

¹ MOG = Materials Other than Grapes

² ASM = Acini a Scarsa Maturazione

Capitolo 2. Articolazione delle attività e metodiche operative ed analitiche

L'attività di monitoraggio è stata svolta in funzione delle linee di ricerca come segue:

Per ciascuna linea presa in esame, l'attività ha previsto le seguenti fasi operative:

- 1. Induzione della fermentazione alcolica
- 2. Induzione della fermentazione malolattica
- 3. Campionamenti del mosto-vino durante la fermentazione e dopo svinatura
- 4. Analisi microbiologiche
- 5. Analisi chimiche
- 6. Analisi statistica dei dati

2.1. Induzione della fermentazione alcolica

Tutte le vinificazioni sono state condotte in vasche in acciaio della capacità di 10 hL termocondizionate, munite singolarmente di un sistema di gestione automatica dei rimontaggi e di registrazione in linea del profilo termico.

Indipendentemente dalle diverse linee di ricerca, la fermentazione alcolica è stata indotta mediante inoculo di un lievito commerciale al fine di ridurre, per quanto possibile, il contributo delle popolazioni di lievito naturalmente presenti nei mosti con una certa variabilità speciologica e a diverse densità cellulari. Considerato che nella linea B.4 il programma di ricerca prevedeva trattamenti di macerazione prefermentativa a freddo e l'impiego di due diverse temperature di fermentazione (20° e 30°C), è stato scelto il lievito commerciale Lalvin EC-1118, in quanto capace di condurre il processo fermentativo in un ampio range di temperature e dotato di altre proprietà enologiche che ne permettono l'impiego in mosti con diverse caratteristiche chimico-fisiche, come risulta dalla seguente scheda tecnica.



MICROBIOLOGICAL AND OFNOLOGICAL PROPERTIES

Saccharomyces cerevisiae bayanus
Competitive factor
High alcohol tolerance up to 18%
Short lag phase
Fast fermentation rate in a wide pH
range
Wide range of temperatures for
fermentation including low
temperatures (Optimal between 15°C
to 25°C)

Low requirement in assimilable nitrogen
Low O₂ requirement (especially at low T°)
Low to average production of volatile acidity
Average SO₂ production
Low H₂S production
Low foam formation

Prima di procedere all'induzione della fermentazione alcolica, per ciascun anno, sono state determinate le cellule vitali per grammo di prodotto dei lotti del lievito da inoculare mediante conta al microscopio ad epifluorescenza e camera di Thoma secondo il protocollo riportato da Granchi *et al.*, 2006.

Per ciascuna fermentazione è stata quindi inoculata una dose pari a circa 30 ghL⁻¹ di lievito EC-1118 con aggiunta, durante la fase di reidratazione, del prodotto Go-Ferm (Lallemand). Nel 2008 e nel 2010 la reidratazione è stata effettuata secondo il protocollo riportato nella tabella 2.1.

Tabella 2.1 Programma di riattivazione del lievito starter

	FASI	CONDIZIONI
1	Aggiunta di acqua calda	Rapporto lievito/acqua 1:10
		Temperatura 35° <t<40°c< th=""></t<40°c<>
3	Aggiunta di Go-Ferm	35 (ghL ⁻¹)
4	Miscelazione	manuale
5	Aggiunta di lievito	30 (ghL ⁻¹) lentamente
6	Riposo	15 min
7	Miscelazione	manuale
8	Prelievo quantità da	Mediante cilindri e secchi graduati
	inoculare in ogni vasca*	

^{*} Al momento dell'inoculo ΔT_{max} =10°C tra lievito reidratato e mosto.

Per la vendemmia 2009, la reidratazione del lievito commerciale, anziché manualmente, è stata effettuata mediante la macchina Parsec "CellarMate" secondo il programma riportato nella tabella 2.2.

	FASI	CONDIZIONI
1	Aggiunta di acqua calda	Rapporto lievito/acqua 1:10
2	Termoregolazione	38 (°C), agitazione 300 g/m
3	Riduzione della velocità	50 g/m
4	Aggiunta di Go-Ferm	35 (g/hL)
5	Miscelazione con elica	5 min a 180 g/m
6	Riduzione della velocità	50 g/m
7	Aggiunta di lievito	28 (g/hL) lentamente
8	Riposo	15 min a 0 g/m
9	Miscelazione con elica	1 min. a 300 g/m
		4 min a 140 g/m
10	Prelievo quantità da	Tramite apertura valvola sul
	inoculare in ogni vasca *	fondo e secchi graduati

Tabella 2.2 Programma di riattivazione del lievito starter

Le vasche di ciascuna linea di ricerca sono state inoculate al termine dell'operazione di riempimento fatta eccezione per le vasche delle tesi "CRIO" della linea B4 che, essendo state riempite con uve sottoposte a crioestrazione avevano una temperatura inferiore o prossima a 0°C e che, pertanto, sono state inoculate il giorno successivo per permettere al mosto di raggiungere una temperatura di circa 15 °C.

2.2. Induzione della fermentazione malolattica

La fermentazione malolattica è stata indotta, per i vini delle annate 2009 e 2010, al termine della fermentazione alcolica dopo aver compiuto le operazioni di svinatura e travaso in tank di acciaio. L'induzione è stata attuata mediante co-inoculo di due ceppi di *Oenococcus oeni*

^{*} Al momento dell'inoculo ΔT_{max} =10°C tra lievito reidratato e mosto.

commerciali (Enartis-ML Silver MBR e Lalvin VP41 MBR) ad inoculo diretto. La quantità complessiva dell'inoculo è stata pari a 2 ghL⁻¹ di vino. La reidratazione dei prepararti commerciali è stata effettuata secondo il protocollo riportato nella tabella 2.3. Per verificare la vitalità dei batteri, dopo 24 ore dall'inoculo, sono stati prelevati campioni di vino dai diversi tank delle 3 repliche di ciascuna tesi.

CONDIZIONI FASI Rapporto batteri/acqua 1:20 Aggiunta di acqua calda Temperatura 25°C $20 \, (ghL^{-1})$ Aggiunta di Nutrienti Miscelazione Con mixer 5 Aggiunta dei batteri 2 (ghL⁻¹) lentamente Riposo 15 min Miscelazione Con mixer Prelievo quantità da Mediante cilindri graduati inoculare in tank da 100L Mediante gorgogliamento di azoto Rimontaggio

Tabella 2.3 Programma di riattivazione dei batteri lattici

2.3. Campionamenti del mosto-vino durante la fermentazione

Secondo quanto previsto dalle linee di ricerca B1.1, B1.2 e B.4 sono state allestite le seguenti vinificazioni sperimentali:

Linea B1.1: 27 vinificazioni ottenute da 9 tesi = (MOG³: 0%-50%-100%) X (ASM⁴: 0%-50%-100%) replicate in 3 blocchi (R1-R2-R3)

Linea B1.2: 9 vinificazioni ottenute da 3 tesi = (Raccolta Manuale, Raccolta meccanica con precernita, Raccolta Meccanica) replicate in 3 blocchi (R1-R2-R3)

³ MOG = Materials Other than Grapes

⁴ ASM = Acini a Scarsa Maturazione

Linea B4: 36 vinificazioni ottenute da 12 tesi = (Nessun trattamento = TEST, macerazione prefermentativa a freddo = MPF, Crioestrazione = CRIO) X (due temperature di fermentazione a 20° e 30°C) X (senza salasso = NoS e con salasso del 20% di mosto = S) replicate in 3 blocchi (R1-R2-R3).

Per ciascuna vinificazione, dopo l'usuale operazione di rimontaggio meccanico, sono stati prelevati campioni di mosto-vino utilizzando contenitori sterili da 50 mL, previa sterilizzazione mediante flambatura dell'assaggiavino di ogni vasca e dopo aver lasciato scorrere circa mezzo litro di liquido in modo da ottenere un campione omogeneo.

Tutti i campioni sono stati mantenuti in condizioni refrigerate fino al momento delle analisi eseguite presso il laboratorio della sezione di Microbiologia del DiBA.

La frequenza dei campionamenti in relazione alle diverse linee di ricerca nel corso dei tre anni di attività è riportata nella tabella 2.4 dove:

I = prelievo 15-20 ore dopo l'inoculo del lievito EC-1118;

 F_1 = prelievo durante la fermentazione con una densità del mosto compresa tra 1,020 e 1,010 gmL⁻¹;

 F_2 = prelievo durante la fermentazione con una densità del mosto compresa tra 1,050 e 1,040 gmL⁻¹,

 F_1 - F_7 = diversi prelievi nel corso della fermentazione

S = prelievo dopo svinatura

Tabella 2.4 Frequenza dei campionamenti di mosto-vino effettuati per ciascuna linea nel corso dei tre anni di attività.

	2008				2009)	2010	
Linea B1.1	I	F1	S	I	F1	S	-	
Linea B1.2	I	F1	S	I	F1	S	-	
Linea B4	I	F1	S	I	F1	F2	F1-F7 S	

2.4. Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche condotte su ciascun campione hanno previsto le seguenti fasi:

a) Determinazione quantitativa delle popolazioni di lieviti Saccharomyces e non-Saccharomyces

I singoli campioni di mosto, prelevati dopo l'inoculo del lievito starter, sono stati sottoposti, dopo opportuna diluizione seriale decimale con soluzione fisiologica (NaCl 0.85%), a semina superficiale su piastre Petri contenenti i seguenti mezzi colturali:

- WL nutrient Agar (Oxoid, Unipath Ltd) quantificazione dei lieviti totali, in quanto questo terreno permette lo sviluppo di tutte le specie di lievito e consente una prima differenziazione a livello di genere in funzione del colore e della morfologia della colonia come riportato da Cavazza et al., 1992;
- AL Lysine medium (Oxoid, Unipath Ltd) per determinazione dei lieviti non-Saccharomyces, poichè contiene come unica fonte di azoto la lisina che non è assimilabile dai lieviti del genere Saccharomyces di interesse enologico.

I risultati ottenuti sono stati espressi, per tutti i campioni, come Unità Formanti Colonia per millilitro di mosto $(U.F.C.mL^{-1}).$

b) Isolamento e identificazione speciologica di lieviti

Per ciascun campione di mosto o vino è stato isolato un numero rappresentativo di colonie di lievito diverse per morfologia e colore dopo sviluppo su terreno WL nutrient Agar. Gli isolati così ottenuti sono stati trasferiti in provette Eppendorf contenenti terreno liquido YEPD (Tab. 2.5) e incubati per 24 h alla temperatura di 28°C. Dopo incubazione il mezzo di coltura è stato eliminato per centrifugazione ed è stato aggiunto 1mL di terreno liquido YEPD addizionato di glicerolo al 50 % (v/v) al fine di

conservare i campioni in congelatore a -80°C fino al momento dell'analisi. L'identificazione è stata effettuata mediante amplificazione e restrizione dello spaziatore interno trascritto (PCR-RFLP-rITS) secondo il metodo riportato da Granchi et al., 1999.

Tabella 2.5 Frequenza dei campionamenti di mosto-vino effettuati per ciascuna linea nel corso dei tre anni di attività.

Componente	Quantità gL ⁻¹
Estratto di lievito (Oxoid)-	10
Peptone (Oxoid)	20
Glucosio (Oxoid)	20

c) Caratterizzazione intraspecifica di isolati di S. cerevisiae

Per la caratterizzazione a livello di ceppo dei lieviti appartenenti alla specie S. cerevisiae è stata impiegata la tecnica dell'amplificazione delle regioni interdelta secondo il protocollo descritto da Charpentier et al., 2009 che prevede i seguenti primer:

Dopo elettroforesi su gel di agarosio, i profili ottenuti sono stati acquisiti con una telecamera (CCD) e memorizzati in un PC come file d'immagine con il programma UVItec Gel Documentation Cambridge UK.

d) Determinazione quantitativa delle popolazioni di batteri lattici

inoculo Dopo svinatura ed dei batteri malolattici commerciali, i campioni di vino-fiore e i relativi "pressati" sono stati sottoposti, dopo opportune diluizioni seriali decimali con soluzione fisiologica, a semina profonda in piastre Petri contenenti come terreno di coltura MRS (Difco) integrato di Tomato Juice Broth (Difco) a pH 4,8. I risultati sono stati espressi come UFCmL⁻¹.

2.5. Analisi chimiche

analisi in HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dei principali parametri enologici (glucosio e fruttosio, etanolo, glicerina, acido acetico) sono state effettuate in accordo con quanto riportato da Leferbyre et al., (2002) impiegando un cromatografo liquido Varian Pro Star equipaggiato con colonna MetaCarb 87 H plus (300 x 7,8 mm Biorad) termostata a 65°C (fornetto Gecko 2000) e utilizzando come eluente una soluzione di acido solforico 0.013 N ad un flusso di 0.6 mL/min e due rivelatori collegati in serie: un detector UV-visibile (Varian mod. 325) operante a 210 nm per la determinazione quantitativa degli acidi organici e un rifrattometro differenziale (Knauer mod. K-2301) per la derminazione degli zuccheri (glucosio e fruttosio), della glicerina e dell'etanolo. La quantificazione dei diversi composti è stata per confronto con rette di calibrazione appositamente costruite mediante soluzioni standard. Per l'elaborazione è stato utilizzato il software Galaxie.

2.6. Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati conseguiti è stata condotta con la collaborazione del Prof. S. Benedettelli (DI.P.S.A. - Università di Firenze) e del Dr. A. Magrini, utilizzando il programma Systat v. 12.

Inoltre, l'Analisi della Varianza Multivariata (ANOVA) con livello di significatività 5%, l'Analisi delle Componenti Principali e l'Analisi Discriminante sono state condotte presso il DiBA, mediante l'utilizzo dei programmi Systat v 12, GraphPad Prism v. 5 e Statistica v. 9.

Capitolo 3. Risultati

I risultati conseguiti nel corso dei tre anni di attività vengono riportati nei successivi paragrafi in funzione delle tre linee di ricerca studiate:

- <u>Linea B.1.1</u>: Effetti di diversi livelli di MOG⁵ e ASM⁶ sulla qualità del vino (anni 2008 e 2009)
- <u>Linea B1.2</u>: Effetti di diverse modalità di raccolta sulla qualità dell'uva (anni 2008 e 2009)
- <u>Linea B.4</u>: Massimizzazione del potenziale enologico attraverso diverse tecniche di vinificazione (anni 2008, 2009 e 2010)

Per ciascuna linea l'esposizione dei risultati si articola secondo il seguente schema:

- a) Analisi chimico-fisiche (effettuate presso il Laboratorio di analisi ISVEA, Poggibonsi, Siena) delle uve raccolte per le tre repliche (R1, R2 e R3) e/o dei rispettivi mosti al riempimento delle vasche
- b) Profili termici delle vinificazioni e cinetica della densità del mosto registrate nella cantina sperimentale durante la fermentazione alcolica
- c) Popolazioni di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e non-*Saccharomyces* presenti durante la fermentazione alcolica
- d) Analisi dei principali parametri chimici di interesse enologico (etanolo, glicerina, acido acetico, zuccheri etc.) nelle diverse fasi della fermentazione considerate.
- e) Analisi chimiche dei vini dopo la svinatura (effettuate presso il Laboratorio di analisi ISVEA, Poggibonsi, Siena)
- f) Popolazioni di lieviti e batteri lattici dopo la svinatura
- g) Analisi statistica dei dati conseguiti.

⁵ MOG = Materials Other than Grapes

⁶ ASM = Acini a Scarsa Maturazione

3.1 Linea di ricerca B1.1 (anno 2008)

La linea di ricerca B1.1, che ha riguardato lo studio degli effetti di diversi livelli di MOG⁷ e ASM⁸ sulla qualità del vino, ha portato all'allestimento di 27 vasche ottenute da 9 tesi derivanti dalla combinazione del MOG e degli ASM a tre livelli secondo il seguente schema:

MOG: 0%-50%-100% = MO-M50-M100

ASM: 0%-50%-100%

replicate in 3 blocchi (R1-R2-R3)

3.1.1 Composizione chimica di uve e mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche delle uve impiegate per l'allestimento delle vasche sono riportate nella tabella 3.1.

Tabella n. 3.1 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) delle uve impiegate per la LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

Vasca	Data	Rep.	Tesi	Zuccheri riduttori gL ⁻¹	Acidità Totale gL ⁻¹	Acido malico gL ⁻¹	Acido tartarico gL ⁻¹	pН	APA* mgL
47	20/09/08	R1	3.504.0	220	5,18	0,57	6,8	3,61	117
64	20/09/08	R2	M0A0	268	5,45	0,61	6,9	3,56	136
48	22/09/08	R3		255	4,49	0,55	5,5	3,64	112
40	20/09/08	R1		207	5,09	1,17	6,3	3,70	164
59	20/09/08	R2	M0A100	212	4,72	1,40	6,4	3,78	113
49	22/09/08	R3		212	4,90	0,77	5,9	3,57	119
43	20/09/08	R1		213	5,40	0,84	6,4	3,60	112
66	20/09/08	R2	M0A50	243	5,14	0,88	6,9	3,66	127
56	22/09/08	R3		238	4,91	0,81	6,2	3,59	127
42	20/09/08	R1		226	5,34	0,54	7,0	3,55	119
63	20/09/08	R2	M100A0	269	5,30	0,44	7,0	3,54	119
55	22/09/08	R3		253	4,56	0,75	5,9	3,65	130
46	20/09/08	R1		202	5,05	1,79	5,9	3,76	110
62	20/09/08	R2	M100A100	210	5,67	1,40	7,0	3,65	117
52	22/09/08	R3		224	4,74	0,89	5,9	3,62	121
41	20/09/08	R1		225	5,13	0,81	6,5	3,61	118
58	20/09/08	R2	M100A50	221	5,05	0,85	6,8	3,62	167
51	22/09/08	R3		234	4,45	0,84	5,8	3,64	110
44	20/09/08	R1		241	5,04	0,76	6,6	3,66	134
61	20/09/08	R2	M50A0	273	4,86	0,61	6,6	3,65	143
53	22/09/08	R3		258	4,49	0,59	5,9	3,62	123
39	20/09/08	R1		225	5,02	1,30	6,2	3,70	142
65	20/09/08	R2	M50A100	224	4,70	1,19	6,2	3,82	137
50	22/09/08	R3		227	4,42	0,88	5,6	3,69	122
45	20/09/08	R1		222	4,92	0,87	6,4	3,66	121
60	20/09/08	R2	M50A50	217	4,90	1,28	6,7	3,73	110
54	22/09/08	R3		225	4,79	0,81	5,9	3,57	116

⁷ MOG = Materials Other than Grapes

⁸ ASM = Acini a Scarsa Maturazione

Dall'analisi di tali valori è possibile evidenziare come, a parità di tesi, i parametri considerati mostrino una certa variabilità tra i campioni di uva di repliche diverse, come ad esempio dimostrato dalla concentrazione di acido malico che, nella tesi MOA100, varia da 0,77 a 1,17 gL⁻¹.

Il pH delle uve è risultato sempre elevato, raggiungendo in alcuni casi valori prossimi a 3,8. Infine, tutti i campioni di uva hanno mostrato una quantità di azoto prontamente assimilabile considerata sufficiente per lo svolgimento del processo fermentativo.

Nella tabella 3.2 sono riportate le analisi chimiche condotte sui mosti all'inizio della fermentazione alcolica.

	ferme	Truzione	1311 1132 1	D.1.1 (1)	macmm	114 D	,00,	
VASCA	DATA	TESI	Etanolo (v/v %)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità volatile (g/L)	Solforosa totale (mg/L)
⁴⁷ R1	20/09/08	,	1,45	228	5,04	3,55	0,10	73
$48\mathrm{R3}$	22/09/08	M0A0	1,65	237	5,75	3,49	0,14	70
64 R2	22/09/08		3,80	201	6,19	3,44	0,15	66
40 R1	20/09/08		1,40	220	4,45	3,78	0,10	72
49 R3	22/09/08	M0A100	1,65	217	5,32	3,54	0,15	50
59 R2	22/09/08		3,25	188	5,40	3,55	0,10	63
43 R1	20/09/08	•	1,45	227	4,82	3,65	0,11	76
56 R3	22/09/08	M0A50	2,05	221	5,66	3,51	0,13	50
66 R2	22/09/08		3,80	187	5,75	3,48	0,12	67
⁴² R1	20/09/08		1,75	226	5,00	3,59	0,10	66
55 R3	22/09/08	M100A0	2,30	220	5,75	3,49	0,13	66
63 R2	22/09/08		3,60	199	5,83	3,48	0,12	65
46 R1	20/09/08		2,25	199	4,77	3,73	0,11	62
52 R3	22/09/08	M100A100	2,35	202	5,38	3,55	0,13	52
62 R2	22/09/08		5,15	145	5,67	3,58	0,12	60
41 R1	20/09/08	,	1,95	213	5,07	3,68	0,12	66
51 R3	22/09/08	M100A50	2,55	206	5,59	3,52	0,13	59
58 R2	22/09/08		4,55	170	5,72	3,53	0,14	63
44 R1	20/09/08		1,85	2,24	5,06	3,60	0,11	79
53 R3	22/09/08	M50A0	1,40	239	5,56	3,48	0,14	57
61 R2	22/09/08		3,35	211	5,93	3,44	0,15	79
39 R1	20/09/08		1,85	208	4,62	3,72	0,09	76
50 R3	22/09/08	M50A100	2,10	208	5,41	3,53	0,10	54
65 R2	22/09/08		5,25	148	5,82	3,55	0,15	66
45 R1	20/09/08		1,60	219	4,93	3,62	0,10	66
54 R3	22/09/08	M50A50	2,25	212	5,56	3,51	0,11	55
60 R2	22/09/08		3,95	186	5,90	3,51	0,13	75

Osservando i valori degli zuccheri, si nota come, contrariamente a quanto evidenziato dalle analisi chimiche delle uve di partenza, emerga una maggiore omogeneità tra le repliche. Tale differenza, è molto probabilmente dovuta alla difficoltà di effettuare campionamenti di uva che siano effettivamente rappresentativi dei mosti che derivano dalla loro spremitura.

La concentrazione di etanolo è risultata maggiore nelle vinificazioni della replica 2. Tuttavia, occorre specificare che questi valori sono dovuti soltanto al fatto che per tale replica le analisi chimiche sono state effettuate due giorni dopo il riempimento delle vasche, mentre per le altre due repliche, il giorno successivo al riempimento. Relativamente alla anidride solforosa, considerando che è stato aggiunto metabisolfito di potassio in quantità di 15 ghL⁻¹, nelle vasche delle repliche 1 e 2 sono stati rilevati valori medi di anidride solforosa totale rispettivamente pari a 70,7±5,8 e 67,1±6,1 mgL⁻¹ in linea con le attese, mentre nelle vasche della replica 2 i valori sono stati in media significativamente più bassi 57,5±6,7 mgL⁻¹ (ANOVA, p >0,05).

3.1.2 Valutazione dell'inoculo

Il lotto del lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 utilizzato per tutte le vinificazioni ha mostrato un numero di cellule vitali pari a 9,5x10⁹ per grammo di prodotto per cui, considerando che sono stati aggiunti 30g/hL e che ogni vasca conteneva circa 8 hL di mosto, per ciascuna fermentazione il <u>valore teorico dell'inoculo è stato pari a 2,85x10⁶ cellule per millilitro di mosto.</u>

3.1.3 Valutazione degli andamenti fermentativi

Indipendentemente dalle tesi, la fermentazione alcolica è stata condotta mediamente a valori compresi tra 22 e 25°C. Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figura 3.1).

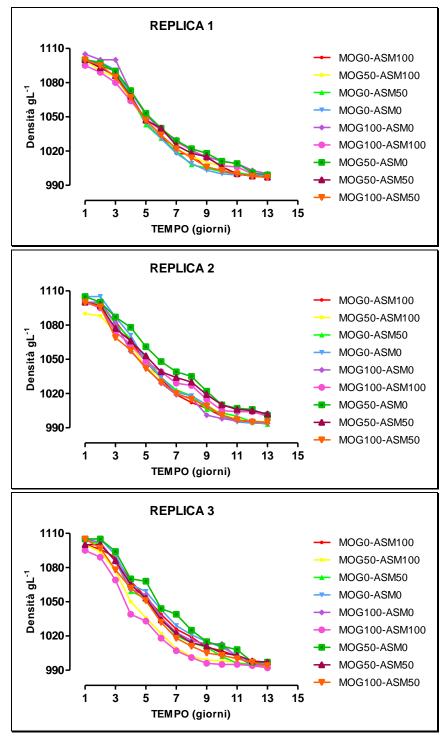


Figura 3.1. Andamento della densità del mosto-vino durante la fermentazione alcolica in relazione alle diverse tesi (MOG = Materials Other than Grape; ASM = Acini a Scarsa Maturazione)

Al fine di poter confrontare gli andamenti registrati ed evidenziare eventuali differenze di velocità nella cinetica fermentativa è stata cercata una funzione matematica il cui grafico rappresentasse in modo soddisfacente l'andamento della densità del mosto durante il processo fermentativo delle varie tesi. Perciò i dati sperimentali relativi alla densità rispetto al tempo ottenuti per ciascuna vinificazione allestita sono stati "inseriti" nella seguente equazione:

$Y=(Y_0 - Plateau)*exp(-K*X) + Plateau$

Dove:

 Y_0 = il valore massimo di densità

Plateau = il valore minimo di densità

K = 1/ (il tempo quando la densità è diventata la metà)

Y = tempo

X = densità

Quindi, è stata valutata la bontà del fit attraverso i valori di R² riportati in tabella 3.3 che, essendo tutti compresi tra 0,92 e 0,95 hanno dimostrato che l'equazione è idonea a spiegare l'andamento della densità del mosto nel tempo. Inoltre, i valori della variabile K, che corrisponde all'inverso del tempo necessario affinché la densità abbia raggiunto un valore pari alla metà del valore iniziale, sono stati sottoposti ad un test-F per valutare eventuali differenze tra una cinetica e l'altra.

I risultati ottenuti hanno mostrato l'assenza di differenze significative tra le tesi considerate e quindi è possibile concludere che i vari livelli di MOG e ASM non hanno influenzato significativamente la velocità del processo fermentativo.

Tuttavia, occorre sottolineare che la maggior parte delle vasche è stata svinata quando ancora era presente un certo residuo zuccherino come risulta dalla tabella 3.7.

Capitolo 3. Risultati

Linea B.4.1

Tabella n. 3.3. Risultati dell'analisi statistica condotta considerando i dati sperimentali della densità del mosto misurati durante la fermentazione nelle diverse tesi e l'equazione $Y=(Y_0 - Plateau)*exp(-K*X) + Plateau$ (dove $Y_0 = il$ valore massimo di densità, Plateau = il valore minimo di densità, K = 1/(il tempo quando la densità è diventata la metà), Y = tempo, X =

	M0-A100	M50-A100	M0-A50	M0-A0	M100-A0	M100-A100	M50-A0	M50-A50	M100-A50
Best-fit values									
YO	1093	1090	1098	1106	1103	1094	1101	1097	1099
PLATEAU	992,2	990,0	990,7	987,2	987,7	991, 2	988,7	991,4	988,3
K	0,02039	0,01907	0,01905	0,01771	0,01863	0,01926	0,01958	0,01877	0,01768
Half Life	34,00	36, 36	36, 39	39, 13	37,21	35,99	35,41	36,93	39,22
Tau	49,05	52,45	52,51	56, 45	53,68	51,92	51,08	53, 27	56,58
Span	101,1	100, 3	106,9	118,3	115,8	102,8	112,4	106,0	110,6
Std. Error									
YO	4,673	3,384	4,755	5,053	4,529	4,690	3,869	3,805	4,755
PLATEAU	4,245	3, 309	4,656	5,320	4,345	4,579	3,590	3,821	4,967
K	0,002798	0,001971	0,002599	0,002407	0,002232	0,002679	0,002027	0,002150	0,002409
Span	5,400	4,021	5,654	6, 169	5, 284	5, 599	4,481	4,601	5,780
95% confidence intervals									
YO	1084 to 1103	1083 to 1097	1088 to 1107	1095 to 1116	1094 to 1113	1085 to 1104	1093 to 1109	1090 to 1105	1089 to 1109
PLATEAU	983.5 to 1001	983.2 to 996.7	981.3 to 1000	976.4 to 998.0	978.9 to 996.5	981.9 to 1001	981.4 to 996.0	983.6 to 999.3	978.2 to 998.4
K	0.0146 to 0.0260	0.0150 to 0.0230	0.0137 to 0.0243	0.0128 to 0.0226	0.0141 to 0.0231	0.0138 to 0.0247	0.0154 to 0.0237	0.0143 to 0.0231	0.01278 to 0.02257
Half Life	26.57 to 47.18	30.04 to 46.05	28.48 to 50.39	30.66 to 54.07	29.92 to 49.17	28.04 to 50.22	29.25 to 44.86	29.91 to 48.24	30.70 to 54.25
Tau	38.34 to 68.07	43.33 to 66.43	41.09 to 72.70	44.23 to 78.00	43.17 to 70.94	40.45 to 72.46	42.20 to 64.71	43.15 to 69.59	44.30 to 78.27
Span	90.15 to 112.1	92.15 to 108.5	95.36 to 118.4	105.8 to 130.9	105.1 to 126.5	91.43 to 114.3	103.3 to 121.5	96.62 to 115.5	98.87 to 122.4
Goodness of Fit									
Degrees of Freedom	33	33	33	34	35	32	34	28	34
R ²	0,9164	0,9521	0,9194	0,9215	0,9349	0,9171	0,9505	0,9522	0,9208
Absolute Sum of Squares	3119	1677	3312	3963	3215	3109	2236	1782	3509
Sy.x	9,721	7,128	10,02	10,80	9,583	9,857	8,110	7,977	10,16

3.1.4 Popolazioni di lieviti durante la fermentazione e dopo svinatura

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato nella tabella 3.4.

Tabella 3.4. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I), durante la fermentazione alcolica (F) e dopo svinatura (S)

N° TESI	R	TEMPISTICA		TEM	IPISTICA	TEMPISTICA		
N IESI	K	I (h)*	Data	F (g)**	Data	S (g)**	Data	
9	R1	22	19 settembre	6	25 settembre	18-19	6 e 7 ottobre	
9	R2	18	20 settembre	6	26 settembre	17-18	6 e 7 ottobre	
9	R3	18	21 settembre	6	27 settembre	16	7 ottobre	

^{*} ore dopo l'inoculo

I risultati relativi alla quantificazione della popolazione dei Saccharomyces cerevisiae e dei lieviti Saccharomyces presenti durante la fermentazione e dopo svinatura nelle singole vasche sono mostrati nella tabella 3.5 in funzione delle repliche e delle tesi previste nella linea di ricerca. Considerando che tutte le vasche sono state inoculate con il ceppo di lievito commerciale EC1118 alla densità cellulare teorica di 2,85x10⁶ cellmL⁻¹, si può stimare che nell'arco di tempo di 22 ore la popolazione di S. cerevisiae abbia compiuto mediamente un numero di generazioni pari a 1,8, contro un valore di 0,6 ottenuto nell'intervallo di 18 ore, a dimostrazione che il lievito inoculato necessita molto probabilmente di un periodo di adattamento alle condizioni ambientali del mosto e della cantina. A questo proposito, occorre ricordare che la cantina nel 2008 era di nuova costruzione e che le vasche dedicate a questa linea sono state le prime ad essere utilizzate per la vinificazione. Gli stessi campioni di mosto prelevati ad inizio della fermentazione hanno mostrato percentuali diverse di lieviti non-Saccharomyces, risultando in due vasche (n. 59 e n.49) maggioritari rispetto alla popolazione di S. cerevisiae (figura. 3.2). In tutti i campioni di mosto la specie predominante è stata *K. apiculata*.

^{**} giorni di fermentazione

Tabella n.3.5 Valori delle popolazioni di S. cerevisiae e non-Saccharomyces rilevati nei tre campionamenti effettuati per ciascuna tesi della LINEA B.1.1

 $(I = dopo\ l'inoculo,\ F_1 = durante\ la\ fermentazione;\ S = dopo\ la\ svinatura)$

Vasca N.	Tesi	Replica	S. cere	visiae (UF	C/mL)	non-Saccharomyces (UFC/mL)			
			I	$\mathbf{F_1}$	S	I	$\mathbf{F_1}$	S	
47	M0A0	1	$1,31x10^7$	$2,80 \times 10^7$	$8,00x10^6$	$4,30x10^5$	$9,70x10^3$	$1,00 \times 10^5$	
64	M0A0	2	$4,40x10^6$	$2,84 \times 10^7$	$7,20 \times 10^6$	$6,75 \times 10^5$	$4,10x10^3$	$9,00x10^{1}$	
48	M0A0	3	$4,50x10^6$	$4,46x10^7$	$1,01 \times 10^7$	$9,50x10^5$	$7,20x10^2$	$9,00x10^{1}$	
40	M0A100	1	$9,60x10^6$	$2,99x10^7$	$7,50x10^6$	$2,03x10^6$	$3,01x10^4$	$9,00x10^{1}$	
59	M0A100	2	$2,70x10^5$	$3,49 \times 10^7$	$1,30x10^7$	$1,25 \times 10^6$	$4,15x10^4$	$1,00 \times 10^5$	
49	M0A100	3	$2,70x10^6$	$3,48 \times 10^7$	$8,10x10^6$	$4,49x10^6$	$1,60 \times 10^4$	$9,00x10^{1}$	
43	M0A50	1	$6,10x10^6$	$3,45 \times 10^7$	$7,20x10^6$	$1,24 \times 10^6$	$4,70x10^3$	$9,00x10^{1}$	
66	M0A50	2	$6,30x10^6$	$3,32 \times 10^7$	$8,70x10^6$	$1,32 \times 10^6$	$1,00x10^4$	$9,00x10^{1}$	
56	M0A50	3	$8,80 \times 10^6$	$3,23x10^7$	$8,80x10^6$	$2,25 \times 10^6$	$4,70x10^3$	$9,00x10^{1}$	
42	M100A0	1	$1,20x10^7$	1,16x10 ⁷	$9,20x10^6$	$7,50 \times 10^5$	$2,47 \times 10^3$	$2,00x10^5$	
63	M100A0	2	9.20×10^6	$1,52 \times 10^7$	6.80×10^6	6.35×10^5	$9,10x10^2$	9.00×10^{1}	
55	M100A0	3	$2,30x10^6$	$9,96x10^6$	$6,20x10^6$	$1,14x10^6$	$2,06x10^3$	$1,00 \times 10^5$	
46	M100A100	1	7.60×10^6	1.07×10^7	7.80×10^6	3.93×10^6	1,81x10 ⁴	$2,00x10^2$	
62	M100A100	2	6.10×10^6	$8,41x10^6$	$5,60 \times 10^6$	1.14×10^6	$3,70x10^3$	9.00×10^{1}	
52	M100A100	3	$3,80 \times 10^6$	$1,23x10^7$	$1,03 \times 10^7$	$3,46x10^6$	$1,57x10^4$	$4,00 \times 10^2$	
41	M100A50	1	$1,09 \times 10^7$	$9,69 \times 10^6$	$9,10x10^6$	$1,74 \times 10^6$	$6,80 \times 10^3$	9,00x10 ¹	
58	M100A50	2	$3,80 \times 10^6$	1.37×10^7	1.05×10^7	2.05×10^5	1.84×10^3	9.00×10^{1}	
51	M100A50	3	$5,30x10^6$	$9,40x10^6$	4,20x106	$2,80 \times 10^6$	$1,04 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$	
44	M50A0	1	$1,46 \times 10^7$	1,99x10 ⁷	1.07×10^7	$6,62 \times 10^5$	$4,30x10^3$	9,00x10 ¹	
61	M50A0	2	$3,39x10^6$	$2,52 \times 10^7$	$1,15x10^7$	$3,35 \times 10^5$	$8,20x10^3$	$9,00x10^{1}$	
53	M50A0	3	$1,90x10^7$	$2,95 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$1,66 \times 10^6$	$1,49x10^4$	$9,00x10^{1}$	
39	M50A100	1	$1,03 \times 10^7$	$2,34x10^7$	$8,00x10^6$	$2,05 \times 10^6$	$1,45 \times 10^4$	$4,00x10^2$	
65	M50A100	2	$4,90x10^6$	$2,07x10^7$	$6,00x10^6$	$7,50 \times 10^5$	$5,60 \times 10^3$	$9,00x10^{1}$	
50	M50A100	3	$5,80 \times 10^6$			$2,82 \times 10^6$	$1,42 \times 10^4$	$9,00x10^{1}$	
45	M50A50	1	$8,70x10^6$	$1,94 \times 10^7$	1,65x10 ⁷	$2,90x10^6$	$1,26 \times 10^4$	$9,00x10^{1}$	
60	M50A50	2	$3,30x10^6$	$2,45 \times 10^7$	$9,10x10^6$	$7,10x10^5$	$6,90x10^3$	$9,00x10^{1}$	
54	M50A50	3	$7,60 \times 10^6$	$2,05 \times 10^7$	$4,20x10^6$	$2,62 \times 10^6$	$2,76 \times 10^4$	$2,00x10^5$	

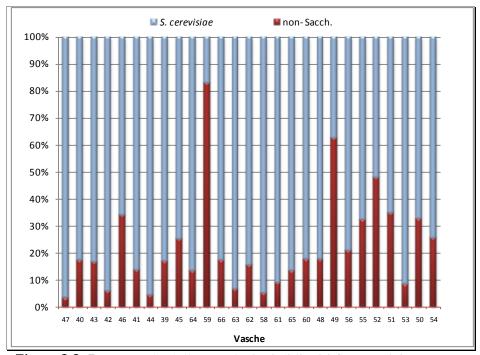


Figura 3.2. Percentuale delle popolazioni di lieviti S. cerevisiae e non-Saccharomyces presenti nelle diverse vasche 18-22 ore dopo l'inoculo

In corrispondenza del secondo campionamento, circa il 70-80% degli zuccheri erano stati degradati (Tab. 3.6) e la popolazione di *S. cerevisiae* aveva raggiunto valori compresi tra circa 1 e $4 \times 10^7 \text{UFCmL}^{-1}$, mentre i non-*Saccharomyces*, con il procedere della fermentazione alcolica, come atteso, avevano subito una diminuzione della popolazione vitale raggiungendo valori di 10^2 – 10^4 UFCmL⁻¹.

Indipendentemente dal trattamento, l'acidità volatile ha raggiunto valori molto bassi (< 0,3 gL⁻¹). Dopo la svinatura le popolazioni di *S. cerevisiae* sono rimaste ad elevata densità cellulare, mentre i non-*Saccharomyces* hanno presentato valori trascurabili.

3.1.5 Composizione chimica dei vini alla svinatura

Al termine della fermentazione le vasche sono state sottoposte a svinatura e le relative analisi microbiologiche e chimiche sono riportate nella tabella 3.7.

Tabella n. 3.6 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) a metà della fermentazione – LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

VASCA	DATA	TESI	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Zuccheri (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
47	25/09/2008		16,00	41,00	57,00	11,40	8,03	0,22
48	27/09/2008	M0A0	18,00	47,00	65,00	11,45	8,80	0,14
64	26/09/2008		28,00	63,00	91,00	10,49	8,37	0,20
40	25/09/2008		20,00	44,00	64,00	10,10	7,44	0,16
49	27/09/2008	M0A100	18,00	43,00	71,00	10,57	7,94	0,11
59	26/09/2008		28,00	57,00	85,00	9,36	7,50	0,14
43	25/09/2008		17,00	41,00	58,00	11,40	8,31	0,21
56	27/09/2008	M0A50	21,00	44,00	65,00	10,62	7,75	0,12
66	26/09/2008		22,00	51,00	73,00	10,58	8,01	0,15
42	25/09/2008	•	26,00	57,00	83,00	9,71	7,47	0,19
55	27/09/2008	M100A0	17,00	40,00	57,00	11,18	8,23	0,17
63	26/09/2008		23,00	52,00	75,00	10,69	7,81	0,15
46	25/09/2008		27,00	51,00	78,00	8,92	6,70	0,15
52	27/09/2008	M100A100	29,00	54,00	83,00	8,83	7,04	0,10
62	26/09/2008		7,00	23,00	30,00	11,94	7,90	0,12
41	25/09/2008		20,00	49,00	69,00	10,84	7,70	0,14
51	27/09/2008	M100A50	19,00	45,00	64,00	10,07	7,91	0,09
58	26/09/2008		17,00	41,00	58,00	10,71	7,45	0,16
44	25/09/2008		28,00	57,00	85,00	9,93	7,54	0,19
53	27/09/2008	M50A0	34,00	66,00	100,00	9,04	7,57	0,14
61	26/09/2008		31,00	65,00	96,00	9,95	8,27	0,19
39	25/09/2008		22,00	43,00	65,00	9,65	6,95	0,18
50	27/09/2008	M50A100	21,00	43,00	74,00	9,79	7,43	0,10
65	26/09/2008		10,00	31,00	41,00	11,74	8,25	0,15
45	25/09/2008		26,00	52,00	78,00	9,59	7,20	0,17
54	27/09/2008	M50A50	32,00	60,00	92,00	8,69	7,28	0,11
60	26/09/2008		21,00	48,00	69,00	10,55	7,69	0,20

Tabella n. 3.7 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) alla svinatura - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008) Acidità Solforosa Acido Etanolo Zuccheri TESI VASCA **DATA** pН Volatile malico Totale (v/v %) (g/L)(mg/L) (g/L) (g/L)14,1 47 01/10/2008 4,5 3,45 0,23 0,91 03/10/2008 M0A0 14,85 3,54 0,23 54 0,89 48 3,6 02/10/2008 14,7 8,5 3,38 0,28 48 0,9 64 1,22 13.5 3.72 0.2240 01/10/2008 4.1 56 49 03/10/2008 M0A100 13,75 2,6 3,61 0,17 46 1,24 02/10/2008 13,65 3,5 3,54 0,19 46 1,3 43 01/10/2008 3.56 0.22 53 1.03 13.9 6 M0A50 2,8 56 03/10/2008 14.3 3.56 0.2 46 0.99 66 02/10/2008 14,1 2,5 3,44 0,21 39 1,14 01/10/2008 13,05 20,5 3,56 0,22 57 42 1 55 03/10/2008 M100A0 14,05 8 3,58 0,21 43 1.07 63 02/10/2008 14,1 9,5 3,45 0,21 47 0,98 01/10/2008 11,75 26 3,69 0,2 55 1,59 M100A100 47 03/10/2008 18.5 0.2 52. 12.45 3.61 1.43 62 02/10/2008 13 1,8 3.56 0,15 40 1.24 41 01/10/2008 13,5 0,2 47 1,21 6 3,61 51 03/10/2008 M100A50 13,65 6,4 3,59 0,19 41 1,27 58 02/10/2008 3.54 0.19 13.15 14.5 43 1.35 44 01/10/2008 12,95 25,5 3,51 0,22 65 0,87 53 03/10/2008 M50A0 13,65 22,5 3,54 0,23 53 1,08 02/10/2008 14,15 16,5 3,41 0,26 57 0,87 61 39 01/10/2008 12.95 7,6 3,7 0,18 52 1,3 50 03/10/2008 M50A100 13,35 6,2 3,59 41 1,24 0,17 65 02/10/2008 13,4 1,5 3,6 0,19 41 1,37 01/10/2008 58 45 12.9 17.5 3,52 0.19 1.05 M50A50 54 03/10/2008 12.9 20 3,57 0.21 47 1,1 02/10/2008 13,7 0,21 53 1,16

3.1.6 Analisi Statistica dei dati

Al fine di valutare se le popolazioni dei lieviti fossero state influenzate significativamente dalla presenza di MOG e di ASM ai vari livelli previsti dal piano sperimentale, sono stati sottoposti ad analisi della varianza, i seguenti parametri:

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18 ore dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18 ore dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione (non-SACC2)
- e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- f. Mortalità (%) dei lieviti non-Saccharomyces

Nella tabella 3.8 sono mostrate le variabili in funzione della significatività.

Tabella n. 3.8 Variabili significative e non significative per i parametri considerati nell'analisi statistica.

	SIGNIFICATIVE	NON SIGNIFICATIVE		
SACC 1	REPLICA	MOG e ASM		
NON-SACC 1	REPLICA e ASM	MOG		
SACC 2	MOG	REPLICA e ASM		
NON-SACC 2	ASM	MOG e REPLICA		
RENDIMENTO DI CRESCITA SACC	MOG e REPLICA	ASM		

La popolazione dei lieviti *S. cerevisiae* in corrispondenza del primo campionamento non ha presentato differenze significative indipendentemente dal trattamento effettuato, indicando che l'inoculo effettuato con il ceppo commerciale ha determinato una simile situazione microbiologica all'inizio della fermentazione. Al contrario, la replica è risultata significativa poiché il campionamento effettuato per la replica 1 è stato effettuato con 4 ore di ritardo rispetto alle repliche 2 e 3. Quest'intervallo di tempo giustifica il valore di popolazione superiore dei lieviti *S. cerevisiae* della replica 1 in quanto ritenuto sufficiente allo sviluppo di una generazione

La popolazione dei lieviti non-Saccharomyces presente in corrispondenza del primo campionamento è stata influenzata dalla presenza di ASM. In particolare, le tesi con il maggior contenuto di acini a scarsa maturazione hanno mostrato valori più elevati di non-Saccharomyces spp. (Figura 3.3). La replica è risulta significativa a dimostrazione della variabilità di questa popolazione in funzione delle diverse partite di uva. L'effetto della presenza degli ASM sui non-Saccharomyces è comunque rimasto invariato nei campioni di vino prelevati a metà fermentazione (Fig. 3.4).

Nello stesso momento lo sviluppo dei lieviti *S. cerevisiae* è risultato significativamente minore all'aumentare del MOG (Figure 3.5 e 3.6).

06/10/2010

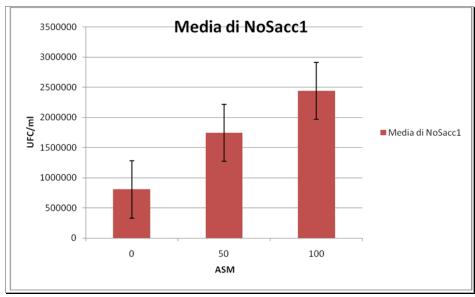


Figura n. 3.3 Effetto del trattamento sulle popolazioni dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

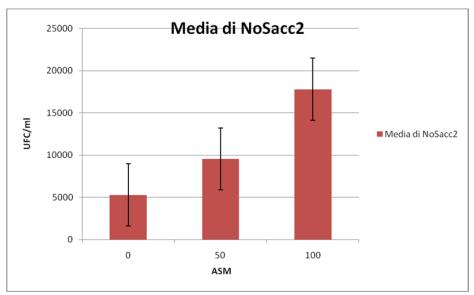


Figura n. 3.4 Effetto del trattamento sulle popolazioni dei non-Saccharomyces a densità 1020 - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

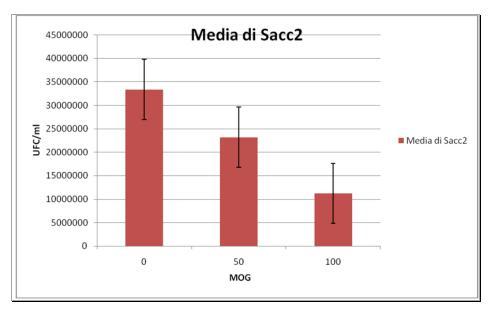


Figura n. 3.5 Effetto del trattamento sulle popolazioni di S. cerevisiae a densità 1020 - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

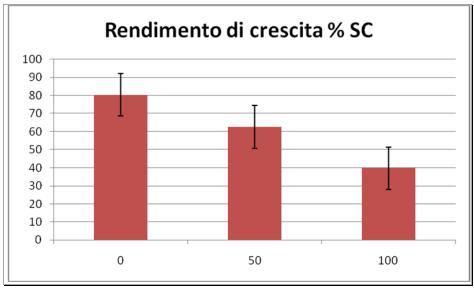


Figura n. 3.6 Effetto del trattamento sul rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae – LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

Successivamente all'analisi della varianza è stata effettuata l'Analisi delle Componenti principali. Per tale analisi sono stati presi in considerazione sia i parametri chimici a densità del mosto pari a 1020 che quelli microbiologici quali:

- popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s 18h dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1),
- popolazione di *S. cerevisiae* al secondo campionamento (Sacc2),
- glucosio (Glu), fruttosio (Fru), glicerina (Gly), Ac. Acetico ed etanolo (EtOH).

La distribuzione delle variabili è riportata in figura 3.7, mentre quella delle varie tesi considerate nella figura 3.8.

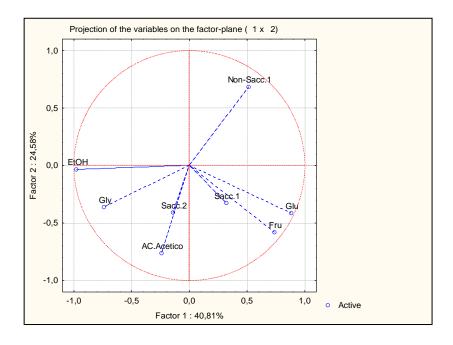


Figura n. 3.7 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

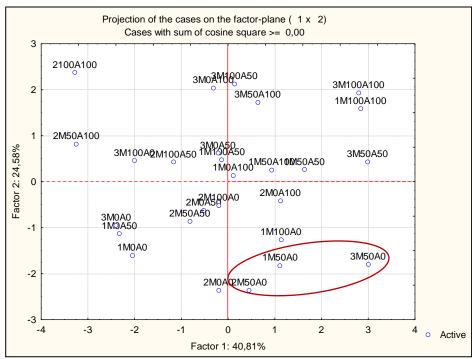


Figura n. 3.8 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.1.1 (vendemmia 2008)

Osservando la distribuzione delle tesi nei quadranti di riferimento si evidenzia che non si ottiene un raggruppamento di tutte le varie tesi in funzione del trattamento molto probabilmente a causa della variabilità legata alla replica. Tuttavia, le tesi con assenza di ASM. indipendentemente dal contenuto di MOG, rispetto alla prima componente, si distribuiscono nella parte inferiore del piano per la minore presenza di non-Saccharomyces. Inoltre, le tre tesi con MOG al 50% senza ASM aggiunti si raggruppano nel quadrante in basso a destra per avere degradato, a metà fermentazione, una quantità inferiore di zuccheri e presentare conseguentemente un minore grado alcolico, pur essendo state caratterizzate da un numero elevato di lieviti S. cerevisiae. Le stesse tre tesi hanno mostrato alla svinatura la maggiore concentrazione di zuccheri residui (Tab. 3.7).

3.2 Linea di ricerca B1.1 (anno 2009)

3.2.1 Composizione chimica dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche dei mosti ad inizio del processo fermentativo sono riportate in tabella 3.9. Da notare che, in alcuni campioni, la concentrazione di SO₂ è risultata elevata rispetto al valore atteso in base all'aggiunta di 15 ghL⁻¹ di metabisolfito di potassio.

Tabella n. 3.9 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) dei mosti all'inizio della fermentazione per la LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

Vasca N.	Tesi		Data	(% v/v)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	SO ₂ (mg/L)
42		1	8/10/09	0	238	4,58	3,63	0	158
53	M0A0	2	09/10/09	0,6	228	5,01	3,63	0,11	73
65		3	10/10/09	0,6	231	5	3,63	0,15	77
					-				
39		1	8/10/09	0,75	212	5,52	3,57	0,12	61
56	M0A100	2	09/10/09	0,6	205	5,6	3,6	0,15	81
61		3	10/10/09	0,7	217	5,58	3,57	0,14	79
41		1	8/10/09	0.35	217	5,29	3,57	0.1	113
51	M0A50	2	09/10/09	0,85	217	5,29	3,62	0,15	91
66		3	10/10/09	0,45	227	5,11	3,59	0,13	88
				,		-,	,	.,	
43		1	8/10/09	0.55	227	5,01	3,65	0.13	82
48	M100A0	2	09/10/09	0,45	225	5,04	3,67	0,14	78
58		3	10/10/09	0,45	228	4,88	3,7	0,18	123
	-			,		.,,,,,		,	
44		1	8/10/09	0,3	206	5,41	3,59	0,1	94
55	M100A100	2	09/10/09	0,7	211	5,47	3,63	0,17	71
62		3	10/10/09	0,7	228	5,44	3,58	0,18	103
							,	,	
47		1	8/10/09	0,35	219	4,97	3,63	0.08	50
54	M100A50	2	09/10/09	0,55	214	5,32	3,64	0,14	84
59		3	10/10/09	0,4	219	5,19	3,62	0,13	106
				· · · · ·		· · · · · ·		· · · · · ·	
45		1	8/10/09	0,5	227	4,89	3,61	0,15	92
50	M50A0	2	09/10/09	0,65	232	5,04	3,63	0,14	79
64		3	10/10/09	0,6	218	5,04	3,63	0,16	88
							-		
40		1	8/10/09	0,8	188	5,97	3,54	0,13	68
49	M50A100	2	09/10/09	0,45	210	5,42	3,62	0,12	93
60		3	10/10/09	0,8	209	5,58	3,56	0,18	89
46		1	8/10/09	0,8	216	5,25	3,6	0,17	79
52	M50A50	2	09/10/09	0,7	220	5,16	3,64	0,17	100
63		3	10/10/09	0,65	222	5,42	3,56	0,15	60
					-				
73		1	8/10/09	0,7	189	6,01	3,55	0,11	75
72	M/A100	2	09/10/09	0,65	207	5,66	3,58	0,15	85
				,				,	
71		3	10/10/09	0,75	211	5,74	3,54	0,16	86

3.2.2 Valutazione dell'inoculo

Il lotto del lievito commerciale Saccharomyces cerevisiae Lalvin EC-1118 utilizzato per tutte le vinificazioni ha mostrato un numero di cellule vitali pari a $2x10^{10}$ per grammo di prodotto per cui, considerando che sono stati aggiunti 28g/hL e che ogni vasca conteneva circa 7 hL di mosto, per ciascuna fermentazione il <u>valore teorico dell'inoculo era pari a $5,6x10^6$ cellule per millilitro di mosto.</u>

3.2.3 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figura 3.9). Dall'analisi degli andamenti si evidenzia una differenza nella cinetica del processo fermentativo in funzione della replica.

Inoltre, confrontando tali andamenti con quelli della vendemmia 2008 e considerando che la quantità di zuccheri iniziali era comparabile, la durata della fermentazione è stata più breve, ovvero circa 6 giorni per le repliche 1 e 2 contro 13 giorni. Tale differenza, come vedremo nel successivo paragrafo è attribuibile allo sviluppo dei lieviti.

3.2.4 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione e dopo svinatura

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato in tabella 3.10.

Tabella 3.10. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati per la Linea B1.1. dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I), e durante la fermentazione alcolica (F)

N° TESI	R	TEN	MPISTICA	TEMPISTICA		
		I (h)*	Data	F (g)**	Data	
10	R1	15	08 ottobre	4	11 ottobre	
10	R2	16	09 ottobre	4	12 ottobre	
10	R3	15	10 ottobre	4	13 ottobre	

^{*} ore dopo l'inoculo ** giorni di fermentazione

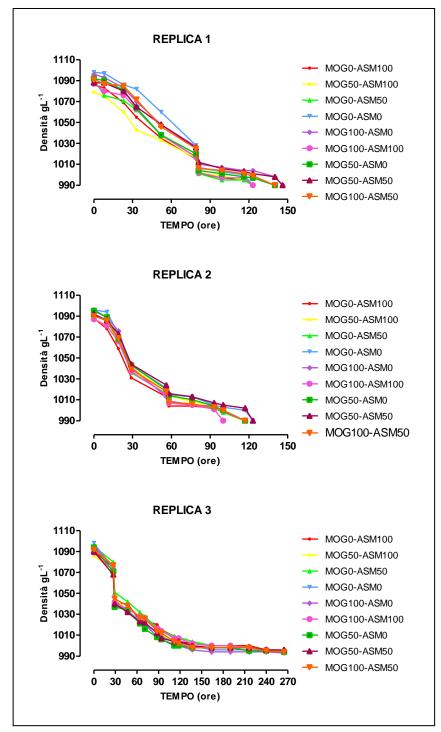


Figura 3.9. Andamento della densità del mosto-vino durante la fermentazione alcolica in relazione alle diverse tesi (MOG = Materials Other than Grape; ASM = Acini a Scarsa Maturazione)

I risultati relativi alle popolazioni dei lieviti *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyces* presenti durante la fermentazione e dopo svinatura nelle singole vasche sono mostrati nella tab. 3.11.

Tabella n. 3.11 Valori delle popolazioni di lieviti S. cerevisiae e non-Saccharomyces rilevati nei due campionamenti effettuati per ciascuna tesi della LINEA B.1.1 nel corso della vendemmia 2009.

(F1 = dopo l'inoculo, F2= durante la fermentazione)

Vasca N.	Tesi	Replica	S. cerevisiae	(UFC/mL)	non-Saccharomyces (UFC/mL)		
		1	F1	F2	F1	F2	
42	M0A0	1	8,10x10 ⁶	6,25x10 ⁷	9,50x10 ⁵	6,70x10 ⁵	
53	M0A0	2	$1,44 \times 10^6$	$3,09x10^7$	$4,87x10^6$	$1,10x10^5$	
65	M0A0	3	3,75x10 ⁶	$3,00x10^7$	4,56x10 ⁶	4,30x10 ⁵	
39	M0A100	1	$1,24 \times 10^6$	4.15×10^7	$4,20x10^6$	$4,30x10^5$	
56	M0A100	2	$3,44 \times 10^6$	$2,34x10^7$	$3,32x10^6$	$2,43 \times 10^{5}$	
61	M0A100	3	$3,10x10^6$	4,35x10 ⁷	4,95x10 ⁶	$3,20x10^5$	
41	M0A50	1	5,48x10 ⁶	$4,27x10^7$	1,28x10 ⁶	$2,30x10^5$	
51	M0A50	2	$3,10x10^6$	$4,07 \times 10^7$	3.84×10^6	$6,00x10^4$	
66	M0A50	3	$3,64 \times 10^6$	$3,79x10^7$	1,69x10 ⁶	$2,90x10^5$	
43	M100A0	1	6,60x10 ⁶	$4,23x10^7$	5,05x10 ⁶	$6,30x10^5$	
48	M100A0	2	$3,50x10^6$	$4,54 \times 10^7$	$4,31x10^6$	$1,20 \times 10^5$	
58	M100A0	3	$3,52 \times 10^6$	$3,99x10^7$	2,81x10 ⁶	$5,50x10^5$	
44	M100A100	1	5,45x10 ⁶	$4,21x10^{7}$	$1,09x10^6$	8,00x10 ⁵	
55	M100A100	2	$2,89 \times 10^6$	$4,51x10^7$	7.04×10^6	$1,20 \times 10^5$	
62	M100A100	3	$4,77x10^6$	$2,73x10^7$	3,47x10 ⁶	$7,30x10^5$	
47	M100A50	1	$4,00x10^6$	4.81×10^7	$6,75x10^6$	$5,00x10^5$	
54	M100A50	2	$3,59x10^6$	3.62×10^7	$3,56x10^6$	$6,00x10^4$	
59	M100A50	3	$3,37x10^6$	3,81x10 ⁷	2,36x10 ⁶	$4,30x10^5$	
45	M50A0	1	1,50x10 ⁶	$3,31x10^7$	$1,50x10^6$	$2,40x10^5$	
50	M50A0	2	1.87×10^6	$2,62 \times 10^7$	$3,83x10^6$	$3,17x10^5$	
64	M50A0	3	$5,27x10^6$	$3,27x10^7$	3,73x10 ⁶	$4,90x10^5$	
40	M50A100	1	$2,85 \times 10^6$	$4,31x10^7$	$2,86x10^6$	$6,60 \times 10^5$	
49	M50A100	2	$2,58x10^6$	3.73×10^7	$6,78x10^6$	$2,70x10^5$	
60	M50A100	3	$4,95x10^6$	3,99x10 ⁷	2,92x10 ⁶	$5,40x10^5$	
46	M50A50	1	4,15x10 ⁶	$4,17x10^7$	$2,48x10^6$	$4,80x10^5$	
52	M50A50	2	$5,15x10^6$	$3,45 \times 10^7$	$4,89x10^6$	$8,10x10^4$	
63	M50A50	3	$4,74x10^6$	2,37x10 ⁷	8,74x10 ⁶	$9,60x10^5$	
73	M/A100	1	$2,06x10^6$	$4,80x10^7$	$2,67x10^6$	$2,50x10^5$	
72	M100A/	2	$1,63 \times 10^7$	$3,08x10^7$	$6,40x10^6$	$3,88 \times 10^5$	
71	M100A/	3	$5,01 \times 10^6$	$3,50x10^7$	$4,00x10^6$	$5,60 \times 10^5$	

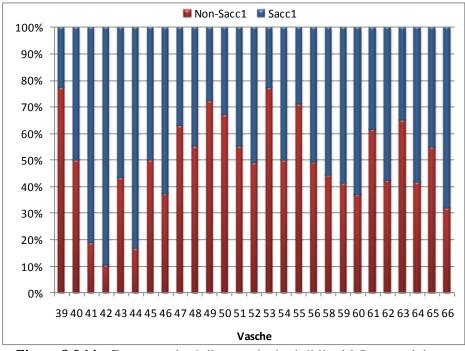


Figura 3.9 bis. Percentuale delle popolazioni di lieviti S. cerevisiae e non-Saccharomyces presenti nelle diverse vasche 15-16 ore dopo l'inoculo

Quando è stato effettuato il primo campionamento circa 16 ore dopo l'inoculo del lievito *starter*, in gran parte delle vasche, i lieviti non-Saccharomyces rappresentavano oltre il 50% della popolazione totale (Fig. 3.9 bis), un livello più elevato rispetto a quanto riscontrato nel 2008 (cfr. figura 3.2). Tuttavia, nel corso dei tre giorni successivi, in corrispondenza del secondo campionamento, la popolazione di S. cerevisiae aveva compiuto un numero di generazioni pari ad una media di 3,40 $\pm 0,65$, valore significativamente maggiore rispetto a quanto riscontrato nell'anno precedente. Tale sviluppo, potrebbe essere una conseguenza di un migliore stato fisiologico - nutrizionale delle cellule del lievito starter che, ricordiamo, nel 2009 è stato reidratato mediante un protocollo automatico grazie alla macchina "CellarMate (Parsec). Occorre comunque anche considerare che la popolazione di lieviti non-Saccharomyces risultava costituita oltre che da *K. apiculata* anche da *C. zemplinina*, una specie nota per presentare una maggiore alcool tolleranza. Pertanto, nell'intervallo di tempo considerato (3 giorni), in seguito all'attività metabolica di entrambe le popolazioni di lievito, sono stati degradati circa il 60-70% degli zuccheri (Tabella 3.12). Tuttavia, dalla quantità di glucosio consumata che è sempre risultata superiore a quella del fruttosio, si evince una maggiore partecipazione dei lieviti *S. cerevisiae*, aspetto confermato anche dalla concentrazione della glicerina che, in caso di una maggiore presenza di *C. zemplinina* avrebbe mostrato valori maggiori.

Tabella n. 3.12 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) a metà della fermentazione – LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

Vasca	Data	Tesi	Replica	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
42	11/10/09		1	17	52	9,38	7,56	0,1
53	12/10/09	M0A0	2	11	39	10,58	7,39	0,17
65	13/10/09		3	15	44	10,24	7,17	0,2
39	11/10/09		1	9	32	10,44	6,88	0,13
56	12/10/09	M0A100	2	6	26	10,87	7,21	0,15
61	13/10/09		3	26	53	8,7	6,47	0,16
41	11/10/09	•	1	9	35	10,05	6,36	0,12
51	12/10/09	M0A50	2	8	31	11,16	8,02	0,17
66	13/10/09		3	26	59	9	7,33	0,18
43	11/10/09		1	18	50	9,81	6,97	0,11
48	12/10/09	M100A0	2	6	29	11,33	7,65	0,2
58	13/10/09		3	15	43	10,41	7,96	0,22
44	11/10/09		1	12	37	9,9	6,72	0,11
55	12/10/09	M100A100	2	7	28	10,75	7,48	0,16
62	13/10/09		3	23	51	9,17	7,3	0,16
47	11/10/09	•	1	15	44	9,66	6,71	0,11
54	12/10/09	M100A50	2	8	32	10,95	7,41	0,17
59	13/10/09		3	19	48	9,35	6,5	0,14
45	11/10/09	•	1	12	40	10,18	6,76	0,15
50	12/10/09	M50A0	2	11	37	10,95	7,47	0,17
64	13/10/09		3	13	40	10,58	7,89	0,17
40	11/10/09	•	1	11	33	9,21	7,21	0,11
49	12/10/09	M50A100	2	10	34	9,72	6,47	0,15
60	13/10/09		3	19	46	9,52	7,22	0,21
46	11/10/09		1	22	51	9,24	7,15	0,11
52	12/10/09	M50A50	2	14	43	10,24	7,78	0,17
63	13/10/09		3	17	41	9,66	6,92	0,18
73	11/10/09		1	10	30	9,21	6,19	0,1
72	12/10/09	M/A100	2	16	39	7,92	6,08	0,16
71	13/10/09		3	25	52	8,26	5,97	0,15

3.2.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Al termine della fermentazione le vasche sono state sottoposte a svinatura e le relative analisi chimiche sono riportate nella tabella 3.13.

Tabella n. 3.13 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) a alla svinatura – LINEA B.1.1 (vendemmia 2009).

Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (mg/L)	Acido Malico (g/L)	Acido Lattico (g/L)
42		1	21/10/09	13,85	1,1	5,88	3,48	0,21	79	0,94	<0,1
53	M0A0	2	22/10/09	14,30	2,2	5,68	3,51	0,25	70	0,90	<0,1
65		3	23/10/09	14,60	1,8	5,80	3,47	0,27	57	0,93	<0,1
39		1	21/10/09	13,00	1,1	6,09	3,48	0,18	64	1,35	<0,1
56	M0A100	2	22/10/09	13,30	1,0	6,03	3,51	0,20	66	1,41	<0,1
61		3	23/10/09	13,55	3,0	6,29	3,38	0,27	66	1,40	<0,1
41		1	21/10/09	13,25	1,0	6,16	3,44	0,20	68	1,11	<0,1
51	M0A50	2	22/10/09	13,85	1,1	5,86	3,50	0,21	67	1,18	0,17
66		3	23/10/09	14,15	2,3	5,97	3,43	0,29	80	1,11	<0,1
43		1	21/10/09	14,20	1,3	5,59	3,55	0,25	56	1,03	<0,1
48	M100A0	2	22/10/09	14,10	1,2	5,49	3,54	0,24	62	0,97	<0,1
58		3	23/10/09	14,25	1,2	5,51	3,51	0,28	56	1,06	<0,1
44		1	21/10/09	12,90	1,0	5,71	3,52	0,18	50	1,41	<0,1
55	M100A100	2	22/10/09	13,30	1,0	5,60	3,54	0,22	60	1,37	<0,1
62		3	23/10/09	13,55	1,6	6,08	3,44	0,28	54	1,54	0,10
47		1	21/10/09	13,50	1,0	5,63	3,52	0,21	51	1,16	<0,1
54	M100A50	2	22/10/09	13,85	1,1	5,52	3,54	0,23	63	1,27	0,16
59		3	23/10/09	13,75	1,3	5,81	3,45	0,26	58	1,32	<0,1
45		1	21/10/09	13,90	1,5	5,20	3,52	0,24	61	0,94	<0,1
50	M50A0	2	22/10/09	14,50	1,7	5,52	3,54	0,26	66	0,93	<0,1
64		3	23/10/09	14,10	1,1	5,70	3,47	0,25	54	0,90	<0,1
40		1	21/10/09	12,10	1,0	6,32	3,44	0,17	53	1,70	<0,1
49	M50A100	2	22/10/09	13,40	1,0	5,69	3,53	0,23	65	1,42	<0,1
60		3	23/10/09	13,30	1,3	6,19	3,40	0,31	56	1,43	<0,1
46		1	21/10/09	13,75	1,1	5,74	3,51	0,20	60	1,19	<0,1
52	M50A50	2	22/10/09	14,15	1,4	5,62	3,54	0,24	65	1,15	<0,1
63		3	23/10/09	14,00	1,3	6,03	3,45	0,29	27	1,16	<0,1
73		1	21/10/09	12,10	1,0	6,58	3,43	0,17	57	1,72	<0,1
72	M/A100	2	22/10/09	13,25	1,0	5,97	3,50	0,23	77	1,75	<0,1
71		3	23/10/09	13,40	3,7	6,35	3,41	0,28	68	1,58	<0,1

Diversamente da quanto riscontrato per le vinificazioni condotte nel 2008, nel 2009 tutte le fermentazioni alcoliche, ad eccezione della vasca n. 71, sono state condotte a termine.

3.2.6 Analisi Statistica dei dati

Al fine di valutare se le popolazioni dei lieviti fossero state influenzate significativamente dalla presenza di MOG e di ASM ai vari livelli previsti dal piano sperimentale, sono stati sottoposti ad analisi della varianza, i seguenti parametri:

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18 ore dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18 ore dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Percentuale dei non-Saccharomyces sul totale dei lieviti 18h dopo l'inoculo del lievito starter
- d. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)
- e. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione (non-SACC2)
- f. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- g. Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento
- h. Mortalità dei lieviti non-Saccharomyces

Tabella n. 3.14 Variabili significative e non significative per i parametri considerati nell'analisi statistica.

	SIGNIFICATIVE	NON SIGNIFICATIVE
SACC 2	REPLICA	MOG, ASM e ASM*MOG
NON-SACC 2	REPLICA	MOG, ASM e ASM*MOG
RENDIMENTO DI CRESCITA SACC	REPLICA	MOG, ASM e ASM*MOG
% NON-SACC SUL TOTALE	REPLICA	MOG, ASM e ASM*MOG

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica dei soli parametri per i quali almeno una variabile è risultata statisticamente significativa.

d. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)

	Analysis	of Va	ariance		
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
MOG	2.074E+010	2	1.037E+010	0.000	1.000
ASM	1.681E+014	2	8.404E+013	2.500	0.143
REPLICA	4.855E+014	2	2.427E+014	7.223	0.016
ASM*MOG	2.151E+014	4	5.378E+013	1.600	0.265
REPLICA*ASM*MOG	6.773E+014	8	8.466E+013	2.519	0.106
Error	2.689E+014	8	3.361E+013		

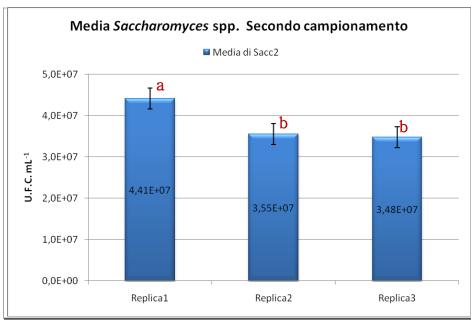


Figura n. 3.10 Effetto della replica sulle popolazioni di S. cerevisiae secondo campionamento - LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

La popolazione dei lieviti *S. cerevisiae* in corrispondenza del campionamento effettuato durante la fermentazione presenta valori significativamente diversi per la replica1 rispetto alle altre due. Per questo motivo tale serie di dati non può essere considerata come una "reale" replica.

e. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione

	Analysis of Variance											
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value							
MOG	5.818E+010	2	2.909E+010	1.071	0.366							
ASM	1.083E+011	2	5.413E+010	1.994	0.169							
REPLICA	8.116E+011	<mark>2</mark>	4.058E+011	14.946	0.000							
ASM*MOG	1.279E+011	4	3.198E+010	1.178	0.358							
Error	4.344E+011	16	2.715E+010									

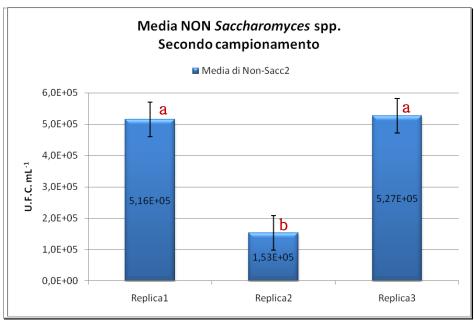


Figura n. 3.11 Effetto della replica sulle popolazioni dei non-Saccharomyces secondo campionamento – LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

La popolazione dei lieviti non-Saccharomyces in corrispondenza del campionamento effettuato durante la fermentazione presenta valori significativamente più bassi per la replica 2 rispetto alle altre due. Per questo motivo, per il parametro considerato, tale serie di dati non può essere considerata come una "reale" replica.

e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae

	Analysis of Variance												
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value								
MOG	1.927E+012	2	9.633E+011	0.018	0.982								
ASM	1.472E+014	2	7.362E+013	1.362	0.284								
REPLICA	4.172E+014	2	2.086E+014	3.860	0.043								
ASM*MOG	1.891E+014	4	4.727E+013	0.875	0.501								
Error	8.646E+014	16	5.404E+013										

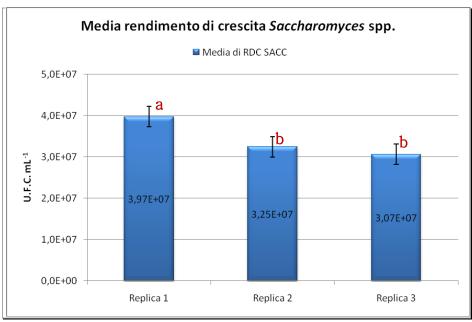


Figura n. 3.12 Effetto della replica sul rendimento di crescita dei lieviti S. cerevisiae secondo campionamento - LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

Il rendimento di crescita dei lieviti *S. cerevisiae* presenta valori significativamente più alti per la replica 1 rispetto alle altre due. Per questo motivo, per il parametro considerato, tale serie di dati non può essere considerata come replica.

Considerando nel globale i risultati ottenuti dall'analisi della varianza multivariata, emerge che per i parametri microbiologici considerati, l'unica variabile che risulta essere statisticamente significativa è la replica.

Successivamente all'analisi della varianza, condotta con la finalità di valutare in modo globale l'effetto dei trattamenti sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti Principali considerando sia i parametri chimici a densità del mosto pari a 1020 (glucosio Glu, fruttosio (Fru), glicerina (Gly), Ac. Acetico ed etanolo (EtOH). che i seguenti parametri microbiologici: popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s 18h dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1), popolazione di *S.*

cerevisiae al secondo campionamento (Sacc2), La distribuzione delle variabili è riportata in figura 3.13 e il grafico relativo alla PCA in figura 3.14. Dall'analisi delle componenti principali non è possibile evidenziare una distribuzione delle tesi in funzione dei diversi trattamenti.

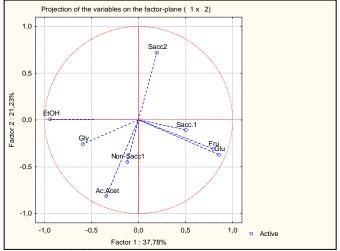


Figura n. 3.13 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

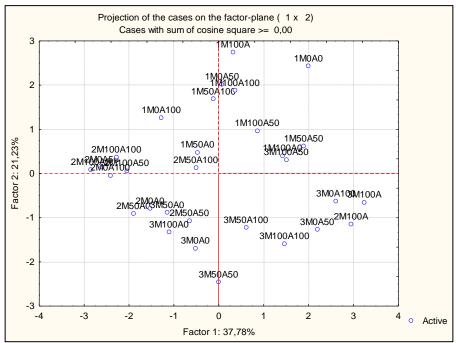


Figura n. 3.13 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.1.1 (vendemmia 2009)

3.3 Linea di ricerca B1.2 (anno 2008)

La linea di ricerca B1.2, che ha riguardato lo studio degli effetti di diverse modalità di raccolta sulla qualità dell'uva, ha portato all'allestimento di 9 vinificazioni ottenute dalla replicazione in tre blocchi (R1-R2-R3), delle tre tesi descritte di seguito:

- Raccolta Manuale
- Raccolta meccanica con precernita
- Raccolta Meccanica

3.3.1 Composizione chimica dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche dei mosti al riempimento delle vasche sono riportati in tabella 3.15.

Tabella n. 3.15 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) all'inizio della
fermentazione - LINEA B.1.2 (vendemmia 2008)

VASCA N.	DATA	TESI	Etanolo (v/v %)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa totale (mg/L)
69	24/09/08		0,65	205	4,22	3,79	0,12	39
70	24/09/08	RMaNoCe	0,60	208	4,16	3,81	0,13	60
74	24/09/08		0,65	203	4,25	3,75	0,16	36
67	24/09/08		0,50	205	4,30	3,76	0,09	36
72	24/09/08	RMeNoCe	0,6	206	4,2	3,81	0,06	43
73	24/09/08		0,65	209	4,44	3,79	0,08	54
68 71	24/09/08 24/09/08	RMePreNoCe	0,.35 0,60	209 203	4,22 4,30	3,78 3,79	0,07 0,09	45 44
75	24/09/08	Rivier renuce	0,4	209	4,04	3,79	0,05	63

3.3.2 Valutazione dell'inoculo

Il lotto del lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 utilizzato per tutte le vinificazioni ha mostrato un numero di cellule vitali pari a 9,5x10⁹ per grammo di prodotto per cui, considerando che sono stati aggiunti 30g/hL e che ogni vasca conteneva circa 8 hL di

mosto, per ciascuna fermentazione il <u>valore teorico</u> <u>dell'inoculo era pari a 2,85x10⁶ cellule per millilitro di</u> mosto.

3.3.3 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figura 3.16). Dall'analisi degli andamenti non si evidenzia alcuna differenza significativa né nella tre repliche né nella cinetica del processo fermentativo.

3.3.4 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione e dopo svinatura

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato nella tabella 3.16.

Tabella 3.16. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati per la Linea B1.2. dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I), durante la fermentazione alcolica (F) e dopo svinatura (S).

Nº TESI	N° TESI R		MPISTICA	TEM	IPISTICA	TEMPISTICA		
N IESI	I.	I (h)*	Data	F (g)**	F (g)** Data		Data	
3	R1	17	24 settembre	5	28 settembre	17	10 ottobre	
3	R2	17	24 settembre	5	28 settembre	17	10 ottobre	
3	R3	17	24 settembre	5	28 settembre	17	10 ottobre	

^{*} ore dopo l'inoculo

I risultati relativi alle popolazioni dei lieviti *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyces* presenti durante la fermentazione e dopo svinatura nelle singole vasche sono mostrati nella tab. 3.17.

Le densità cellulari delle due popolazioni ottenute in corrispondenza del primo campionamento, cioè 17 ore dopo l'inoculo del lievito *starter*, hanno evidenziato una netta prevalenza di *S. cerevisiae* (*range* 60-95% dei lieviti totali)

^{**} giorni di fermentazione

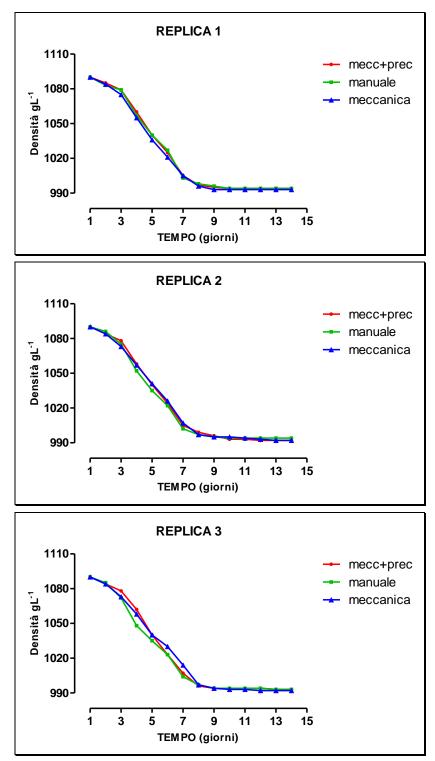


Figura 3.15. Andamento della densità del mosto-vino durante la fermentazione alcolica in relazione alle diverse tesi

Tabella n. 3.17 Valori delle popolazioni di lieviti S. cerevisiae e non-Saccharomyces rilevati nei tre campionamenti effettuati per ciascuna tesi della LINEA B.1.2 nel corso della vendemmia 2008. (F1 = dopo l'inoculo, F2= durante la fermentazione; F3 = dopo la svinatura)

Vasca N.	Tesi	Replica	S. cerevisiae (UFC/mL)			non-Saccharomyces (UFC/mL)			
			F1	F2	F3	F1	F2	F3	
69	RMaNoCe	1	$4,90x10^6$	$4,07x10^7$	$1,06x10^7$	$1,84 \times 10^6$	$9,10x10^4$	9,00x10 ¹	
70	RMeNoCe	2	$4,20x10^6$	$4,69x10^7$	$9,50x10^6$	$3,32x10^6$	$8,44x10^4$	$9,00x10^{1}$	
74	RMePreNoCe	3	$1,66x10^6$	4,31x10 ⁷	$1,17x10^{7}$	1,09x10 ⁶	9,31x10 ⁴	9,00x10 ¹	
67 72 73	RMaNoCe RMeNoCe RMePreNoCe	1 2 3	5,00x10 ⁶ 2,92x10 ⁶ 5,40x10 ⁶	5,20x10 ⁷ 4,06x10 ⁷ 3,84x10 ⁷	1,15x10 ⁷ 1,25x10 ⁷ 1,20x10 ⁷	9,50x10 ⁵ 1,69x10 ⁵ 5,32x10 ⁵	3,25x10 ⁴ 1,62x10 ⁴ 1,08x10 ⁴	9,00x10 ¹ 9,00x10 ¹ 9,00x10 ¹	
68 71 75	RMaNoCe RMeNoCe RMePreNoCe	1 2 3	2,57x10 ⁶ 4,57x10 ⁶ 1,21x10 ⁶	4,82x10 ⁷ 5,45x10 ⁷ 4,92x10 ⁷	1,19x10 ⁷ 1,22x10 ⁷ 1,33x10 ⁷	6,55x10 ⁵ 3,82x10 ⁵ 5,55x10 ⁵	7,06x10 ⁴ 3,27x10 ⁴ 6,40x10 ⁴	9,00x10 ¹ 9,00x10 ¹ 9,00x10 ¹	

Successivamente, i lieviti *S. cerevisiae* hanno raggiunto il massimo sviluppo, mentre i non-*Saccharomyces*, rappresentati principalmente dalla specie *K. apiculata*, sono diminuiti in seguito alla formazione di etanolo che ha raggiunto dopo 4 giorni di fermentazione un valore di circa 8-9 gradi (Tab. 3.18).

Tabella n. 3.18 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) a metà della fermentazione – LINEA B.1,2 (vendemmia 2008)

Vasca	Tesi	Rep lica	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Zuccheri (g/L)	Etanolo (%v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
69		1	22	45	67	8,22	6,53	0,05
70	RMaNoCe	2	19	42	61	8,57	6,84	0,06
74		3	17	39	56	8,66	6,66	0,05
67 72 73	RM eNo Ce	1 2 3	13 18 21	35 42 45	48 60 66	9,19 8,5 8,16	6,54 6,24 6,12	0,04 0,07 0,07
68 71 75	RMePreNo Ce	1 2 3	18 22 16	42 47 39	60 69 55	8,62 7,97 8,9	6,36 6,09 6,42	0,07 0,11 0,11

3.3.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Al termine della fermentazione le vasche sono state sottoposte a svinatura e le relative analisi chimiche sono riportate nella tabella 3.19. Dai risultati emerge che tutte le fermentazioni alcoliche sono state condotte a termine.

Tabella n. 3.19 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) alla svinatura – LINEA B.1.2 (vendemmia 2008)

VASCA N.	DATA	TE SI	Etano lo (v/v %)	Zuccheri (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa Totale (mg/L)	Acido malico (g/L)
69	07/10/2008		12,4	1,1	3,74	0,15	48	1,27
70	07/10/2008	RM aNo Ce	12,4	1	3,73	0,14	48	1,23
74	07/10/2008		12,05	1	3,72	0,14	50	1,19
67	07/10/2008		12,15	1	3,67	0,15	41	1,09
72	07/10/2008	RMeNoCe	12	1	3,71	0,15	38	1,46
73	07/10/2008		12,35	1	3,73	0,16	48	1,4
68	07/10/2008		12,3	1	3,71	0,15	37	1,38
71	07/10/2008	RM ePreNo Ce	12,15	1	3,73	0,16	40	1,43
75	07/10/2008		12,05	1	3,71	0,17	39	1,25

3.3.6 Analisi Statistica dei dati

Al fine di valutare in modo globale l'effetto delle diverse modalità di raccolta sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti Principali (figura 3.16), prendendo in considerazione i parametri chimici, a densità del mosto di 1020, glucosio (Glu), fruttosio (Fru), glicerina (Gly), Ac. Acetico ed etanolo (EtOH) e quelli microbiologici: popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1), popolazione di S. cerevisiae al secondo campionamento (Sacc2), La distribuzione delle variabili è riportata in figura 3.16 e il grafico relativo alla PCA in figura 3.17. Rispetto alla prima componente non è possibile osservare raggruppamenti, mentre rispetto alla seconda componente le tesi MaNoCe (manuale senza cernita) si distribuiscono nei quadranti superiori, quelle MeNoCe (meccanica senza cernita) sono disposte al centro

e quelle MePreCe (meccanica con precernita) si posizionano nei quadranti inferiori. Quindi per il posizionamento delle prime peseranno maggiormente i parametri Non-Sacc1, Sacc1 e glicerina; mentre per le ultime (MePreCe) i parametri Sacc2 ed Ac. Acetico.

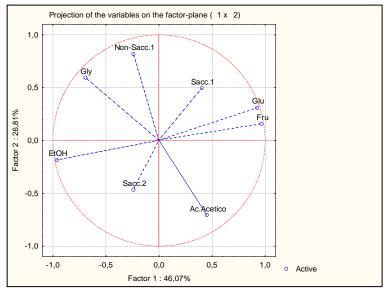


Figura n. 3.16 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.1.2 (vendemmia 2008)

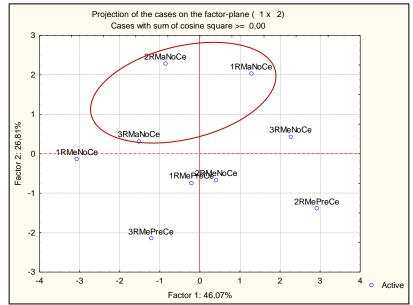


Figura n. 3.17 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali (1,2, e 3 = repliche), (MeNoCe=meccanina no precernita, MaNoCe=manuale no precernita, MePreCe=meccanica con precernita)

3.4 Linea di ricerca B1.2 (anno 2009)

3.4.1 Composizione chimica dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche dei mosti al riempimento delle vasche sono riportate nella tabella 3.20.

Tabella n. 3.20 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) all'inizio della fermentazione – LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

Vasca	Tesi	Rep lica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	Ac id ità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (mg/L)
68	RMaNo Ce	1	24/09/09	0,70	202	5,10	3,68	0,21	107
70	RMaNo Ce	2	24/09/09	<0,10	206	4,89	3,70	0,13	122
74	RMaNo Ce	3	24/09/09	0,50	206	4,94	3,66	0,13	91
69	RMeNoCe	1	24/09/09	1,20	178	5,34	3,63	0,15	85
71	RMeNo Ce	2	24/09/09	0,85	193	5,27	3,69	0,13	84
75	RMeNoCe	3	24/09/09	0,85	195	5,23	3,66	0,12	82
67	RMePreNoCe	1	24/09/09	1,45	187	5,25	3,71	0,16	129
72	RMePreNoCe	2	24/09/09	1,15	192	5,23	3,68	0,13	83
73	RMePreNoCe	3	24/09/09	1,25	185	5,32	3,69	0,13	95

3.4.2 Valutazione dell'inoculo

Il lotto del lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 utilizzato per tutte le vinificazioni ha mostrato un numero di cellule vitali pari a $2x10^{10}$ per grammo di prodotto per cui, considerando che sono stati aggiunti 28g/hL e che ogni vasca conteneva circa 7 hL di mosto, per ciascuna fermentazione il <u>valore teorico</u> dell'inoculo era pari a $5.6x10^6$ cellule per millilitro di mosto.

3.4.3 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figura 3.18). Analizzando le cinetiche di fermentazione, con lo stesso approccio metodologico riportato nel par. 3.13 a pag. 21, è stata evidenziata una velocità significativamente (p=0,05) maggiore solo per le vinificazioni allestite con uva raccolta meccanicamente rispetto a quelle allestite con uva raccolta a mano.

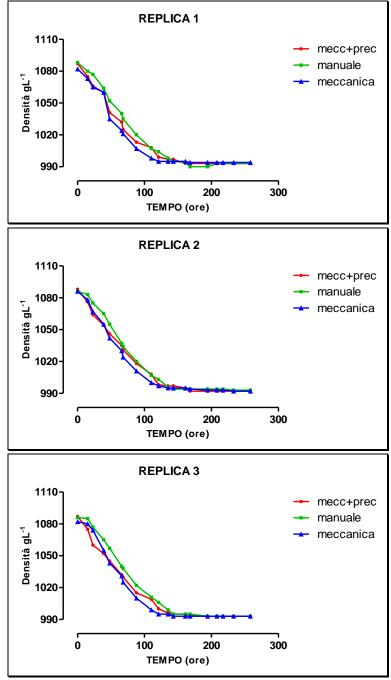


Figura 3.18. Andamento della densità del mosto-vino durante la fermentazione alcolica in relazione alle diverse tesi

3.4.4 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione e dopo svinatura

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato nella tabella 3.21.

Tabella 3.21. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati per la Linea B1.2. dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I), durante la fermentazione alcolica (F).

N° TESI	R	TEN	TEMPISTICA		TEMPISTICA		TEMPISTICA	
N IESI		I (h)*	Data	F (g)**	Data	S (g)**	Data	
3	R1	18,5	24 settembre	4	27 settembre	10	21 ottobre	
3	R2	18,5	24 settembre	4	27 settembre	10	21 ottobre	
3	R3	18,5	24 settembre	4	27 settembre	10	21 ottobre	

^{*} ore dopo l'inoculo

I risultati relativi alle popolazioni dei lieviti *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyces* presenti durante la fermentazione e dopo svinatura nelle singole vasche sono mostrati nella tab. 3.22.

Considerando i dati quantitativi delle due popolazioni determinate in corrispondenza del primo campionamento dopo l'inoculo del lievito *starter*, è risultata evidente la predominanza di *S. cerevisiae*.

Tabella n. 3.22 Valori delle popolazioni di lieviti S. cerevisiae e non-Saccharomyces rilevati nei tre campionamenti effettuati per ciascuna tesi della LINEA B.1.2 nel corso della vendemmia 2009. (F1 = dopo l'inoculo, F2= durante la fermentazione)

Vasca N.	Tesi	Replica	S. cerevisiae (UFC/mL)		non-Saccharomyces (UFC/mL)		
			F1	F2	F1	F2	
68	RMaNoCe	1	1,59x10 ⁶	1,95x10 ⁷	5,54x10 ⁵	1,38x10 ⁶	
70	RMaNoCe	2	$3,60 \times 10^6$	$2,76x10^7$	$7,11x10^5$	$1,10x10^6$	
74	RMaNoCe	3	4,00x10 ⁶	$3,22x10^7$	$7,76x10^5$	3,25x10 ⁵	
69	RMeNoCe	1	$6,50x10^6$	$3,30x10^7$	$2,20x10^5$	$3,00x10^4$	
71	RMeNoCe	2	$4,50x10^6$	$5,20x10^7$	$4,63x10^5$	$6,05x10^4$	
75	RMeNoCe	3	4,00x10 ⁶	$3,84x10^7$	4,25x10 ⁵	5,10x10 ⁴	
67	RMePreNoCe	1	$1,10x10^6$	$2,93x10^7$	$3,83x10^5$	$6,00x10^4$	
72	RMePreNoCe	2	$8,70x10^6$	$3,81x10^7$	$3,93x10^5$	$1,55x10^4$	
73	RMePreNoCe	3	$5,80 \times 10^6$	$3,61 \times 10^7$	$2,70x10^5$	$3,35x10^3$	

^{**} giorni di fermentazione

Successivamente, i lieviti *S. cerevisiae* hanno raggiunto valori massimi dell'ordine di 3-5x10⁷ UFCmL⁻¹, mentre i non-*Saccharomyces*, rappresentati principalmente sia da *K. apiculata* che da *C. zemplinina* sono rimasti a livelli compresi tra 10³ e 10⁶ UFCmL⁻¹, quando dopo 4 giorni di fermentazione, erano presenti 8-9 gradi alcolici (Tab. 3.23).

					_ (,	emmia 2	000)	
Vasca N.	Data	Tesi	Rep lica	Gluco sio (g/L)	Frutto sio (g/L)	Etanolo (%v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
68	24/09/09		1	20	41	8,51	7,08	0,11
70	24/09/09	RMaNo Ce	2	18,5	39	8,99	6,97	0,12
74	24/09/09		3	22	44	8,69	6,94	0,13
69	24/09/09		1	59	22	9,58	7,09	0,1
71	24/09/09	RMeNoCe	2	9	28	9,56	7,18	0,11
75	24/09/09		. 3	. 8	27	9,63	7,07	0,12
67	24/09/09		1	13	32	9,86	7	0,15
72	24/09/09	RM ePreNo Ce	2	17	39	9,39	6,68	0,16
73	24/09/09		3	13	35	9,03	6,51	0,14

3.4.5 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Al termine della fermentazione le vasche sono state sottoposte a svinatura e le relative analisi chimiche sono riportate nella tabella 3.24. Dai risultati emerge che tutte le fermentazioni alcoliche sono state condotte a termine.

Tabella n. 3.24 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) alla svinatura – LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (%v/v)	Tuchei (g/L)	Acidità Totale (g/L)	рН	Acidītà Volatīle (g/L)	Solforosa (mg/L)	Acido Malico (g/L)	Acido Lattico (g/L)
68	RMaNoCe	1	6/10,09	12,70	10	608	3,51	0,19	66	1,29	⊲0,1
70	RMaNoCe	2	6/10/09	12,60	10	6,18	3,49	0,17	70	1,26	<0,1
74	RMaNoCe	3	6/10/09	12,80	10	6,24	3,47	0,18	71	1,20	<0,1
69 71 75	RMeNo Ce RMeNo Ce RMeNo Ce	1 2 3	6/10.09 6/10.09 6/10.09	12,00 12,40 12,25	1 p 1 p 1 p	6p2 6p0 599	3,52 3,51 3,49	0,17 0,18 0,19	49 56 48	1,15 1,21 1,12	ଶ୍ରୀ ଶ୍ରୀ ଶ୍ରୀ
67 72 73	RMePreNo Ce RMePreNo Ce RMePreNo Ce	1 2 3	6/10.09 6/10.09 6/10.09	12,65 12,70 12,55	1 p 1 p 1 p	5,88 5,96 5,84	3,53 3,52 3,53	0,18 0,20 0,23	61 56 55	1,24 1,18 1,14	⊲0,1 ⊲0,1 ⊲0,1

3.4.6 Analisi Statistica dei dati

Al fine di valutare se le popolazioni dei lieviti fossero state influenzate significativamente dalle diverse tipologie di raccolta delle uve previste dal piano sperimentale, sono stati sottoposti ad analisi della varianza, i seguenti parametri:

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18 ore dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18 ore dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione (non-SACC2)
- e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- f. Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento
- g. Mortalità dei lieviti non-Saccharomyces
- h. Percentuale dei non-Saccharomyces sul totale dei lieviti 18h dopo l'inoculo del lievito starter
- i. Percentuale dei non-Saccharomyces sul totale dei lieviti durante la fermentazione (% NON-SACC2)
- j. Rapporto % non-Saccharomyces e S. cerevisiae durante la fermentazione (NON-SACC2/SACC2)

Nella tabella 3.25 sono mostrate le variabili in funzione della significatività

Tabella n. 3.25 Variabili significative e non significative per i parametri considerati nell'analisi statistica.

	SIGNIFICATIVE	NON SIGNIFICATIVE
NON-SACC 1	TESI	REPLICA
SACC 2	TESI	REPLICA
NON-SACC 2	TESI	REPLICA
NON-SACC2/SACC2	TESI	REPLICA
MORTALITA % NON-SACC	TESI	REPLICA
% NON-SACC 2	TESI	REPLICA

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica dei soli parametri per i quali almeno una variabile è risultata statisticamente significativa.

b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo

Analysis of Variance							
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TESI\$	2.039E+011	2	1.019E+011	8.520	0.018		
Error	7.178E+010	6	1.196E+010				

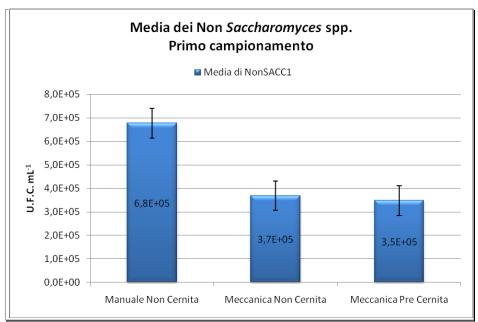


Figura n. 3.19 Effetto del trattamento sulle popolazioni dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

La popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo presenta valori significativamente più alti per la tesi Manuale Non cernita rispetto alle altre due

c. <u>Popolazione</u> di *S. cerevisiae* in fermentazione

	Analysis of Variance						
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TESI\$	3.245E+014	2	1.622E+014	7.083	0.048		
REPLICA	2.251E+014	2	1.126E+014	4.914	0.084		
Error	9.162E+013	4	2.290E+013				

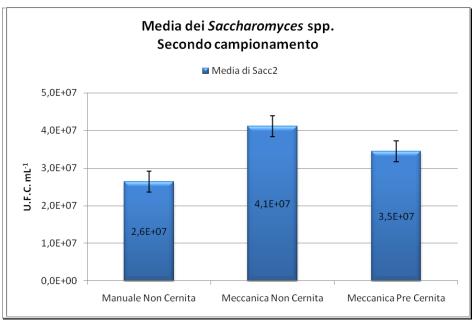


Figura n. 3.20 Effetto del trattamento sulle popolazioni di S. cerevisiae secondo campionamento - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

La tesi Meccanica Non Cernita presenta valori della popolazione *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo significativamente più alti rispetto alla tesi Manuale Non Cernita, mentre non risulta statisticamente diversa rispetto all'altra tesi.

d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione

Analysis of Variance							
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TESI\$	1.614E+012	2	8.072E+011	8.077	0.020		
Error	5.996E+011	6	9.994E+010				

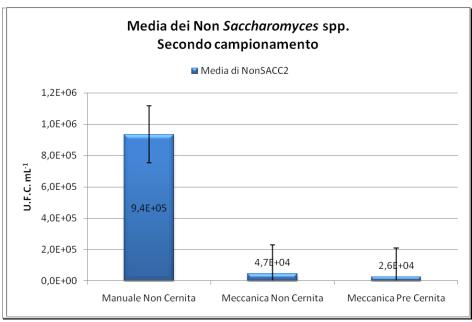


Figura n. 3.21 Effetto del trattamento sulle popolazioni dei non-Saccharomyces secondo campionamento - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

La popolazione dei non-Saccharomyces, rilevata in corrispondenza del secondo campionamento, presenta valori significativamente maggiori per la tesi Manuale Non cernita rispetto alle altre due

g. Mortalità dei lieviti non-Saccharomyces

Analysis of Variance							
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TESI\$	10047.318	2	5023.659	12.706	0.007		
Error	2372.198	6	395.366				

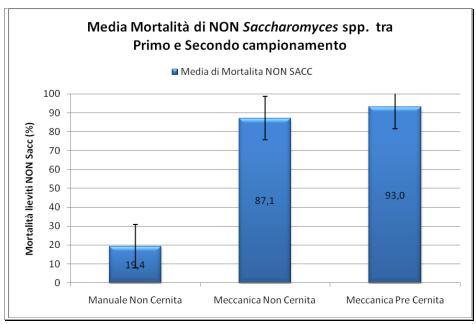


Figura n. 3.22 Effetto del trattamento sulla mortalità dei non-Saccharomyces tra il primo ed il secondo campionamento - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

La tesi Manuale Non Cernita presenta valori di mortalità della popolazione *dei non-Saccharomyces* tra il primo ed il secondo campionamento significativamente più bassi rispetto alla altre due tesi.

i. <u>Percentuale dei non-Saccharomyces</u> sul totale dei lieviti durante la fermentazione

Analysis of Variance							
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TESI\$	27.569	2	13.784	5.260	0.048		
Error	15.724	6	2.621				

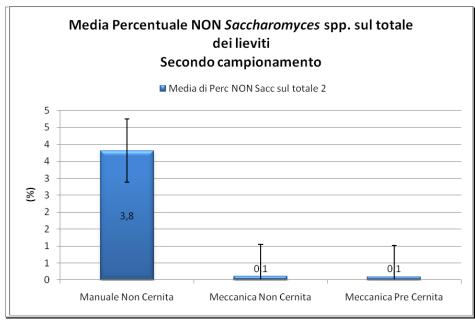


Figura n. 3.23 Media % delle popolazioni dei non-Saccharomyces secondo campionamento - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

In corrispondenza del secondo campionamento, la tesi Manuale Non Cernita presenta valori percentuali di non-Saccharomyces sul totale dei lieviti significativamente più alte rispetto alle altre due tesi.

Successivamente all'analisi della varianza multivariata, al fine di valutare in modo globale l'effetto delle diverse tipologie di raccolta sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti principali (figura 3.24). Per tale analisi sono stati presi in considerazione sia parametri chimici, a densità del mosto 1020, che microbiologici: popolazione di *S. cerevisiae* e non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1), popolazione di *S. cerevisiae* al secondo campionamento (Sacc2), glucosio (Glu), fruttosio (Fru), glicerina (Gly), Ac. Acetico ed etanolo (EtOH). La distribuzione delle variabili è riportata in figura 3.25.

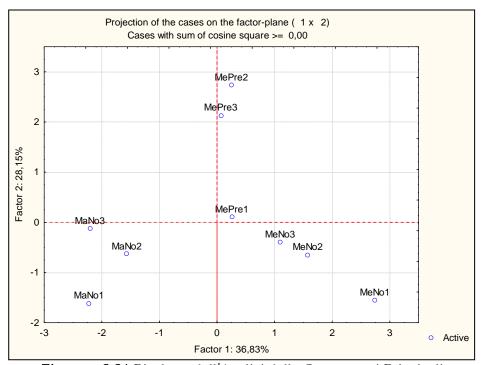


Figura n. 3.24 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali (1,2, e 3 = repliche), (MeNo=meccanina no precernita, MaNo=manuale no precernita, MePre=meccanica con precernita) - vendemmia 2008

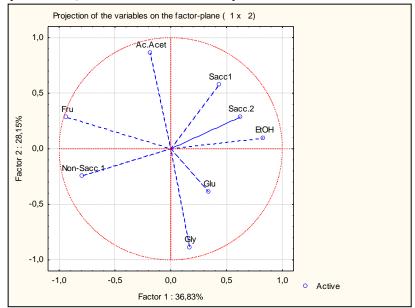


Figura n. 3.25 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.1.2 (vendemmia 2009)

Osservando la distribuzione delle tesi nei quadranti è possibile affermare che: rispetto alla prima componente le tesi MeNoCe (meccanica senza cernita) si dispongono nei quadranti di destra e quindi sono caratterizzate da un maggior livello di saccaromiceti rilevati sia nel primo che nel secondo e dalla presenza di maggiori concentrazioni di etanolo ma soprattutto dal maggior livello di glucosio e glicerina; le tesi MaNoCe (manuale senza cernita) invece si dispongono nei quadranti di sinistra in quanto caratterizzati da popolazioni di non-Saccharomyces più elevate e maggiori livelli di fruttosio. Rispetto alla seconda componente le tesi MePreCe (meccanica con precernita) ad eccezione di quella della replica 1 si differenziano dalle altre tesi in quanto posizionate nei riquadri superiori, ovvero perché caratterizzate da un maggior contenuto di acido acetico e da popolazioni più elevate di Sacc1.

3.5 Linea di ricerca B.4 (anno 2008)

Linea B.4 finalizzata alla massimizzazione del potenziale enologico attraverso diverse tecniche di vinificazione, ha previsto il seguente piano sperimentale:

Trattamento Pre-fermentativo	Temperatura Fermentazione	Salasso
Nessun trattamento: TEST	20° C	Senza Salasso: NoS
Macerazione prefermentativa a		
freddo: MPF	30° C	Con Salasso del
Crioestrazione uve: CRIO		20% di mosto: S

Considerando la combinazione dei diversi trattamenti con le due temperature di fermentazione e che sono state effettuate tre repliche, complessivamente sono state allestite le seguenti 36 vinificazioni:

12 tesi = (Nessun trattamento, macerazione prefermentativa a freddo, Crioestrazione) X (due temperature di fermentazione a 20° e 30°C) X (senza salasso e con salasso del 20% di mosto)

replicate in 3 blocchi (R1-R2-R3)

3.5.1 Composizione chimica dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche dei mosti al riempimento delle vasche sono riportate nella tabella 3.26.

Tabella n. 3.26 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) all'inizio della fermentazione – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

VASCA	DATA	TESI	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (g/L)
1	26/09/08		0,03	242	3,54	4,16	0,06	60
8		CRIO20NoS						
32	29/09/08		1,35	217	4,61	3,58	0,12	65
6	26/09/08		0,06	234	4,36	4,15	0,05	66
16		CRIO20S						
29	29/09/08		1,40	217	4,47	3,62	0,11	59
4	26/09/08		0,08	227	4,31	3,07	0,08	77
18		CRIO30NoS						
37	29/09/08		2,55	195	5,10	3,54	0,09	63
23	26/09/08		0,01	241	3,45	3,08	0.06	62
11		CRIO30S						
33	29/09/08		3,25	181	5,43	3,51	0,08	62
3	26/09/08		0,05	232	4,14	4,08	0,08	63
17		MPF20NoS						
27	29/09/08		1,10	214	4,12	3,61	0,13	. 73
22	26/09/08		1,25	233	4,01	4,08	0,13	60
15		MPF20S						
26	29/09/08		1,55	162	4,13	3,65	0,13	75
2	26/09/08		0,06	230	3,06	3,07	0,07	55
9		MPF30NoS						
31	29/09/08		0,45	232	3,85	3,67	0,10	67
24	26/09/08		0,07	231	4,15	3,07	0,01	60
7		MPF30S						
30	29/09/08		1,05	201	3,96	3,67	0,14	61
5	26/09/08		1,03	217	5,17	4,03	0,09	68
14		TEST20NoS						
35	29/09/08		3,75	171	5,58	3,52	0,08	75
21	26/09/08		1,03	218	5,06	4,04	0,01	66
10		TEST20S						
28	29/09/08		4,45	159	5,71	3,55	0,09	99
20	26/09/08		1,55	216	5,36	3,59	0,07	72
12		TEST30NoS						
36	29/09/08		6,95	116	6,41	3,51	0,18	80
25	26/09/08		1,06	215	5,35	4,01	0.08	76
13		TEST30S						
34	29/09/08		8,60	88	6,55	3,59	0,30	70

3.5.2 Valutazione dei profili termici delle diverse vinificazioni

La temperatura rappresenta uno dei parametri fisicoambientali del mosto-vino più importanti per la regolazione dell'attività microbica e di conseguenza per l'evoluzione della fermentazione alcolica. A tal proposito per poter confrontare e valutare in modo ottimale i risultati ottenuti chimici microbiologici е nel corso della sperimentazione, è di fondamentale importanza in fase preliminare, verificare per ciascuna vinificazione che i profili di temperatura abbiano rispettato le condizioni e gli andamenti desiderati.

Per verificare il corretto andamento della temperatura, a partire dal primo giorno del riempimento delle vasche e per tutta la durata della fermentazione è stata rilevata in continuo la temperatura del mosto-vino e sono stati determinati i valori di temperatura media ogni 12h in modo da ottenere i profili termici di ciascuna vinificazione.

La figura 3.26 riporta i profili termici delle fermentazioni condotte a 20°C divisi per replica.

Osservando i profili termici delle tesi TEST e CRIO si nota come solamente per le vinificazioni della replica 3 siano stati rispettati gli andamenti previsti dal protocollo. Infatti, nel caso della replica 1 e 2, ad eccezione della tesi TEST20S, durante la fermentazione la temperatura ha superato i 20°C previsti raggiungendo valori intrno ai 25°C.

quanto riguarda i profili termici, relativi MPF. trattamento di occorre specificare che tale prevedeva fase di macerazione trattamento una prefermentativa in vasca, della durata di cinque giorni, a temperature inferiori ai 10°C, al termine della quale il pigiato doveva essere portato e mantenuto in modo controllato alla temperatura di fermentazione di 20°C.

Osservando i profili termici corrispondenti alle tre repliche si nota come in nessun caso la fase di macerazione prefermentativa si sia svolta secondo quanto progettato.

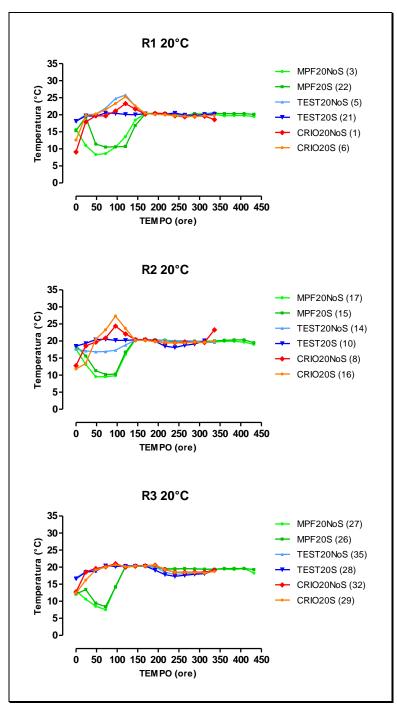


Figura n. 3.26 Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 20°C – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

Infatti, dopo le prime 24 ore dalla messa in vasca del mosto, necessarie per consentire il suo raffreddamento, le temperature non sono quasi mai scese al di sotto dei 10°C e le basse temperature sono state mantenute al massimo per i primi due giorni di macerazione prefermentativa, probabilmente a causa delle difficoltà del sistema di raffreddamento di raggiungere temperature così basse. A partire dal quarto giorno di fermentazione la temperatura è aumentata fino a 20°C ed è rimasta attorno a tale valore fino alla fine della fermentazione.

I problemi sottolineati in precedenza si sono riscontrati anche in alcune delle vinificazioni condotte a 30°C (figura 3.27).

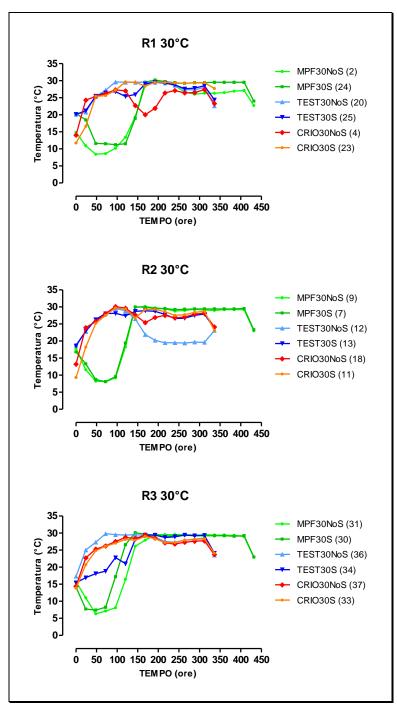


Figura n. 3.27 Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 30°C – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

3.5.3 Valutazione dell'inoculo

Il lotto del lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 utilizzato per tutte le vinificazioni ha mostrato un numero di cellule vitali pari a 9.5×10^9 per grammo di prodotto per cui, considerando che sono stati aggiunti 30 g/hL e che ogni vasca conteneva circa 8 hL di mosto, per ciascuna fermentazione il <u>valore teorico dell'inoculo era pari a 2.85×10^6 cellule per millilitro di mosto.</u>

3.5.4 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figure 3.28-3.29). Osservando i grafici sottostanti si nota che, indipendentemente dalla temperatura e dalla tesi tutte le fermentazioni si sono svolte regolarmente giungendo al termine senza particolari problemi.

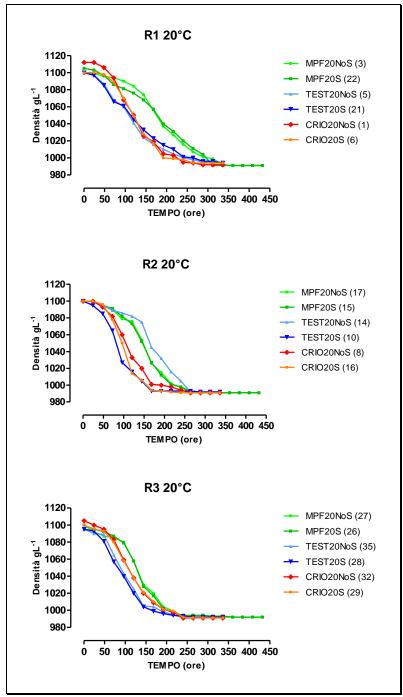


Figura n. 3.28 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 20°C - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

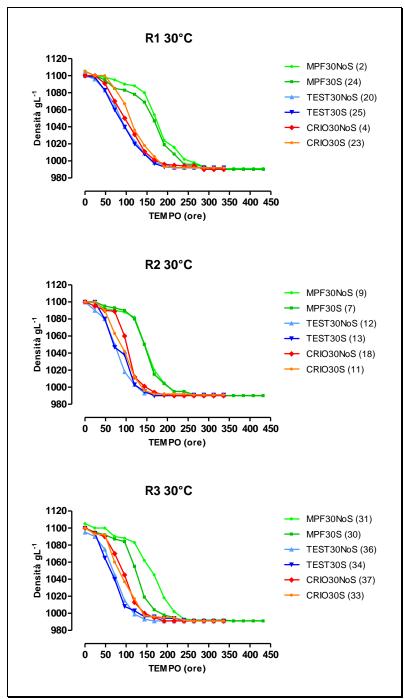


Figura n. 3.29 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 30°C - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

3.5.5 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione e dopo svinatura

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato nella tabella 3.27.

Tabella 3.27. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati per la Linea B.4. dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I), durante la fermentazione alcolica (F) ed alla svinatura (S)

N° TESI	R	TEMPISTICA		TEMPISTICA		TEMPISTICA	
N IESI		I (h)*	Data	F (g)**	Data	S (g)**	Data
12	R1		25 e 26 settembre	5-7	30 settembre 2 e 3 ottobre	18-21	14 e 16 ottobre
12	R2		26 e 27 settembre	4-6	30 settembre 2 e 3 ottobre	16-18	14 e 16 ottobre
12	R3		27 e 28 settembre	3-5	30 settembre 1, 2, 3 ottobre	16-17	14 e 16 ottobre

^{*} ore dopo l'inoculo

^{**} giorni di fermentazione

Tabella n. 3.28 Valori delle popolazioni dei lieviti Saccharomyces cerevisiae e dei Non Saccharomyces nei tre campionamenti effettuati per ciascuna tesi – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

Vasca N.	Tesi	Replica	S. cer	evisiae (UFC	C/mL)	non-Sac	charomyces (U	FC/mL)
			F1	F2	F3	F1	F2	F3
1		1	$7,40x10^6$	$4,28x10^7$	$4,00x10^6$	1,20x10 ⁶	$2,06x10^4$	1,00x10
8	CRIO20NoS	2	$2,30x10^6$	$4,77x10^7$	$5,70x10^6$	$1,89 \times 10^6$	$1,95 \times 10^4$	9,00x10
32		3	$1,06x10^7$	$5,69x10^7$	$9,30x10^6$	$1,27x10^6$	$6,42x10^4$	9,00x10
6		1	$1,29x10^6$	$4,35x10^7$	$8,50x10^6$	$1,46x10^6$	$1,60 \times 10^5$	9,00x10
16	CRIO20S	2	$6,90x10^6$	$4,85 \times 10^7$	$5,50x10^6$	$2,31x10^6$	$8,60 \times 10^4$	1,00x10
29		3	$4,70x10^6$	$5,37x10^7$	$1,18x10^{7}$	$7,75 \times 10^5$	$4,08x10^4$	2,00x10
4		1	$1,62 \times 10^7$	$4,09x10^7$	$1,58x10^6$	$1,78x10^6$	$4,51x10^4$	1,00x10
18	CRIO30NoS	2	$5,30x10^6$	$5,10x10^7$	$1,28x10^6$	$1,12x10^6$	$2,29x10^4$	1,00x10
37		3	$7,20x10^6$	$6,40x10^7$	$1,21x10^6$	$1,76x10^6$	$1,40x10^3$	9,00x10
23		1	$1,62 \times 10^6$	$5,93x10^7$	$1,26x10^6$	$9,10x10^5$	$3,84x10^4$	9,00x10
11	CRIO30S	2	$8,90x10^6$	$5,41x10^7$	$7,50x10^5$	$2,05x10^6$	$2,16x10^3$	9,00x10
33		3	$3,80x10^6$	$5,96x10^7$	$8,30x10^5$	$1,52x10^6$	$1,01x10^3$	5,00x10
3		1	$8,60x10^5$	$2,90x10^7$	$7,00x10^6$	5,05x10 ⁵	$1,05 \times 10^5$	9,00x10
17	MPF20NoS	2	$8,40x10^6$	$4,20x10^7$	$4,20x10^6$	$1,68 \times 10^6$	$1,26 \times 10^5$	9,00x10
27		3	$2,46x10^6$	$3,52x10^7$	$2,44x10^6$	$5,70x10^5$	$9,26x10^4$	3,00x10
22		1	$5,60x10^5$	$3,53x10^7$	$1,26x10^7$	$3,05x10^5$	$2,83x10^4$	2,00x10
15	MPF20S	2	$6,30x10^6$	$4,52x10^7$	$3,20x10^6$	$9,50x10^5$	$1,73 \times 10^5$	1,00x10
26		3	$2,55x10^6$	$4,62 \times 10^7$	$1,80x10^6$	$6,90x10^5$	$6,14x10^4$	3,00x10
2		1	$4,40x10^5$	$4,62x10^7$	$3,40x10^6$	$3,60x10^5$	5,41x10 ⁴	1,00x10
9	MPF30NoS	2	$3,59x10^6$	$4,19x10^7$	$5,60x10^5$	$7,70x10^5$	$2,49 \times 10^5$	3,00x10
31		3	$1,22x10^6$	$3,78x10^7$	$3,20x10^5$	$2,40x10^5$	$7,84 \times 10^4$	2,00x10
24		1	$2,50x10^5$	$4,10x10^7$	1,32x10 ⁶	5,30x10 ⁵	$6,47x10^4$	9,00x10
7	MPF30S	2	$5,10x10^6$	$5,41x10^7$	$6,00x10^5$	$1,31x10^6$	$9,84x10^4$	1,00x10
30		3	$2,10x10^5$	$5,58x10^7$	$3,60x10^6$	$7,40x10^4$	$5,35x10^4$	9,00x10
5		1	$3,40x10^5$	$3,18x10^7$	5,10x10 ⁶	1,21x10 ⁵	$9,70x10^4$	9,00x10
14	TEST20NoS	2	$2,50x10^6$	$4,64 \times 10^7$	$4,10x10^5$	$2,70x10^6$	$6,30x10^4$	9,00x10
35		3	$3,10x10^6$	$5,42x10^7$	$5,10x10^6$	$2,69x10^6$	$3,99x10^4$	9,00x10
21		1	$2,76x10^6$	$3,78x10^7$	$1,20x10^5$	1,25x10 ⁶	$6,60x10^6$	2,00x10
10	TEST20S	2	$3,10x10^6$	$4,52x10^7$	$2,30x10^5$	$1,63x10^6$	$1,86 \times 10^6$	9,00x10
28		3	$4,60x10^6$	$5,17x10^7$	$2,03x10^4$	$2,10x10^6$	$5,00x10^6$	2,00x10
20		1	1,21x10 ⁶	$4,54x10^7$	$5,80x10^2$	$2,12x10^6$	$2,18x10^6$	1,00x10
12	TEST30NoS	2	$4,50x10^6$	$4,48x10^7$	$1,63 \times 10^3$	$3,33x10^6$	$5,60 \times 10^6$	9,00x10
36		3	$7,30x10^6$	$5,27x10^7$	$5,75x10^4$	$1,60 \times 10^6$	$4,10x10^5$	9,00x10
25		1	$9,30x10^5$	$4,66 \times 10^7$	$2,02x10^4$	$7,85 \times 10^5$	$1,70x10^6$	9,00x10
13	TEST30S	2	$6,70x10^6$	$3,98 \times 10^7$	$1,74 \times 10^4$	$1,56 \times 10^6$	$1,88 \times 10^6$	9,00x10
34		3	$1,58 \times 10^6$	$5,04 \times 10^7$	$3,40x10^{1}$	$2,32x10^6$	$1,42 \times 10^6$	5,00x10

3.5.6 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Tabella n. 3.29 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) in corrispondenza del campionamento effettuato a densità 1020 -LINEA B.4 (vendemmia 2008)

VASCA N.	DATA	TESI	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Zuccheri (g/L)	Etanolo (v/v %)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
1	30/09/2008		33,0	66,0	99,0	9,0	7,4	0,2
8	30/09/2008	CRIO20NoS	34,0	64,0	98,0	8,7	7,4	0,1
32	01/10/2008		39,0	66,0	105,0	7,1	5,9	0,1
6	30/09/2008	•	26,0	58,0	84,0	9,4	7,7	0,1
16	30/09/2008	CRIO20S	15,0	41,0	56,0	11,2	8,2	0,2
29	01/10/2008		38,0	67,0	105,0	7,7	6,0	0,1
4	30/09/2008	•	13,0	37,0	50,0	11,5	8,0	0,2
18	30/09/2008	CRIO30NoS	12,0	36,0	48,0	11,7	8,0	0,2
37	01/10/2008		19,0	44,0	63,0	10,0	7,2	0,2
23	30/09/2008		18,0	45,0	63,0	10,6	7,8	0,2
11	30/09/2008	CRIO30S	7,0	27,0	34,0	12,5	8,8	0,3
33	01/10/2008		16,0	41,0	57,0	10,9	7,4	0,1
3	03/10/2008		25,0	54,0	79,0	9,5	6,8	0,2
17	02/10/2008	MPF20NoS	29,0	60,0	89,0	9,1	6,6	0,1
27	03/10/2008		18,0	41,0	59,0	9,6	6,5	0,1
22	03/10/2008		28,0	64,0	92,0	9,8	7,0	0,2
15	02/10/2008	MPF20S	29,0	59,0	88,0	9,0	6,4	0,1
26	03/10/2008		14,0	37,0	51,0	10,3	6,8	0,1
2	02/10/2008		30,0	59,0	89,0	8,9	6,4	0,2
9	02/10/2008	MPF30NoS	23,0	51,0	74,0	9,5	7,3	0,2
31	03/10/2008		44,0	75,0	119,0	7,1	6,0	0,1
24	02/10/2008	•	22,0	52,0	74,0	10,1	7,0	0,2
7	02/10/2008	MPF30S	20,0	47,0	67,0	10,3	7,4	0,2
30	02/10/2008		22,0	50,0	72,0	9,7	6,7	0,1
5	30/09/2008		25,0	55,0	80,0	9,8	7,6	0,1
14	03/10/2008	TEST20NoS	28,0	53,0	81,0	8,9	8,4	0,1
35	01/10/2008		24,0	50,0	74,0	9,9	6,9	0,1
21	30/09/2008		33,0	67,0	100,0	8,5	6,9	0,1
10	30/09/2008	TEST20S	20,0	45,0	65,0	10,4	7,6	0,1
28	01/10/2008		18,0	41,0	59,0	10,8	6,9	0,1
20	30/09/2008		11,0	34,0	45,0	12,0	8,5	0,3
12	30/09/2008	TEST30NoS	7,0	24,0	31,0	12,3	8,3	0,3
36	30/09/2008		15,0	40,0	55,0	10,8	7,6	0,2
25	30/09/2008		8,0	28,0	36,0	12,4	8,5	0,2
13	30/09/2008	TEST30S	4,0	18,0	22,0	13,1	8,9	0,2
34	30/09/2008		8,0	29,0	37,0	11,0	7,9	0,3

Tabella n. 3.30 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) dopo svinatura – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (mg/L)	Acido Malico (g/L)
1		1	09/10/08	14,3	1,1	3,6	0,21	50	1,3
8	CRIO20NoS	2	10/10/08	13,9	1	3,62	0,19	41	1,03
32		3	11/10/08	13,4	1	3,54	0,19	43	1,04
6		1	09/10/08	13,95	1,1	3,59	0,26	41	1,29
16	CRIO20S	2	10/10/08	13,9	1,1	3,58	0,22	41	1
29		3	11/10/08	13,65	1	3,55	,019	43	1,05
4		1	09/10/08	14,25	1	3,63	0,28	41	1,29
18	CRIO30NoS	2	10/10/08	14,05	1	3,62	0,28	39	0,97
37		3	11/10/08	13,45	1	3,65	0,28	42	1,03
23		1	09/10/08	14,15	1	3,7	0,3	42	1,04
11	CRIO30S	2	10/10/08	13,9	1	3,66	0,29	36	0,96
33		3	11/10/08	13,25	1	3,61	0,25	40	0,97
3		1	13/10/08	13,95	1,1	3,59	0,26	38	1,18
17	MPF20NoS	2	14/10/08	14,1	1	3,63	0,2	47	1,05
27		3	15/10/08	13,4	1	3,52	0,19	54	1,07
22		1	13/10/08	14,5	1,3	3,62	0,26	49	1,17
15	MPF20S	2	14/10/08	13,95	1,1	3,64	0,18	45	1,06
26		3	15/10/08	13,45	1	3,61	0,2	54	1,09
2		1	13/10/08	14,05	1	3,66	0,34	48	1,04
9	MPF30NoS	2	14/10/08	13,65	1	3,71	0,33	47	0,92
31		3	15/10/08	13,65	1	3,61	0,3	51	0,99
24		1	13/10/08	14,05	1,1	3,69	0,35	42	1,04
7	MPF30S	2	14/10/08	14,05	1,1	3,72	0,35	43	0,86
30		3	15/10/08	13,45	1	3,63	0,33	46	0,96
5		1	09/10/08	13,9	2,3	3,57	0,19	51	1,45
14	TEST20NoS	2	10/10/08	13,7	1	3,58	0,15	51	0,9
35		3	11/10/08	13,4	1	3,56	0,18	54	1,01
21		1	09/10/08	13,9	2,6	3,6	0,18	43	1,4
10	TEST20S	2	10/10/08	13,8	1	3,6	0,14	49	1,02
28		3	11/10/08	13,35	1	3,59	0,21	55	1,05
20		1	09/10/08	14,1	1,2	3,65	0,35	47	1,11
12	TEST30NoS	2	10/10/08	13,8	1	3,6	0,28	48	0,93
36		3	11/10/08	13,3	1	3,57	0,32	46	0,95
25		1	09/10/08	13,95	1,1	3,66	0,27	48	1,21
13	TEST30S	2	10/10/08	13,95	1	3,65	0,29	40	0,93
34		3	11/10/08	13,3	1	3,67	0,41	47	0,87

3.5.7 Analisi statistica dei dati

Parametri microbiologici considerati per l'analisi della varianza

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione (non-SACC2)
- e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- f. Mortalità dei lieviti non-Saccharomyces

Tabella n. 3.31 Variabili significative e non significative per i parametri considerati nell'analisi statistica.

	SIGNIFICATIVE	NON SIGNIFICATIVE
SACC1	TRATTAMENTO	TEMPERATURA E SALASSO
NON-SACC1	TRATTAMENTO	TEMPERATURA E SALASSO
SACC2	TRATTAMENTO e TEMPERATURA	SALASSO
NON-SACC2	TRATTAMENTO e TEMPERATURA	SALASSO
RENDIMENTO DI CRESCITA SACC	TEMPERATURA e SALASSO	TRATTAMENTO
MORTALITA' NON-SACC	TRATTAMENTO	TEMPERATURA E SALASSO

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica dei soli parametri per i quali almeno una variabile è risultata statisticamente significativa.

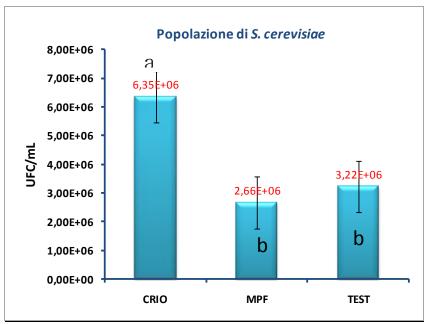


Figura n. 3.30 Effetto del trattamento sulle popolazioni di S. cerevisiae 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione di *S. cerevisiae* presenta differenze significative nelle tesi CRIO rispetto alle altre due tesi

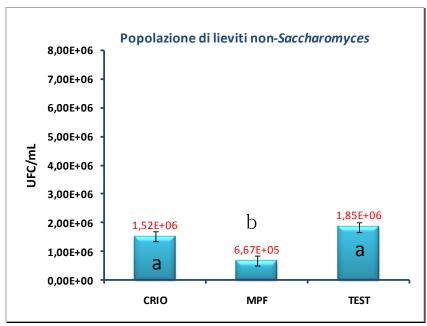


Figura n. 3.31 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo- LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione dei lieviti non-Saccharomyces presenta differenze significative nelle tesi MPF rispetto alle altre due tesi. Si osserva un valore inferiore probabilmente dovuto dall'abbassamento della temperatura per 5-6 giorni (7-9°C)

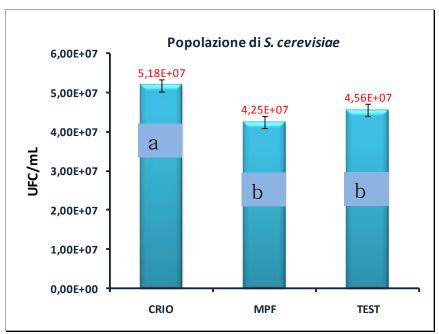


Figura n. 3.32 Effetto del trattamento sulle popolazioni di S. cerevisiae in corrispondenza del campionamento a metà fermentazione - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione di S. cerevisiae al secondo campionamento presenta differenze significative per le tesi CRIO che mostrano una popolazione maggiore rispetto alle tesi MPF e TEST.

- 79 -

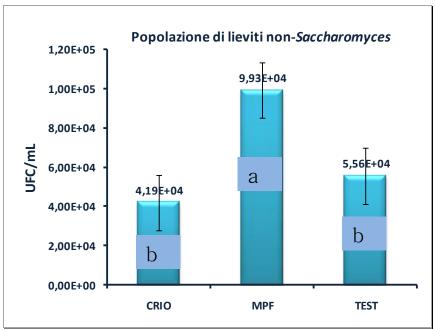


Figura n. 3.33 Effetto del trattamento sulle popolazioni dei Non-Saccharomyces in corrispondenza del campionamento a metà fermentazione - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione dei lieviti non-Saccharomyces presenta differenze significative per le tesi MPF che mostrano una popolazione più elevata rispetto alle tesi CRIO e TEST.

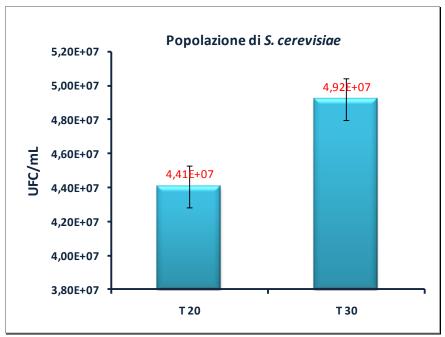


Figura n. 3.34 Effetto della temperatura sulle popolazioni di S. cerevisiae in corrispondenza del campionamento a metà fermentazione – LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione di *S. cerevisiae* ha mostrato nelle tesi a 30°C un incremento rispetto a quella nelle tesi a 20°C sebbene statisticamente poco significativo

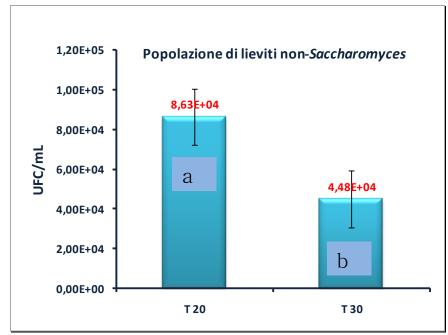


Figura n. 3.35 Effetto della temperatura sulle popolazioni di Non-Saccharomyces in corrispondenza del campionamento a metà fermentazione - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La popolazione di lieviti non-Saccharomyces ha mostrato nelle tesi a 20°C valori significativamente maggiori, indice di una mortalità più ridotta.

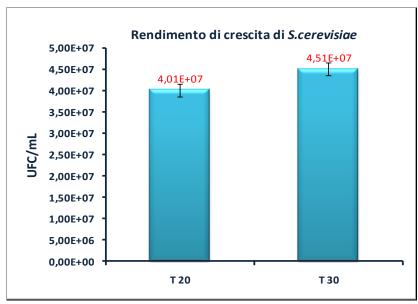


Figura n. 3.36 Effetto della temperatura sul rendimento di crescita di Saccharomyces cerevisiae - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

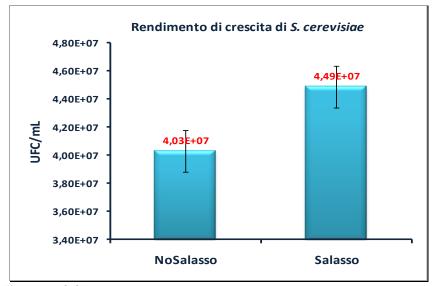


Figura n. 3.37 Effetto del salasso sul rendimento di crescita di Saccharomyces cerevisiae - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

Effetti scarsamente significativi sono stati osservati sul rendimento di crescita di *S. cerevisiae* per i fattori TEMPERATURA e SALASSO

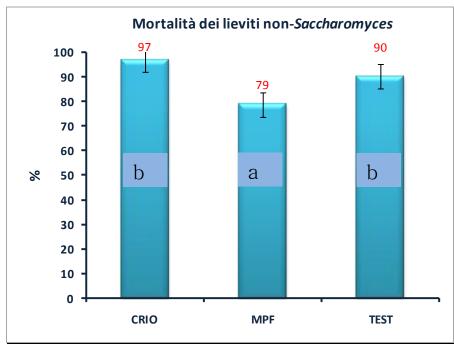


Figura n. 3.38 Effetto del trattamento sulla mortalità delle popolazioni dei Non-Saccharomyces - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La mortalità dei lieviti non-Saccharomyces è risultata essere significativamente più bassa nelle tesi MPF rispetto alle tesi CRIO e TEST.

Successivamente all'analisi della varianza, con la finalità di valutare in modo globale l'effetto dei trattamenti sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti principali considerando separatamente le tesi condotte a 20 e 30°C.

Per tale analisi sono stati presi in considerazione sia parametri chimici, a densità del mosto 1020, che microbiologici: popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s 18h dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1), popolazione di *S. cerevisiae* al secondo campionamento (Sacc2), glucosio (Glu), fruttosio (Fru), glicerina (Gly), Ac. Acetico ed etanolo (EtOH).

In figura 3.39 è riportata l'Analisi delle Componenti Principali per le tesi condotte a 20°C.

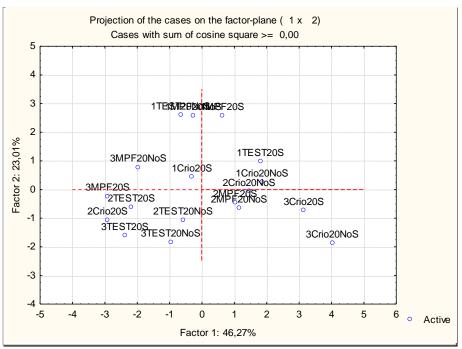


Figura n. 3.39 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali delle tesi a 20°C (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

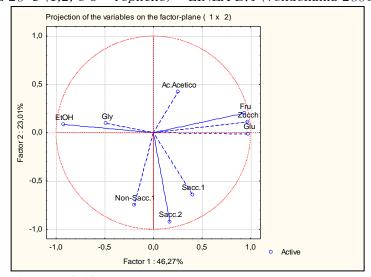


Figura n. 3.40 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

La figura 3.41 riporta l'Analisi delle Componenti Principali per le tesi condotte a 30°C.

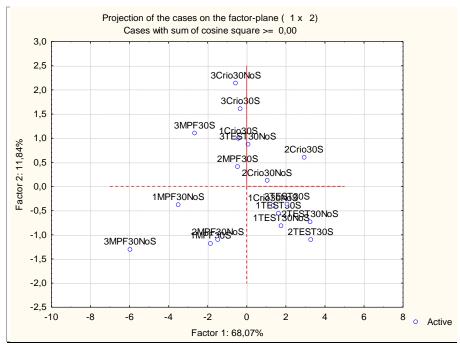


Figura n. 3.41 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali delle tesi a 30°C (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

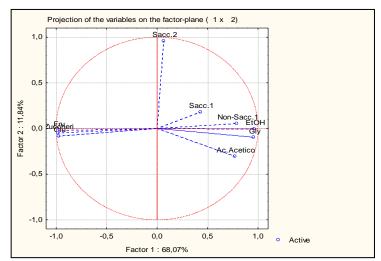


Figura n. 3.42 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.4 (vendemmia 2008)

3.6 Linea di ricerca B.4 (anno 2009)

3.6.1 Composizione chimica dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche dei mosti al riempimento delle vasche sono riportati in tabella 3.45.

Tabella n. 3.45 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) all'inizio della fermentazione – LINEA B.4 (vendemmia 2009)

		Ttuzic							
Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (mg/L)
24	CRIO20NoS	1	2/10/09	0,10	222	3,68	3,64	0,05	86,0
16	CRIO20NoS	2	3/10/09	0,30	193	3,85	3,58	0,05	64,0
28	CRIO20NoS	3	5/10/09	0,10	212	4,02	3,65	0,05	90,0
23	CRIO208	1	2/10/09	0,10	221	3,75	3,63	0,08	83,0
14	CRIO20S	2	3/10/09	0,35	197	3,93	3,61	0,05	59,0
30	CRIO208	3	5/10/09	0,10	210	3,91	3,64	0,05	81,0
20	CRIO30NoS	1	3/10/09	0,55	233	4,33	3,59	0,11	79,0
12	CRIO30NoS	2	3/10/09	0,30	203	3,78	3,62	0,05	90,0
35	CRIO30NoS	3	5/10/09	0,60	207	4,48	3,55	0,10	86,0
	an room		ali a ina		240		2.00	2.20	70.0
22	CRIO308	1	2/10/09	0,10	218	3,88	3,65	0,09	79,0
18	CRIO308	2	3/10/09	0,10	202	3,90	3,64	0,05	94,0
34	CRIO308	3	5/10/09	0,10	209	4,23	3,64	0,06	82,0
21	MPF20NoS	1	2/10/09	0,20	217	3,90	3,63	0,13	80,0
7	MPF20NoS	2	3/10/09	0,70	192	5,31	3,56	0,12	84,0
36	MPF20NoS	3	5/10/09	0,40	208	4,15	3,61	0,10	92,0
25	MPF208	1	2/10/09	0,35	206	4,13	3,61	0,11	78,0
9	MPF208	2	3/10/09	0,45	200	4,50	3,60	0,09	81,0
31	MPF208	3	5/10/09	0,55	199	4,32	3,62	0,09	74,0
,	MPF30NoS	,	2/10/09	0.10	212	2.00	2.61	0.11	970
3		1		0,10	213	3,92	3,61	0,11	87,0
17	MPF30NoS	2	3/10/09	0,35	201	4,11	3,58	0,05	89,0
29	MPF30NoS	3	5/10/09	0,10	212	4,23	3,58	0,07	106,0
4	MPF308	1	2/10/09	0,35	206	4,73	3,58	0,13	71,0
11	MPF308	2	3/10/09	0,40	203	4,39	3,61	0,10	77,0
37	MPF308	3	5/10/09	0,50	214	4,19	3,59	0,12	74,0

3.6.2 Valutazione dei profili termici delle diverse vinificazioni

Per poter confrontare e valutare in modo ottimale i risultati microbiologici e chimici ottenuti nel corso della sperimentazione, è di fondamentale importanza in fase preliminare, verificare per ciascuna vinificazione che i profili di temperatura abbiano rispettato le condizioni e gli andamenti desiderati. Per verificare il corretto andamento della temperatura, a partire dal primo giorno del riempimento delle vasche e per tutta la durata della fermentazione è stata rilevata in continuo la temperatura del mosto-vino e sono stati determinati ogni 12 ore i valori di temperatura media in modo da ottenere i profili termici di ciascuna vinificazione.

La figura 3.45 riporta i profili termici delle fermentazioni condotte a 20°C divisi per replica.

Osservando le curve relative ai profili termici delle tesi testimone (TEST), è possibile notare che in tutte e tre le repliche, indipendentemente dalla variabile Salasso, la temperatura ha seguito un andamento similare rispettando le condizioni desiderate. Infatti, in ciascuna vinificazione, già a partire dal primo giorno e per tutta la fase di fermentazione la temperatura si è costantemente mantenuta attorno ai 20°C, senza subire in nessun caso variazioni significative.

Per quanto riguarda i profili termici relativi alla tesi CRIO si evidenzia che le repliche 2 e 3 presentano un andamento della temperatura similare che, come desiderato, a partire dal secondo giorno di fermentazione si è stabilizzato a valori prossimi ai 20°C.

Al contrario, osservando le curve di entrambe le tesi CRIO della seconda replica, si nota come dopo due giorni di fermentazione si sia verificato un inaspettato aumento della temperatura della durata di circa 24h durante le quali la temperatura è salita fino a 25°C. Infine, per quanto riguarda i profili termici relativi alla tesi MPF, è possibile affermare che, per le vinificazioni delle repliche 1 e 3 sono stati rispettati i profili termici desiderati, mentre per la tesi non salassata della replica 3 (MPF 20NoS) si sono verificati dei

problemi che non hanno consentito il corretto svolgimento della fase di macerazione in vasca prevista dal trattamento. Per quanto riguarda i profili termici delle fermentazioni condotte a 30°C (figura 3.46), in linea generale è possibile affermare che per quanto riguarda i profili relativi alle tesi TEST e CRIO sono stati rispettati gli andamenti previsti dal protocollo anche se la temperatura di fermentazione di 30°C effettivamente è stata mantenuta con maggiore difficoltà rispetto alle vinificazioni condotte a 20°C. Osservando invece i profili termici relativi alle tesi MPF si nota come ci siano state maggiori variazioni di temperatura nella fase di macerazione a freddo e in particolare per la tesi MPF30NoS della terza replica per la quale inoltre non è stata mai raggiunta neanche la temperatura di fermentazione desiderata di 30°C.

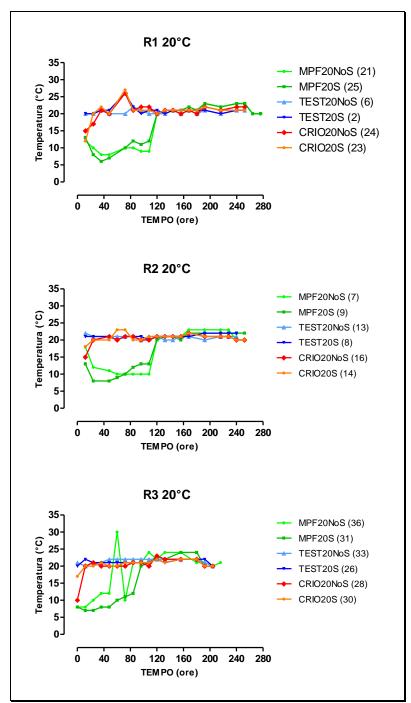


Figura n. 3.43 Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 20°C

LINEA B.4 (vendemmia 2009)

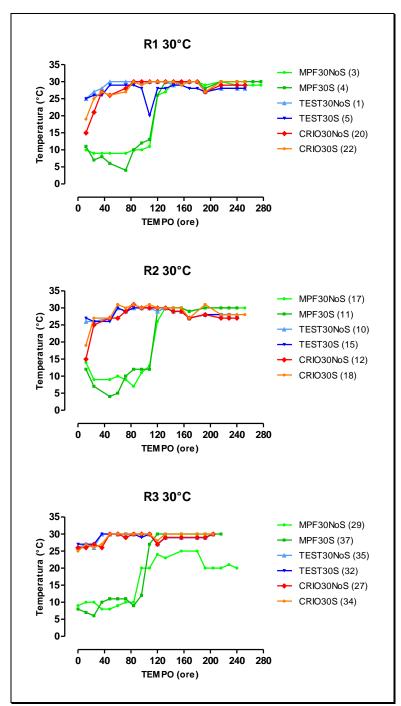


Figura n. **3.44** Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 30°C –

LINEA B.4 (vendemmia 2009)

3.6.3 Valutazione dell'inoculo

Le vinificazioni condotte nella seguente linea di ricerca sono state inoculate con lievito secco attivo utilizzando il ceppo Lalvin-EC1180 appartenente alla cerevisiae. Per verificare la buona riuscita dell'inoculo, non mettendo quindi a rischio il buon andamento del processo fermentativo e dar luogo ad insuccessi dovuti alla mancata dominanza dello starter inoculato, è stata valutata la vitalità del preparato commerciale, mediante microscopia ad epifluorescenza. I risultati ottenuti dalla conta con la camera contaglobuli di Thoma hanno evidenziato una vitalità del preparato commerciale di 2.0×10^{10} cellule vitali/g. Considerando che ciascuna vinificazione è stata inoculata con 28 g/hL di LSA, vista la vitalità del preparato teoricamente dovrebbero commerciale, essere state apportate al mosto 5,6 x10⁶ UFC/mL.

Tuttavia, poiché prima di essere inoculata la coltura selezionata di LSA è stata opportunamente reidratata mediante il dispositivo "CellarMate" fornito dalla azienda Parsec, per determinare la quantità di UFC/mL realmente apportate al mosto, per ciascun inoculo è stata valutata la vitalità della soluzione reidratata mediante semina di tale soluzione, opportunamente diluita, in piastre Petri contenenti il mezzo di coltura WL. Dai risultati ottenuti dalle conte in piastra, considerando che per ogni vinificazione, corrispondente ad un diverso trattamento, sono stati aggiunti a 7 hL di mosto 2,4 L di soluzione reidratata di LSA, sono stati ricavati i valori di inoculo reale, cioè la quantità di UFC/mL realmente apportate al mosto con ciascun inoculo.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che con ogni inoculo sono state apportate al mosto una quantità di lieviti superiori a 10^6 UFC/mL, che è considerato il livello minimo sufficiente a permettere ad uno starter di dominare la fermentazione. Infatti, sia nel caso delle MPF e delle vinificazioni tal quali, che sono state inoculate

contemporaneamente, che nel caso delle CRIO, sono state inoculate quantità di *S. cerevisiae* comprese tra 4×10^6 e 1,4x10⁷ UFC/mL. Tali valori di inoculo, oltre ad evidenziare l'ottimale efficacia del protocollo automatico reidratazione, effettuato mediante il dispositivo "CellarMate", dovrebbero consentire di ottenere in ogni caso fermentazioni complete e regolari dominate dallo starter inoculato.

3.6.4 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figure 3.45-3.46). Osservando i grafici sottostanti si nota che, indipendentemente dalla temperatura e dalla tesi, tutte le fermentazioni si sono svolte regolarmente giungendo al termine senza particolari problemi.

In particolare, è interessante sottolineare che, a differenza di quanto atteso e verificato negli scorsi anni, nel caso delle tesi MPF condotte a 20°C, indipendentemente dal trattamento del salasso, la densità non è rimasta costante durante la fase di macerazione prefermentativa a freddo, ma se pur più lentamente rispetto alle altre tesi è continuata a diminuire.

Al contrario, nel caso delle tesi MPF condotte a 30°C la densità ha avuto l'andamento atteso.

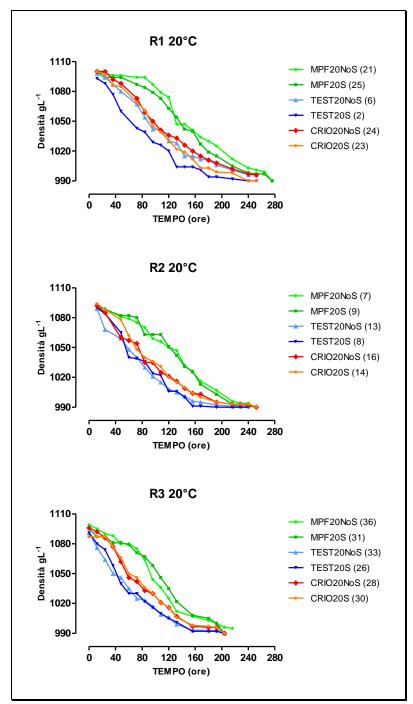


Figura n. 3.45 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 20°C –
LINEA B.4 (vendemmia 2009)

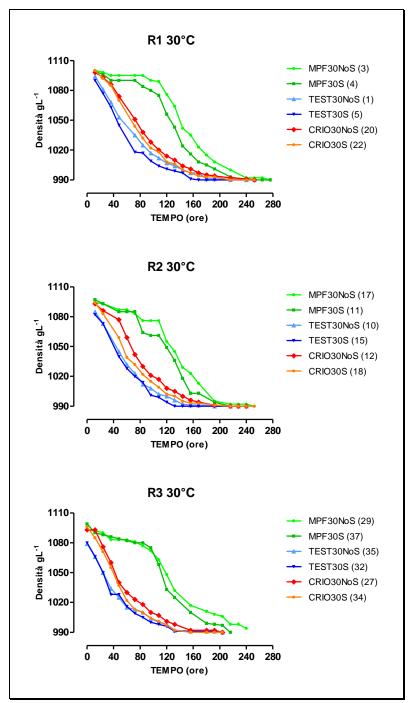


Figura n. 3.46 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 30°C –
LINEA B.4 (vendemmia 2009)

3.6.5 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione alcolica

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale secondo il calendario riportato nella tabella 3.32.

Tabella 3.32. Calendario dei campionamenti di mosto e vino effettuati per la Linea B.4. dopo l'inoculo del lievito EC-1118 (I) e durante la fermentazione alcolica (F)

N° TESI	R	TEMPISTICA		TEM	IPISTICA	TEMPISTICA		
N IESI	N	I (h)*	Data	F (g)**	Periodo	F (g)**	Periodo	
12	R1	18	02 e 03 ottobre	4-7	05-08 ottobre	5-9	06-10 ottobre	
12	R2	18	03 e 04 ottobre	3-7	05-09 ottobre	4-9	06-11 ottobre	
12	R3	18	04 e 05 ottobre	3-7	06-10 ottobre	4-8	07-11 ottobre	

^{*} ore dopo l'inoculo

^{**} giorni di fermentazione

Tabella n. 3.33 Valori delle popolazioni dei lieviti S. cerevisiae e dei Non Saccharomyces nei tre campionamenti-LINEA B.4 (vendemmia 2009) (F1=inizio fermentazione; F2= densità 1050; F3=densità 1020)

Vasca	Tesi	Replica	S. cere	evisiae (UF	C/mL)		Saccharon (UFC/mL)	
N.								
			F1	F2	F3	F1	F2	F3
24	CRIO20NoS	1	$3,00x10^6$	$4,20x10^7$	$3,20x10^7$	$3,33x10^6$	$2,18x10^7$	2,24x10
16	CRIO20NoS	2	$3,00x10^6$	$6,50x10^7$	$4,40x10^{7}$	$2,90x10^6$	$5,38x10^6$	2,56x10
28	CRIO20NoS	3	$2,50x10^6$	$4,40x10^7$	$2,90x10^7$	$3,37x10^6$	$5,55 \times 10^6$	2,62x10
23	CRIO20S	1	$3,90x10^6$	$5,80x10^7$	$3,60x10^7$	$3,06x10^6$	$2,00x10^6$	1,89x10
14	CRIO20S	2	$3,90x10^6$	$5,60x10^7$	$3,50x10^7$	$4,70x10^6$	$4,73x10^6$	2,27x10
30	CRIO20S	3	$5,10x10^6$	$5,30x10^7$	$3,30x10^7$	$5,40x10^6$	$4,28x10^6$	2,05x10
20	CRIO30NoS	1	$7,10x10^6$	$4,30x10^7$	$4,30x10^7$	$6,10x10^6$	$3,50x10^6$	4,42x10
12	CRIO30NoS	2	$3,23x10^7$	$3,80x10^7$	$3,80x10^7$	$5,55x10^6$	$3,29x10^6$	2,09x10
35	CRIO30NoS	3	$2,00x10^6$	$5,70x10^7$	$4,00x10^7$	$2,53x10^6$	$4,19x10^6$	2,00x10
22	CRIO30S	1	$9,00x10^6$	$5,10x10^7$	$3,10x10^7$	4,91x10 ⁶	$3,50x10^6$	1,20x10
18	CRIO30S	2	$1,22x10^7$	$4,00x10^7$	$3,80x10^7$	$4,46x10^6$	$4,25 \times 10^6$	7,30x10
34	CRIO30S	3	$3,40x10^6$	$5,50x10^7$	$2,00x10^7$	$5,25 \times 10^6$	$2,75 \times 10^6$	7,00x10
21	MPF20NoS	1	$1,26x10^6$	$3,80x10^7$	$3,70x10^7$	$2,12x10^6$	$3,55 \times 10^6$	3,10x10
7	MPF20NoS	2	$3,00x10^6$	$5,80x10^7$	$3,70x10^7$	$3,53x10^6$	$3,40x10^6$	1,43x10
36	MPF20NoS	3	$2,90x10^6$	$7,30x10^7$	$4,20x10^7$	$5,80x10^6$	$3,76x10^6$	2,68x10
25	MPF20S	1	$3,70x10^6$	$5,00x10^7$	$3,60x10^7$	$2,87x10^6$	$1,75 \times 10^6$	2,30x10
9	MPF20S	2	$8,00x10^5$	$6,20x10^7$	$5,10x10^7$	$2,33x10^6$	$3,20x10^6$	2,09x10
31	MPF20S	3	$1,50x10^6$	$5,30x10^7$	$4,80x10^7$	$1,99 \times 10^6$	$3,00x10^6$	2,58x10
3	MPF30NoS	1	1,90x10 ⁶	$8,20x10^7$	$5,10x10^7$	$1,09x10^6$	$5,65 \times 10^6$	1,53x10
17	MPF30NoS	2	$2,30x10^5$	$6,10x10^7$	$4,90x10^7$	$1,54x10^6$	$2,00x10^6$	2,10x10
29	MPF30NoS	3	$1,10x10^6$	$4,70x10^7$	$4,20x10^7$	$2,67x10^6$	$2,00x10^6$	2,33x10
4	MPF30S	1	1,97x10 ⁶	$6,70x10^7$	$5,20x10^7$	$3,10x10^6$	$4,70x10^6$	2,47x10
11	MPF30S	2	$1,30x10^6$	$6,60x10^7$	$5,40x10^7$	$2,85 \times 10^6$	$4,10x10^6$	9,68x10
37	MPF30S	3	$1,30x10^6$	$6,50x10^7$	$4,00x10^7$	$1,80 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	1,88x10
2	TEST20NoS	1	$2,10x10^6$	$5,70x10^7$	$4,29x10^7$	$4,38x10^6$	$3,35x10^6$	3,55x10
13	TEST20NoS	2	$4,25x10^6$	$5,50x10^7$	$5,40x10^7$	$3,53x10^6$	$1,68 \times 10^6$	2,09x10
33	TEST20NoS	3	$1,60x10^6$	$5,60x10^7$	$4,70x10^7$	$3,05x10^6$	$2,52x10^6$	2,06x10
6	TEST20S	1	5,70x10 ⁶	$4,00x10^7$	$3,70x10^7$	1,57x10 ⁶	4,12x10 ⁶	1,55x10
8	TEST20S	2	$2,00x10^6$	$4,20x10^7$	$5,00x10^7$	$2,00x10^6$	$3,08x10^6$	1,95x10
26	TEST20S	3	$4,10x10^6$	$6,80x10^7$	$4,40x10^7$	$4,30x10^6$	$3,60x10^6$	1,14x10
1	TEST30NoS	1	$4,80x10^6$	$4,90x10^7$	$4,10x10^7$	$3,00x10^6$	$1,00x10^6$	5,30x10
10	TEST30NoS	2	$3,30x10^6$	$5,90x10^7$	$5,10x10^7$	$3,45 \times 10^6$	$2,55x10^6$	1,70x10
27	TEST30NoS	3	$6,50x10^6$	$4,50x10^7$	$2,80x10^7$	$6,15x10^6$	$4,95x10^6$	1,30x10
5	TEST30S	1	2,90x10 ⁶	6,00x10 ⁷	$5,00x10^7$	$3,60x10^6$	$3,29x10^6$	2,81x10
15	TEST30S	2	$5,70x10^6$	$7,60x10^7$	$4,00x10^7$	$3,40x10^6$	$3,40x10^6$	9,00x10
32	TEST30S	3	$1,80x10^6$	$4,50x10^7$	$4,80x10^7$	$5,45 \times 10^6$	$3,19x10^6$	1,60x10

3.6.6 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Tabella n. 3.34 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) in corrispondenza del campionamento effettuato a densità 1020 - LINEA B.4 (vendemmia 2009)

Vasca	Data	Tesi	Replica	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)
24	08/10/09	•	1	17	47	10,73	8,09	0,08
16	08/10/09	CRIO20NoS	2	15	42	9,86	7,66	0,07
28	10/10/09		3	9	29	7,89	5,96	0,08
23	08/10/09		1	11	36	12,11	8,69	0,11
14	08/10/09	CRIO20S	2	13	38	10,59	8,36	0,06
30	10/10/09		3	13	39	11,1	8,3	0,13
20	07/10/09		1	1	10	13,15	8,79	0,16
12	07/10/09	CRIO30NoS	2	18	45	9,83	8,1	0,16
35	07/10/09		3	24	55	9,60	7,94	0,2
22	06/10/09		1	18	47	10,31	8,5	0,16
18	07/10/09	CRIO30S	2	11	33	10,93	8,29	0,19
34	11/10/09		3	1	4	13,92	9,39	0,22
21	10/10/09		1	17	50	10,61	6,5	0,18
7	11/10/09	MPF20NoS	2	4	24	12,19	7,04	0,1
36	11/10/09		3	17	48	10,04	6,26	0,12
25	09/10/09		1	23	56	9,9	6,47	0,1
9	10/10/09	MPF20S	2	10	37	11	6,84	0,1
31	10/10/09		3	33	65	7,98	5,93	0,1
3	09/10/09		1	16	47	10,27	6,88	0,22
17	10/10/09	MPF30NoS	2	9	35	11,38	7,61	0,21
29	11/10/09		3	25	58	9	6,85	0,12
4	08/10/09		1	21	54	9,87	7,41	0,11
11	09/10/09	MPF30S	2	16	46	10,06	6,53	0,16
37	10/10/09		3	24	57	9,56	6,77	0,16
2	07/10/09		1	16	43	10,74	7,73	0,1
13	07/10/09	TEST20NoS	2	18	46	9,38	7,14	0,1
33	08/10/09		3	22	50	8,53	7,06	0,06
6	09/10/09		1	10	34	12,07	8,38	0,19
8	07/10/09	TEST20S	2	19	48	9,38	7,37	0,1
26	09/10/09		3	13	40	10,74	7,82	0,12
1	06/10/09		1	14	42	10,78	8,3	0,22
10	06/10/09	TEST30NoS	2	19	46	9,56	7,08	0,17
27	09/10/09		3	9	30	12,01	8,51	0,22
5	05/10/09		1	20	48	10,09	7,41	0,18
15	06/10/09	TEST30S	2	14	41	10,41	8,17	0,14
32	07/10/09		3	22	49	9.02	7,31	0.16

Tabella n. 3.35 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) dopo svinatura – LINEA B.4 (vendemmia 2009)

Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	pН	Acidità Volatile	Solforosa (mg/L)	Acido Malico
			1.4/1.0/00			2.45	(g/L)		(g/L)
24	CDIO20N C	1	14/10/09	14,25	7,1	3,45	0,18	68	1,29
16	CRIO20NoS	2	14/10/09	13,3	1	3,38	0,12	54	1,1
28	-	3	16/10/09	13,8	2,2	3,4	0,16	72	1,07
22		1	1.4/1.0/00	115	2.5	2 42	0.16	55	1.14
23	CDIO20G	1 2	14/10/09	14,5	2,5	3,43	0,16	55	1,14
14	CRIO20S	3	14/10/09	13,55	1,1	3,42	0,16	47 52	1,08
30		<u> </u>	16/10/09	14,25	2,2	3,41	0,16	52	1,02
20		1	14/10/09	14,15	1,6	3,5	0,27	51	0,97
12	CRIO30NoS	2	14/10/09	13,75	1,0	3,48	0,27	49	0,97
35	CKIOSUNOS	3		14,35	1,2	3,48	0,28	62	0,92
35			16/10/09	14,33	1,2	3,48	0,32	- 02	0,92
22		1	14/10/09	14,5	1,3	3,52	0,29	45	0,98
18	CRIO30S	2	14/10/09	13,5	1,5	3,48	0,29	43	0,98
34	CKIUSUS	3	16/10/09	14,15	1	3,46	0,27	46	0,93
34		<u></u>	10/10/09	14,13		2,40	0,20		0,01
21		1	17/10/09	14,65	2,8	3,51	0,26	55	1,17
7	MPF20NoS	2	18/10/09	13,9	1	3,43	0,16	54	1,02
36	WII 1 201103	3	19/10/09	14,2	1,2	3,46	0,10	70	0,97
30			17/10/07	17,2	1,2	3,70	0,22	- 70	0,77
25		1	17/10/09	14,6	1,7	3,52	0,19	45	1,17
9	MPF20S	2	18/10/09	14,95	1	3,48	0,15	43	0,96
31	11111205	3	19/10/09	14,05	1,2	3,49	0,15	57	1
31			17/10/07	14,03		3,77	0,13		
3		1	17/10/09	14,6	1,4	3,57	0.4	54	0,84
17	MPF30NoS	2	18/10/09	14	1	3,55	0,29	47	0,79
29	111111111111111111111111111111111111111	3	19/10/09	14,15	1,4	3,46	0,19	70	1,04
			17/10/07	1 1,12	-,,	.,			1,0.
4		1	17/10/09	14,35	1,1	3,55	0,35	42	0,79
11	MPF30S	2	18/10/09	13,8	1	3,53	0,31	52	0,73
37		3	19/10/09	14,35	1,4	3,57	0,31	56	0,81
<u> </u>	•			. ,	, , .	- ,	- ,= -		- ,
2		1	14/10/09	14,3	1,4	3,39	0,18	53	1,14
13	TEST20NoS	2	14/10/09	13,35	1	3,38	0,14	69	1,03
33		3	16/10/09	14,15	1	3,42	0,15	69	1,15
									-
6		1	14/10/09	14,6	7,2	3,46	0,2	62	1,3
8	TEST20S	2	14/10/09	13,55	1	3,4	0,17	55	0,95
26		3	16/10/09	14,4	1,3	3,42	0,16	63	1,1
					-		_		
1		1	14/10/09	14,35	1,2	3,51	0,35	56	1
10	TEST30NoS	2	14/10/09	13,45	1	3,5	0,25	48	0,98
27		3	16/10/09	14,3	1,6	3,47	0,3	56	0,93
				·					\neg
5		1	14/10/09	14,25	1	3,54	0,31	46	0,92
15	TEST30S	2	14/10/09	13,5	1	3,51	0,26	51	0,88
32		3	16/10/09	14,15	1	3,5	0,29	56	0,93

3.6.7 Analisi Statistica dei dati

Al fine di valutare se le popolazioni dei lieviti fossero state influenzate significativamente dai diversi trattamenti enologici previsti dal piano sperimentale, sono stati sottoposti ad analisi della varianza, i seguenti parametri:

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18 ore dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18 ore dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione (non-SACC2)
- e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- f. Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento
- g. Numero di generazioni dei *non-Saccharomyces* tra primo e secondo campionamento
- h. Mortalità dei lieviti non -Saccharomyces
- i. Percentuale dei non-Saccharomyces sul totale dei lieviti 18h dopo l'inoculo del lievito starter

Nella tabella 3.36 sono mostrate le variabili in funzione della significatività

Tabella n. 3.36 Variabili significative dei parametri considerati nell'analisi statistica.

nen anans.	i statistica.
	SIGNIFICATIVE
SACC1	TRATTAMENTO
NON-SACC1	TRATTAMENTO
SACC2	TRATTAMENTO TRATTAMENTO*TEMPERATURA
NON-SACC2	TRATTAMENTO
RENDIMENTO DI CRESCITA SACC	TRATTAMENTO TRATTAMENTO*TEMPERATURA
N° GENERAZIONI TRA SACC1 e SACC2	TRATTAMENTO TRATTAMENTO*TEMPERATURA
N° GENERAZIONI NON-SACC1 E NON-SACC2	TRATTAMENTO TRATTAMENTO*TEMPERATURA
MORTALITA' NON-SACC	TRATTAMENTO e TEMPERATURA
% NON-SACC SUL TOTALE	RAPLICA

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica dei soli parametri per i quali almeno una variabile è risultata statisticamente significativa.

a. <u>Popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo</u>

A	nalysis of Var	iance	•		
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRATTAMENTO\$	5.878E+013	2	2.939E+013	6.971	0.004
TEMPERATURA	1.467E+013	1	1.467E+013	3.479	0.074
SALASSO\$	5.921E+012	1	5.921E+012	1.404	0.248
REPLICA	1.056E+013	2	5.278E+012	1.252	0.304
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	2.816E+013	2	1.408E+013	3.340	0.053
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.743E+013	2	8.715E+012	2.067	0.148
SALASSO\$*TEMPERATURA	2.549E+012	1	2.549E+012	0.605	0.444
Error	1.012E+014	24	4.216E+012		

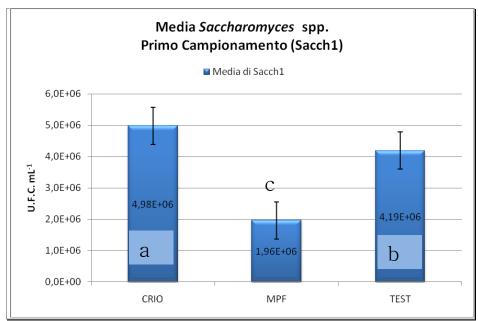


Figura n. 3.47 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Saccharomyces cerevisiae 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo presenta differenze significative per le tesi CRIO che mostrano una popolazione significativamente maggiore rispetto alle tesi MPF e TEST.

b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo

Α	nalysis of Var	iance)		
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRATTAMENTO\$	1.658E+013	2	8.288E+012	6.793	0.004
TEMPERATURA	3.053E+011	1	3.053E+011	0.250	0.621
SALASSO\$	1.167E+009	1	1.167E+009	0.001	0.976
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	7.166E+012	2	3.583E+012	2.937	0.071
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	2.379E+012	2	1.190E+012	0.975	0.391
SALASSO\$*TEMPERATURA	4.193E+011	1	4.193E+011	0.344	0.563
Error	3.172E+013	26	1.220E+012		

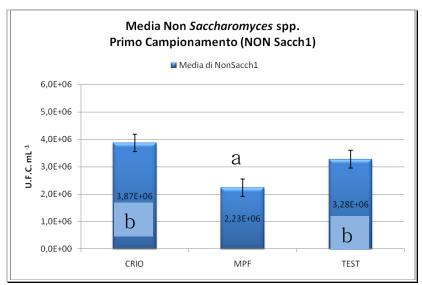


Figura n. 3.48 Effetto del trattamento sulle popolazioni Non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo presenta valori significativamente maggiori per le tesi CRIO rispetto alle tesi MPF, solamente nel caso delle vinificazioni condotte a 30°C.

c. Popolazione di *S. cerevisiae* in fermentazione

Analysis of Variance						
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value	
TRATTAMENTO\$	1.016E+015	2	5.078E+014	4.381	0.023	
TEMPERATURA	4.422E+013	1	4.422E+013	0.381	0.542	
SALASSO\$	1.750E+013	1	1.750E+013	0.151	0.701	
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	6.114E+014	2	3.057E+014	2.637	0.091	
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.462E+014	2	7.308E+013	0.630	0.540	
SALASSO\$*TEMPERATURA	5.903E+013	1	5.903E+013	0.509	0.482	
Error	3.014E+015	26	1.159E+014			

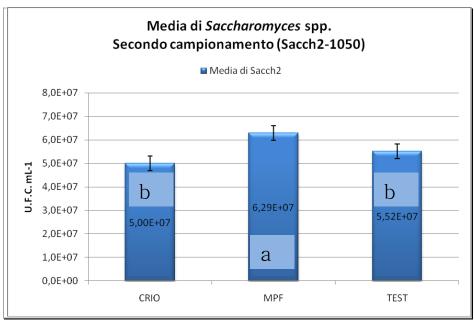


Figura n. 3.49 Effetto del trattamento sulle popolazioni di S. cerevisiae a densità 1050 - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* rilevata in corrispondenza del campionamento effettuato a densità 1050 presenta valori significativamente maggiori per le tesi MPF rispetto alle tesi CRIO. Come è possibile notare dalla figura 3.50, che riporta l'effetto del trattamento alle due temperature di fermentazione, tale osservazione è vera solo nel caso delle tesi condotte a 30°C.

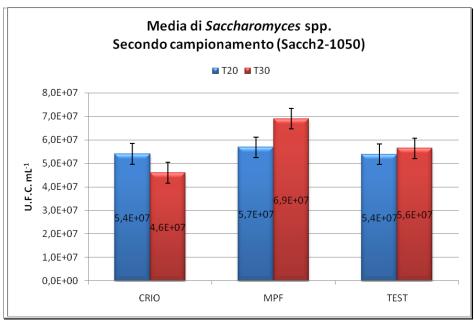


Figura n. 3.50 Effetto del trattamento sulle popolazioni Non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

d. Popolazione dei non-Saccharomyces in fermentazione

Analysis of Variance						
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value	
TRATTAMENTO\$	6.074E+012	2	3.037E+012	3.721	0.038	
TEMPERATURA	4.906E+011	1	4.906E+011	0.601	0.445	
SALASSO\$	2.413E+011	1	2.413E+011	0.296	0.591	
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	1.954E+012	2	9.768E+011	1.197	0.318	
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.234E+012	2	6.170E+011	0.756	0.480	
SALASSO\$*TEMPERATURA	4.461E+011	1	4.461E+011	0.547	0.466	
Error	2.122E+013	26	8.161E+011			

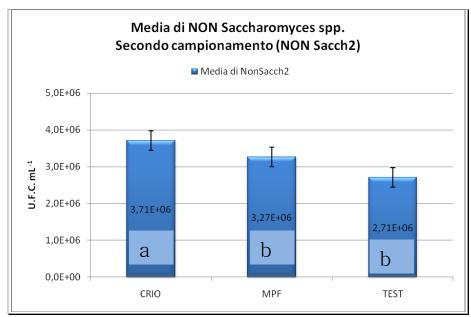


Figura n. 3.51 Effetto del trattamento sulle popolazioni Non-Saccharomyces a densità 1050 - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione dei non-Saccharomyces rilevata in corrispondenza del campionamento effettuato a densità 1050 presenta valori significativamente maggiori per le tesi CRIO rispetto alle tesi TEST.

e. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae.

Analysis of Variance						
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value	
TRATTAMENTO\$	1.343E+015	2	6.715E+014	6.473	0.005	
TEMPERATURA	1.643E+013	1	1.643E+013	0.158	0.694	
SALASSO\$	1.647E+012	1	1.647E+012	0.016	0.901	
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	7.524E+014	2	3.762E+014	3.626	0.041	
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.218E+014	2	6.089E+013	0.587	0.563	
SALASSO\$*TEMPERATURA	8.333E+012	1	8.333E+012	0.080	0.779	
Error	2.697E+015	26	1.037E+014			

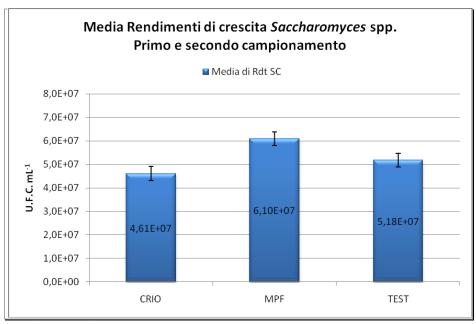


Figura n. 3.52 Effetto del trattamento sul rendimento di crescita di S. cerevisiae tra il primo e secondo campionamento LINEA B.4 (anno 2010)

Tra il primo ed il secondo campionamento *S. cerevisiae* ha mostrato un rendimento di crescita significativamente maggiore per le tesi MPF rispetto alle tesi CRIO. Come è possibile notare dalla figura 3.53, che riporta l'effetto del trattamento alle due temperature di fermentazione, tale osservazione è vera solo nel caso delle tesi condotte a 30°C.

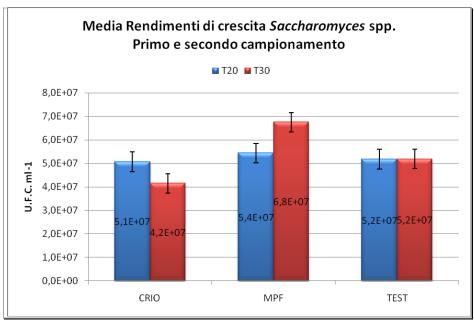


Figura n. 3.53 Effetto del trattamento sulle popolazioni Non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

g. <u>Numero di generazioni di S. cerevisiae</u> tra primo e secondo campionamento

Analysis of Variance						
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value	
TRATTAMENTO\$	18.252	2	9.126	12.106	0.000	
TEMPERATURA	0.118	1	0.118	0.157	0.695	
SALASSO\$	0.984	1	0.984	1.306	0.264	
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	7.202	2	3.601	4.776	0.017	
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.046	2	0.523	0.694	0.509	
SALASSO\$*TEMPERATURA	0.260	1	0.260	0.346	0.562	
Error	19.600	26	0.754			

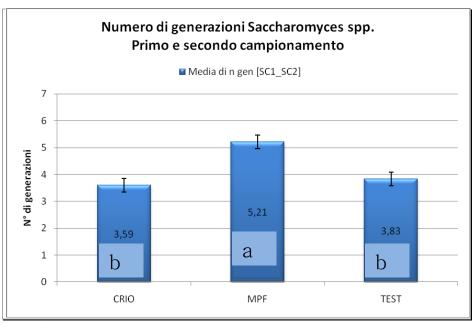


Figura n. 3.54 Effetto del trattamento sul numero di generazioni compiuto da S. cerevisiae tra il primo ed il secondo campionamento-LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Tra il primo ed il secondo campionamento la popolazione di *S. cerevisiae* ha compiuto un numero di generazioni significativamente maggiore per le tesi MPF rispetto alle altre due tesi. Come è possibile notare dalla figura 3.55, che riporta l'effetto del trattamento, per il parametro considerato, alle due temperature di fermentazione, tale osservazione è particolarmente vera nel caso delle tesi condotte a 30°C.

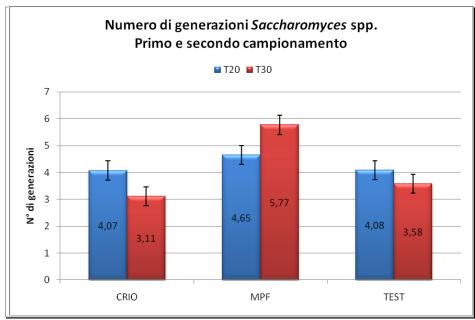


Figura n. 3.55 Effetto del trattamento sulle popolazioni Non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

g. <u>Numero di generazioni dei non-Saccharomyces</u> tra primo <u>e secondo campionamento</u>

	Analysis of Va	riance	•		
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRATTAMENTO\$	6.433	2	3.216	9.082	0.001
TEMPERATURA	0.141	1	0.141	0.399	0.533
SALASSO\$	0.191	1	0.191	0.540	0.469
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	4.185	2	2.092	5.908	0.008
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	2.236	2	1.118	3.158	0.059
SALASSO\$*TEMPERATURA	0.072	1	0.072	0.204	0.655
Error	9.208	26	0.354		

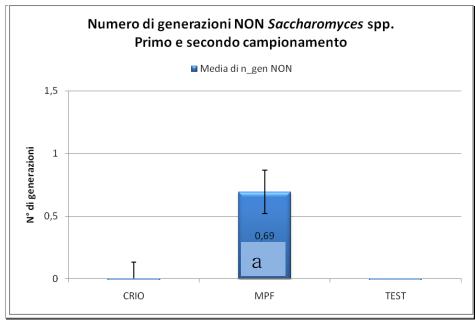


Figura n. 3.56 Effetto del trattamento sul numero di generazioni compiuto dai non-Saccharomyces tra il primo ed il secondo campionamento- LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Tra il primo ed il secondo campionamento la popolazione dei lieviti non-Saccharomyces ha compiuto un numero di generazioni significativamente maggiore per le tesi MPF rispetto alle altre due tesi. Come è possibile notare dalla figura 3.57, che riporta l'effetto del trattamento, per il parametro considerato, alle due temperature di fermentazione, tale osservazione è particolarmente vera nel caso delle tesi condotte a 30°C.

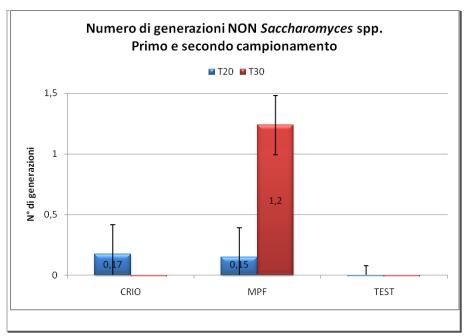


Figura n. 3.57 Effetto del trattamento sul numero di generazioni compiuto da S. cerevisae tra il primo ed il secondo campionamento-LINEA B.4 (vendemmia 2010)

h. Mortalità dei lieviti non-Saccharomyces

	Analysis of Var	iance			
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
TRATTAMENTO\$	6.487E+012	2	3.244E+012	2.879	0.074
TEMPERATURA	6.402E+012	1	6.402E+012	5.683	0.025
SALASSO\$	3.708E+011	1	3.708E+011	0.329	0.571
TEMPERATURA*TRATTAMENTO\$	1.091E+011	2	5.456E+010	0.048	0.953
SALASSO\$*TRATTAMENTO\$	1.886E+012	2	9.432E+011	0.837	0.444
SALASSO\$*TEMPERATURA	7.420E+011	1	7.420E+011	0.659	0.424
Error	2.929E+013	26	1.127E+012		

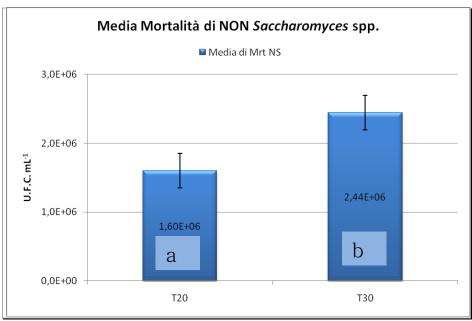


Figura n. 3.58 Effetto della temperatura sulla mortalità dei Non-Saccharomyces - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Le popolazioni di lieviti non-Saccharomyces presentano un livello di mortalità significativamente maggiore nelle tesi condotte a 20°C rispetto a quelle condotte a 30°C.

Dopo aver effettuato l'analisi della varianza multivariata, al fine di valutare in modo globale l'effetto dei trattamenti sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti principali (figura 3.59). Per tale analisi sono stati presi in considerazione sia parametri chimici, a densità del mosto 1020, che microbiologici: popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s 18h dopo l'inoculo (Sacc1 e Non-Sacc1), popolazione di *S. cerevisiae* e non-*Saccharomyce*s al secondo campionamento (Sacc2 e Non-Sacc2), glucosio, fruttosio, glicerina, Ac. Acetico ed etanolo (EtOH). La distribuzione delle variabili è riportata in figura 3.25.

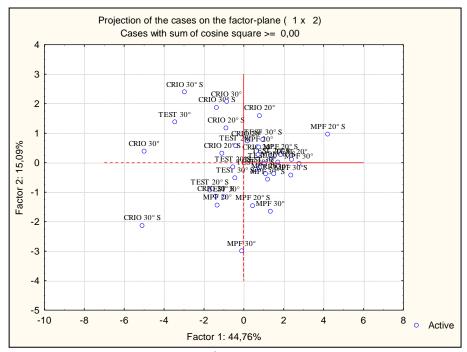


Figura n. 3.59 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.4 (vendemmia 2009)

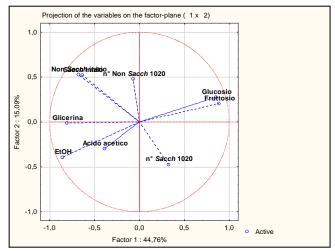


Figura n. 3.60 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.4 (vendemmia 2009)

3.7 Linea di ricerca B.4 (anno 2010)

3.7.1 Composizione chimica delle uve e dei mosti

Le caratteristiche chimico-fisiche delle uve impiegate per l'allestimento delle vasche sono riportate nella tabella 3.37.

Tabella n. 3.37 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) delle uve impiegate per la LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Replica	Data	Campione	Zuccheri (g/L)	pН	Acidità Totale (g/L)	Acido Malico (g/L)	Acido Tartarico (g/L)	APA (mg/L)
		1	197	3,43	6,86	2,75	3,9	57
R1 09/10/10	00/10/10	2	200	3,42	6,84	2,93	4,0	62
	3	197	3,37	7,32	2,99	4,0	39	
		4	209	3,40	6,55	2,57	3,8	35
		1	216	3,39	6,74	2,99	4,8	69
R2	10/10/10	2	221	3,38	6,72	2,76	4,3	58
112	10/10/10	3	220	3,33	7,06	2,71	5,2	58
		4	214	3,39	6,82	3,01	5,1	70
		1	227	3,31	7,50	3,06	5,7	91
R3	12/10/10	2	227	3,33	6,96	2,92	5,7	81
K3	12/10/10	3	231	3,36	7,46	3,17	5,3	78
		4	227	3,36	7,12	3,2	5,5	83

Osservando i valori riportati in tabella è possibile notare una significativa disomogeneità tra le repliche. Infatti la quantità di zuccheri rilevati nelle uve di partenza della replica 1 è mediamente di 200 g/L mentre nella replica 3 raggiunge valori compresi tra 227 e 231 g/L. A differenza delle altre annate i valori di pH sono mediamente più bassi ma consoni ai valori normalmente ritrovati nelle uve della varietà Sangiovese. Infine, è importante sottolineare che per le uve di ciascuna replica sono stati rilevati valori di azoto prontamente assimilabile molto inferiori ai 150 mg/L considerati il valore ottimale per il corretto sviluppo dei lieviti.

Nella tabella 3.38 sono riportate le principali caratteristiche chimiche dei mosti al riempimento delle vasche. In tutte le vinificazioni i valori osservati sono risultati molto simili. In particolare, rispetto ai due precedenti anni di

sperimentazione i mosti di partenza presentavano generalmente valori più bassi di pH, compresi tra 3,35 e 3,44. Per quanto riguarda l'anidride solforosa totale, occorre specificare che le quantità elevate, riscontrate in alcune delle vasche in esame sono da imputare alla difficoltà di omogeneizzazione della massa nei primi giorni di fermentazione. Le analisi chimiche fatte successivamente dimostrano quanto detto.

Tabella n. 3.38 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) all'inizio della fermentazione – LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Tesi	Replica	Data	Etanolo (% v/v)	Zuccheri (g/L)	Acidità Totale (g/L)	pН	Acidità Volatile (g/L)	Solforosa (mg/L)
4		1	11/10/10	< 0,10	223	6,20	3,43	< 0.05	83
12	CRIO20NoS	2	12/10/10	< 0.10	214	5,88	3,37	0.05	64
33		3	13/10/10	< 0,10	225	6,01	3,38	< 0,05	46
					-				
6		1	11/10/10	< 0,10	222	5,73	3,44	0,05	57
7	CRIO20S	2	12/10/10	< 0,10	218	5,66	3,39	0,06	65
36		3	13/10/10	< 0,10	229	5,80	3,41	< 0,05	90
21		1	11/10/10	< 0,10	225	6,27	3,41	< 0,05	80
15	CRIO30NoS	2	12/10/10	2,05	175	7,01	3,34	0,13	78
27		3	13/10/10	< 0,10	228	6,37	3,39	< 0,05	100
	-				-				
23		1	11/10/10	< 0,10	222	5,81	3,44	< 0,05	82
10	CRIO30S	2	12/10/10	< 0,10	220	6,36	3,40	0,10	59
30		3	13/10/10	< 0,10	228	6,01	3,42	< 0,05	79
3		1	11/10/10	< 0,10	219	5,57	3,38	0,07	66
18	MPF20NoS	2	12/10/10	< 0,10	219	5,46	3,32	< 0,05	82
37		3	13/10/10	< 0,10	227	6,23	3,34	< 0,05	69
25		1	11/10/10	< 0,10	225	5,57	3,37	0,05	64
9	MPF20S	2	12/10/10	< 0,10	218	5,45	3,33	0,05	56
34		3	13/10/10	< 0,10	228	6,25	3,35	< 0,05	55
5		1	11/10/10	< 0,10	220	5,61	3,38	0,07	73
13	MPF30NoS	2	12/10/10	< 0,10	215	5,70	3,31	0,08	82
31		3	13/10/10	< 0,10	226	5,87	3,35	< 0,05	111
			11/10/10	0.10	222	5.50	2.24	0.04	- 1
1	MDE20G	1	11/10/10	< 0,10	222	5,70	3,34	0,06	64
16	MPF30S	2	12/10/10	< 0,10	215	5,69	3,33	0,07	66
28		3	13/10/10	< 0,10	224	6,27	3,35	< 0,05	95
2		1	11/10/10	0,40	216	5,89	3,40	0,12	60
8	TEST20NoS	2	12/10/10	< 0.10	218	6,20	3,33	0,12	83
32	11201201103	3	13/10/10	< 0.10	226	6,83	3,38	0,03	84
32		<u> </u>	13/10/10	V 0,10		0,03	3,30	0,07	07
20		1	11/10/10	0,50	213	6,45	3,40	0,12	58
14	TEST20S	2	12/10/10	0,50	208	5,97	3,35	0,09	62
26		3	13/10/10	< 0,10	223	6,69	3,37	0,09	68
			-5/10/10	,		0,07	2,01	,-,	
24		1	11/10/10	0,50	213	6,43	3,42	0,11	46
17	TEST30NoS	2	12/10/10	0,40	212	6,30	3,35	0,08	78
29		3	13/10/10	0,30	222	6,83	3,37	0,09	97
22		1	11/10/10	0,30	219	6,33	3,40	0,09	52
11	TEST30S	2	12/10/10	0,65	202	6,32	3,36	0,15	74
35		3	13/10/10	< 0,10	225	6,92	3,38	0,08	67
				-		•			

3.7.2 Valutazione dei profili termici delle diverse tesi

Per poter confrontare e valutare in modo ottimale i risultati microbiologici e chimici ottenuti, in fase preliminare per ciascuna vinificazione è stato necessario verificare che i profili termici abbiano rispettato le condizioni descritte dal protocollo.

Per fare ciò, a partire dal primo giorno del riempimento delle vasche e per tutta la durata della fermentazione è stata rilevata in continuo la temperatura del mosto-vino e sono stati determinati ogni 12 ore i valori di temperatura media in modo da ottenere i profili termici di ciascuna vinificazione. La figura 3.61 riporta i profili termici delle fermentazioni condotte a 20°C divisi per replica. In prima analisi si nota come, in ogni replica, le temperature non sono state sostanzialmente influenzate dall'operazione di salasso. Inoltre, è possibile osservare che, in ciascuna delle tre repliche e per ciascun trattamento sono stati rispettati i profili termici desiderati. Infatti, come previsto dal protocollo di vinificazione, indipendentemente dalla replica; nelle tesi TEST (testimone non trattato), già a partire dal primo giorno e per tutta la durata della fermentazione la temperatura si è costantemente mantenuta attorno ai 20°C, senza subire in nessun caso variazioni significative; nelle tesi CRIO, dopo una prima fase a temperature attorno ai 15°C, normale conseguenza del processo di crioestrazione, la temperatura si è stabilizzata a valori prossimi ai 20°C, e anche nelle tesi MPF, dopo la fase di macerazione prefermentativa, avvenuta correttamente, la temperatura si è stabilizzata a 20°C.

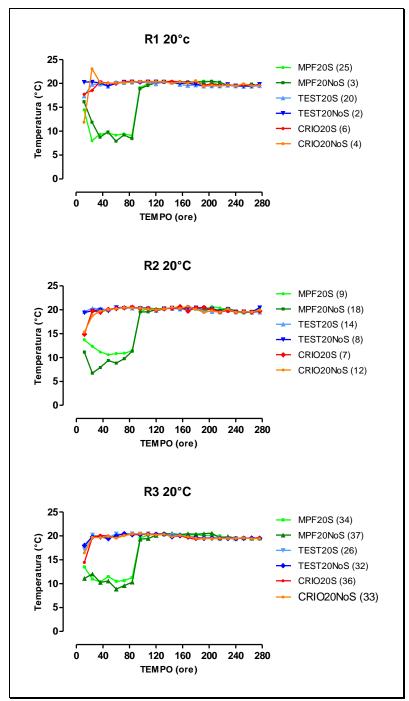


Figura n. 3.61 Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 20°C

LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Analizzando i profili termici relativi alle vinificazioni condotte a 30°C (figura 3.62) emerge che anche in questo caso sono stati sostanzialmente rispettati i profili termici desiderati. Tuttavia, è possibile osservare come che nel caso delle tesi CRIO30S della replica1 e della replica3, durante la fase di innalzamento della temperatura verso i 30°C, si sia verificato un temporaneo ed inusuale abbassamento della temperatura, ma successivamente è stata correttamente mantenuta, come nelle altre vinificazioni, attorno ai 30°C previsti dal protocollo.

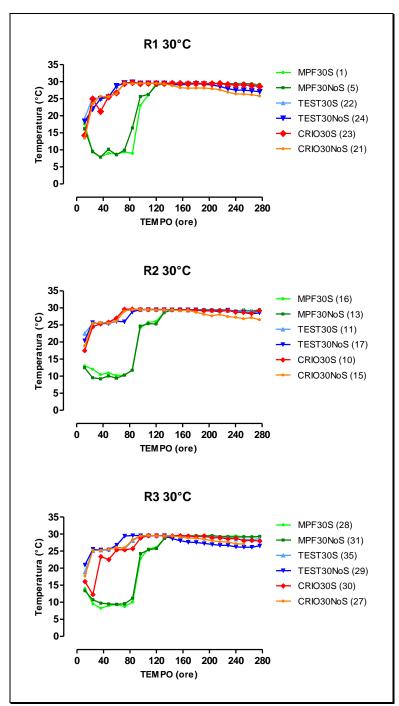


Figura n. 3.62 Profili termici delle vinificazioni condotte in triplo a 30°C

LINEA B.4 (vendemmia 2010)

3.7.3 Valutazione della flora indigena della cantina

In questa fase, ai fini di individuare la presenza di ceppi di Saccharomyces spp. diversi da quello utilizzato per indurre la fermentazione, è stata effettuata l'analisi microbiologica della superficie interna di 9 vasche scelte in modo random prima del loro riempimento e dell'aria all'interno della cantina. Per quanto riguarda la determinazione della flora presente all'interno delle vasche, sono stati effettuati 27 tamponi, tre per ciascuna vasca, i quali sono stati successivamente seminati in piastre Petri contenenti uno specifico mezzo di coltura (WL Oxoid). Da due delle nove vasche campionate sono state isolate 20 colonie di S. cerevisiae che sono state caratterizzate tramite analisi delle regioni interdelta. I risultati ottenuti hanno evidenziato che tutti gli isolati presentavano lo stesso profilo del ceppo starter utilizzato per indurre la fermentazione.

Dal campionamento all'aria, effettuato durante il periodo di vendemmia posizionando in varie parti della cantina piastre Petri contenenti due mezzi di coltura specifici per lo sviluppo dei lieviti (WL ed AL Oxoid), non è stato isolato alcun ceppo di lievito.

3.7.4 Valutazione dell'inoculo

Indipendentemente dalle diverse tesi, la fermentazione alcolica è stata indotta mediante inoculo del lievito commerciale Lalvin EC-1118 appartenente alla specie *S. cerevisiae*. Per verificare la buona riuscita dell'inoculo, prima di effettuare suddetta operazione sono stati prelevati due campioni del preparato commerciale e ne è stata valutata la vitalità.

La vitalità cellulare del lievito commerciale, espressa come numero di cellule vitali per grammo di prodotto, è stata determinata, dopo opportune diluizioni decimali seriali in tampone fosfato PBS, mediante conta al microscopio ad epifluorescenza e camera di Thoma, utilizzando come colorante la fluoresceina diacetato, secondo il protocollo riportato da Granchi *et al.*, 2006. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il lotto del lievito commerciale utilizzato per tutte le vinificazioni presentava una vitalità pari a 8.88×10^9 cellule vitali per grammo di prodotto. Considerando che ciascuna vinificazione è stata inoculata con 28g/hL di LSA e che ogni vasca conteneva circa 7 hL di mosto, per ciascuna fermentazione il valore teorico dell'inoculo era pari a 2.49×10^6 cellule per millilitro di mosto.

Tuttavia, prima di essere inoculata la coltura selezionata di LSA è stata reidratata manualmente, e per determinare la quantità di UFC/mL realmente apportate al mosto, per ciascun inoculo è stata valutata la vitalità della soluzione mediante semina di tale opportunamente diluita, in piastre Petri contenenti mezzo specifico per lo sviluppo dei lieviti (WL ed AL Oxoid). Dai risultati ottenuti dalle conte in piastra, considerando che per vinificazione, corrispondente ad un trattamento, sono stati aggiunti a 7 hL di mosto 2,4 L di soluzione reidratata di LSA, la quantità di UFC/mL realmente apportate al mosto con ciascun inoculo è stata di $2.2 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$.

3.7.5 Valutazione degli andamenti fermentativi

Nel corso della vinificazione, per tutte le tesi allestite, a partire dal primo giorno e durante lo svolgimento dell'intero processo fermentativo, è stata determinata la densità giornaliera del mosto-vino (figure 3.63-3.64). Osservando i grafici sottostanti si nota che, indipendentemente dalla temperatura e dalla tesi tutte le fermentazioni si sono svolte regolarmente giungendo al termine senza particolari problemi.

Come era lecito aspettarsi le vinificazioni condotte a 30°C sono giunte a termine più rapidamente rispetto a quelle

condotte a 20°C, che tuttavia sono terminate nel giro di 9-10 giorni.

Interessante sottolineare che ad una prima analisi, (da confermare statisticamente), la pratica del salasso determina una maggiore velocità di fermentazione.

In linea generale le vinificazioni hanno seguito gli andamenti previsti e riscontrati nei due anni precedenti. Infatti, mentre le tesi CRIO e TEST, presentano un andamento regolare, come atteso, nel caso della tesi MPF, indipendentemente dalla temperatura di fermentazione, la densità è rimasta pressoché costante per i primi 3-4 giorni di fermentazione, dal momento che tali masse venivano mantenute a temperatura inferiore ai 10°C per le 48-72h successive alla messa in vasca del pigiato.

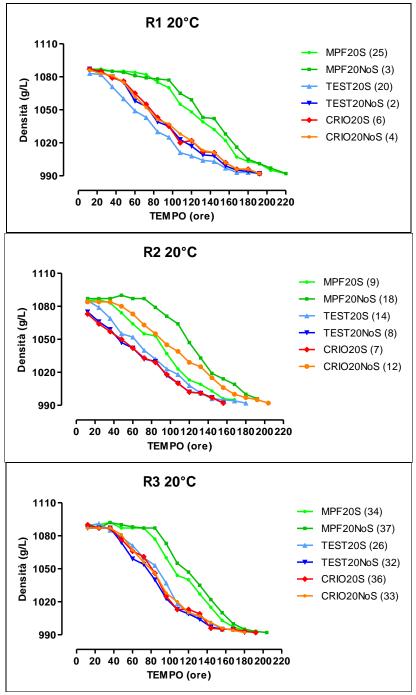


Figura n. 3.63 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 20°C
- LINEA B.4 (vendemmia 2010)

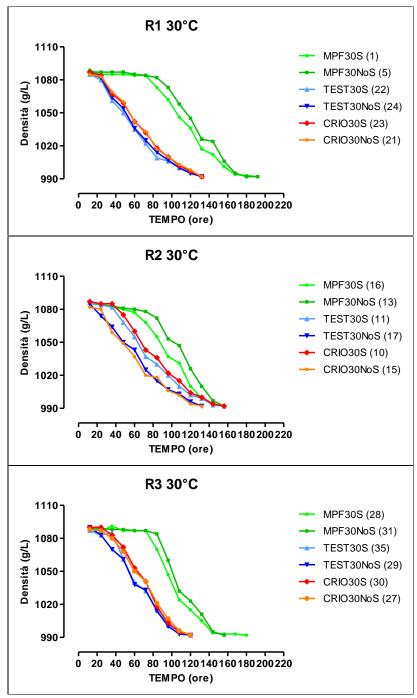


Figura n. 3.64 Andamento della densità delle vinificazioni condotte a 30°C
- LINEA B.4 (vendemmia 2010)

3.7.6 Popolazione dei lieviti durante la fermentazione alcolica

L'analisi microbiologica è stata condotta su campioni di mosto e di vino prelevati presso la cantina sperimentale. In conseguenza dell'eliminazione di due delle tre linee di ricerca è stato deciso di analizzare un maggior numero di campioni di mosto prelevati durante la fermentazione alcolica in modo da poter descrivere un vero e proprio andamento delle popolazioni microbiologiche.

In figura 3.65, 3.66 e 3.67 sono riportati gli andamenti giornalieri delle popolazioni di *S. cerevisiae* e dei lieviti non-*Saccharomyces* per ciascuna delle tesi oggetto di studio.

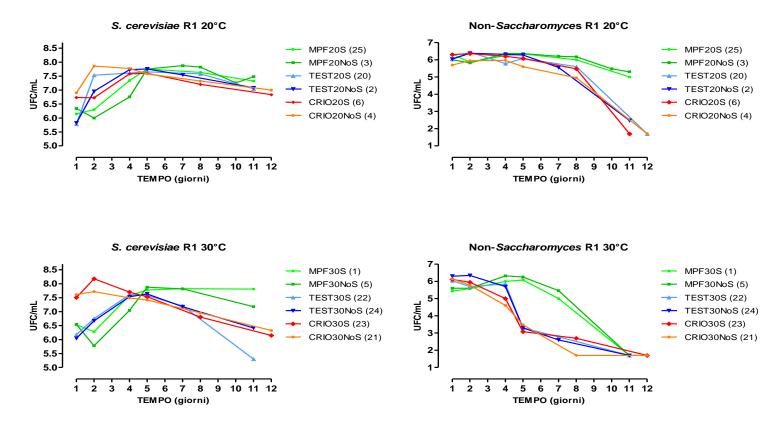


Figura n. 3.65 Evoluzione delle popolazioni di S. cerevisiae e Non-Saccharomyces durante la fermentazione (R1 20 e 30°C)

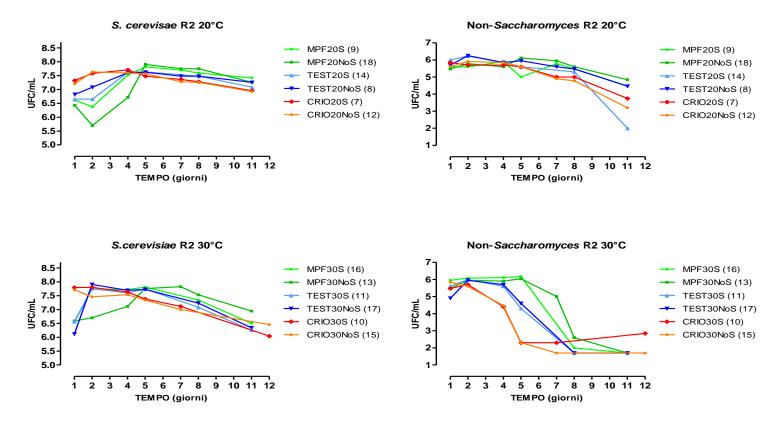


Figura n. 3.66 Evoluzione delle popolazioni di S. cerevisiae e Non-Saccharomyces durante la fermentazione (R2 20 e 30°C)

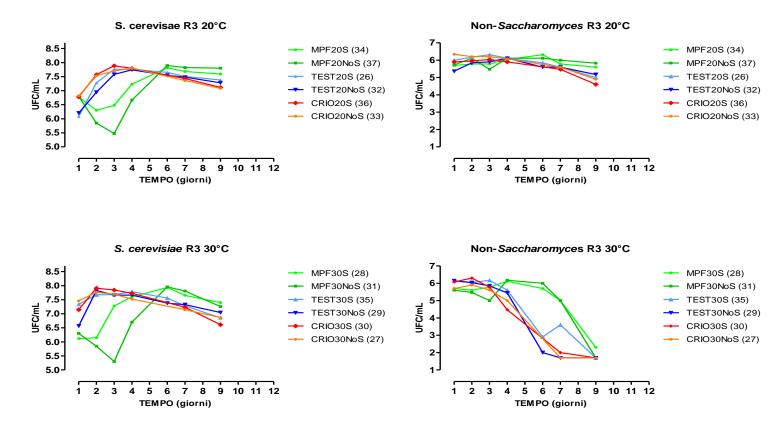


Figura n. 3.67 Evoluzione delle popolazioni di S. cerevisiae e Non-Saccharomyces durante la fermentazione (R3 20 e 30°C).

3.7.7 Valutazione della dominanza del ceppo starter inoculato

Per verificare se il ceppo starter *S. cerevisiae* EC1118, utilizzato per indurre la fermentazione in tutte le vinificazioni allestite, sia stato realmente capace di dominare l'intero processo fermentativo, da ciascuna delle 6 tesi a 20°C della replica 1 sono state selezionate 9 colonie di *S. cerevisiae* all'inizio e alla fine della fermentazione ed è stata effettuata la loro biotipizzazione tramite analisi delle regioni interdelta. I risultati ottenuti hanno evidenziato che tutti gli isolati presentavano lo stesso profilo del ceppo starter ad eccezione di un ceppo isolato ad inizio e due isolati a fine fermentazione i quali presentavano tra loro lo stesso profilo (figura 3.68).

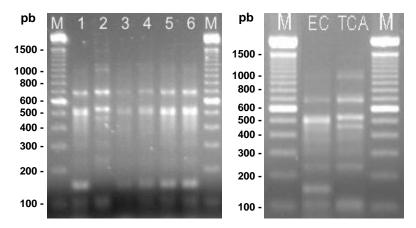


Figura n. 3.68 Risultato dell'analisi PCR della regione inter-8. A sinistra: profili di diversi isolati di S. cerevisiae. Il profilo 2 si differenzia dai profili degli altri isolati e da quello del ceppo starter EC1118. A destra: il ceppo EC1118 utilizzato per l'inoculo (EC) ed il ceppo isolato da una vasca in fermentazione (TCA). In entrambe le fotografie la sigla M indica il marker L100 utilizzato come riferimento.

3.7.8 Identificazione e quantificazione speciologica dei lieviti Non-Saccharomyces

Per ottenere informazioni sul quadro microbiologico dei vini ottenuti con ciascuna tesi, è stata effettuata la determinazione speciologica delle popolazioni di lieviti non-Saccharomyces.

A tal fine, per ogni campione di mosto o vino analizzato, sono state individuate sul terreno WL tutte le diverse tipologie di colonie in base al loro colore e alla loro morfologia (tabella 3.39) e, un numero rappresentativo di ciascuna morfologia, prelevato casualmente dai vari campioni, è stato sottoposto al protocollo di identificazione che prevedeva l'amplificazione e la digestione dello spaziatore ribosomiale interno trascritto (RFLP-PCR del'rITS) utilizzando le endonucleasi di restrizione Hinf I. CfoI e HaeIII. Riassumendo, in base ai risultati ottenuti, i lieviti sono stati identificati come appartenenti alle specie C. zemplinina (Sipiczki, 2003); C. famata (Granchi et al., 1999); I. terricola, C. sorbosa, K. apiculata, P. fermentans (Esteve Zarzoso et al., 1999) e S. cerevisiae (Guillamòn et al., 1998).

Tabella n. 3.39 Descrizione delle diverse tipologie di colonia riscontrate dopo semina su terreno WL dei vari campioni di mosto vino, dimensioni degli ampliconi (AP) e dei frammenti di restrizione ottenuti dopo RFLP-PCR dell'rITS e specie di lievito identificate

Sigla Isolati	Morfologia della colonia	AP (pb)		menti di pb)	Specie di	
			Hinf I	CfoI	HaeIII	печно
V1,V4,V6,V7, V10,V12,V13,V 16,V17	Colore verde intenso, dimensione medio/grande, profilo piatto, superficie liscia opaca e consistenza burrosa	750	350,200, 180	320,310, 105	750	Kloeckera apiculata
bv2,bv4,bv7,bv9 bv14,bv16,bv18	Colore bianco con puntino centrale verde, dimensioni ridotte, profilo a cupola, superficie liscia lucida e consistenza cremosa	468	245,230	220,130	468	Candida zemplinina
b2,b5,b7,b10,b12 ,b14,b15	Colore bianco, dimensioni molto ridotte, profilo a cupola, superficie liscia opaca e consistenza cremosa	468	245,230	220,130	468	Candida zemplinina
R5,R9,R11,R13, R15,R17	Colore bianco, dimensioni medio/grandi, profilo piatto, superficie rugosa opaca e consistenza cremosa	500	270,120, 110	215,100, 80	300,90,90	Candida sorbosa
b3,b17	Colore bianco, dimensioni molto ridotte, profilo a cupola, superficie liscia opaca e consistenza cremosa	880	365,155	385,365	320,220, 180,145	S. cerevisiae S. paradoxu

Tabella n. 3.40 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica1) -LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	10/10/2010			$2x10^{4}$	$2,3x10^5$	$2x10^{4}$
	11/10/2010				3.8×10^5	
1	13/10/2010	MPF30S	1	$6x10^{5}$	$4x10^{5}$	
	14/10/2010			$5x10^{5}$	$7x10^{5}$	
	16/10/2010				1x10 ⁵	
	10/10/2010			$2x10^{5}$	$8x10^{5}$	$5x10^{4}$
	11/10/2010			$3x10^{5}$	$2x10^{6}$	$1x10^{5}$
2	13/10/2010	TEST20NoS	1	$3x10^{5}$	$1,8x10^6$	
	14/10/2010				$1,9x10^6$	
	16/10/2010				$3,6x10^5$	
	20/10/2010				$3x10^{2}$	
	10/10/2010			$3x10^{5}$	$5x10^{5}$	$2x10^{5}$
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	$1,7x10^5$
	13/10/2010			$8x10^{5}$	$1,5x10^6$	
3	14/10/2010	MPF20NoS	1	$9x10^{5}$	$1,4x10^6$	
	16/10/2010			$7x10^{5}$	$9x10^{5}$	
	17/10/2010			$1x10^{5}$	$1,3x10^6$	
	19/10/2010			$1x10^{5}$	$2x10^{5}$	
	20/10/2010				$2x10^{5}$	
	11/10/2010			$1x10^{5}$	3x10 ⁵	1x10 ⁵
	12/10/2010			$8x10^{5}$	$1x10^{5}$	
4	14/10/2010	CRIO20NoS	1		$9,3x10^{5}$	
	15/10/2010			$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	18/10/2010				$9x10^{4}$	
	10/10/2010	•		$1,8x10^5$	2x10 ⁵	$2x10^{4}$
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	
5	13/10/2010	MPF30NoS	1	$5x10^{5}$	$1,6x10^6$	
	14/10/2010				1.8×10^6	
	16/10/2010				$2,9x10^5$	
	11/10/2010			$1,9x10^6$	1x10 ⁶	$1x10^{5}$
	12/10/2010			$1,5x10^6$	$7x10^{5}$	$1x10^{5}$
6	14/10/2010	CRIO20S	1	$4x10^{5}$	$1,2x10^6$	
	15/10/2010			$2x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	18/10/2010			$1x10^{5}$	$2x10^{5}$	

Tabella n. 3.41 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate, in ciascuna tesi, nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica1) –LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	10/10/2010			5x10 ⁵	6x10 ⁵	$4x10^{4}$
	11/10/2010			$9x10^{5}$	$1,9x10^6$	
20	13/10/2010	TEST20S	1	$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$3x10^{5}$	$9x10^{5}$	
	16/10/2010				$4x10^{5}$	
	11/10/2010			$5x10^{5}$	$9x10^{5}$	
21	12/10/2010	CRIO30NoS	1	$3x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	14/10/2010				$4x10^{4}$	
	15/10/2010				$3x10^{3}$	
	10/10/2010			$5,1x10^5$	$5,6x10^5$	$5x10^{4}$
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	
22	13/10/2010	TEST30S	1	$3x10^{5}$	$4x10^{5}$	
	14/10/2010				$2x10^{3}$	
	16/10/2010				$6x10^{2}$	
	11/10/2010			$5x10^{5}$	$8x10^{5}$	
	12/10/2010			$3x10^{5}$	$6x10^{5}$	
23	14/10/2010	CRIO30S	1		$1x10^{4}$	
	15/10/2010				$1,2x10^3$	
	18/10/2010				$5x10^{2}$	
	22/10/2010				$1x10^{2}$	
	10/10/2010			$6x10^{5}$	$1,2x10^6$	$2x10^{5}$
	11/10/2010			$6x10^{5}$	$1,6x10^6$	
24	13/10/2010	TEST30NoS	1		$5x10^{5}$	
	14/10/2010				$2x10^{3}$	
	16/10/2010				$4x10^{2}$	
	20/10/2010				$1x10^{2}$	
	10/10/2010			6x10 ⁵	1,3x10 ⁶	$3x10^{5}$
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$6x10^{5}$	
25	13/10/2010	MPF20S	1	$1,1x10^6$	$7x10^{5}$	
	14/10/2010			$2x10^{5}$	$1,8x10^6$	$2x10^{5}$
	16/10/2010				$1x10^{6}$	
	20/10/2010				$5x10^{5}$	

Tabella n. 3.42 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate, in ciascuna tesi, nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica2) –LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	12/10/2010			$4x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	13/10/2010			$2x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	15/10/2010				$5x10^{5}$	
7	16/10/2010	CRIO20S	2		$4x10^{5}$	
	18/10/2010				1×10^{5}	
	19/10/2010				$1x10^{5}$	
	22/10/2010				$5,6x10^3$	
	11/10/2010			$2x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	12/10/2010			$1,4x10^6$	$4x10^{5}$	
	14/10/2010			$4x10^{5}$	$3x10^{5}$	
8	15/10/2010	TEST20NoS	2	$3x10^{5}$	$6x10^{5}$	
	17/10/2010				$4x10^{5}$	
	18/10/2010				$3x10^{5}$	
	21/10/2010				$2,9x10^4$	
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$2x10^{5}$	$1x10^{5}$
	12/10/2010			$2x10^{5}$	$1x10^{5}$	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$7x10^{5}$	
9	15/10/2010	MPF20S	2		$1x10^{5}$	
	17/10/2010				$6x10^{5}$	
	18/10/2010				$3x10^{5}$	
	21/10/2010				$3x10^{4}$	
	12/10/2010	•		$1x10^{5}$	2x10 ⁵	
	13/10/2010			$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	
10	15/10/2010	CRIO30S	2	$6x10^{3}$	$2x10^{4}$	
	16/10/2010				$2x10^{2}$	
	18/10/2010				$2x10^{2}$	
	22/10/2010				$7x10^{2}$	
	11/10/2010			1x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁵
11	12/10/2010	TEST30S	2	$2x10^{5}$	$8x10^{5}$	
	14/10/2010				$4x10^{5}$	
	15/10/2010				$2x10^{1}$	
	12/10/2010			1x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁵
	13/10/2010			$4x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	15/10/2010			$2x10^{5}$	$5x10^{5}$	
12	16/10/2010	CRIO20NoS	2		$4x10^{5}$	
	18/10/2010				$8x10^{4}$	
	19/10/2010				$6x10^{4}$	
	22/10/2010				$1,6x10^3$	

Tabella n. 3.43 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate, in ciascuna tesi, nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica2) –LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	11/10/2010			1x10 ⁵	2x10 ⁵	
	12/10/2010			$1x10^{5}$	$2x10^{5}$	
13	14/10/2010	MPF30NoS	2	$6x10^{5}$	$2x10^{5}$	
	15/10/2010			$1x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	17/10/2010				$1x10^{5}$	
	18/10/2010				$5x10^{2}$	
	11/10/2010			$2x10^{5}$	$6x10^{5}$	$2x10^{5}$
	12/10/2010			$5x10^{5}$	$1x10^{6}$	$2x10^{5}$
14	14/10/2010	TEST20S	2	$1x10^{5}$	$6x10^{5}$	
	15/10/2010				$4x10^{5}$	
	18/10/2010				$1x10^{5}$	
	21/10/2010				$1x10^{2}$	
	12/10/2010			$3x10^{5}$	$4x10^{5}$	
15	13/10/2010	CRIO20NoS	2	$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	15/10/2010				$3x10^{4}$	
	16/10/2010				2x10 ¹	
	11/10/2010			$2x10^{5}$	$6x10^{5}$	$1x10^{5}$
	12/10/2010			$7x10^{5}$	$5x10^{6}$	
16	14/10/2010	MPF30S	2	$1x10^{5}$	$1,1x10^6$	
	15/10/2010			$3x10^{5}$	$1,2x10^6$	
	18/10/2010				1x10 ²	
	11/10/2010			$1x10^{4}$	$7x10^{4}$	
17	12/10/2010	TEST30NoS	2	$4x10^{5}$	$5x10^{5}$	
	14/10/2010				$4x10^{5}$	$1x10^{5}$
	15/10/2010		-		4x10 ¹	
	11/10/2010			$1x10^{5}$	$1x10^{5}$	$1x10^{5}$
	12/10/2010			$1x10^{5}$	$5x10^{5}$	
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	
18	15/10/2010	MPF20NoS	2	$5x10^{5}$	$8x10^{5}$	
	17/10/2010			$2x10^{5}$	$7x10^{5}$	
	18/10/2010			$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	
	21/10/2010				$7x10^{4}$	

Tabella n. 3.44 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate, in ciascuna tesi, nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica3) –LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	13/10/2010			$2x10^{5}$	$7x10^{5}$	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$2x10^{5}$	$1,2x10^6$	$1x10^{5}$
	15/10/2010			$2x10^{5}$	$1,8x10^6$	$1x10^{5}$
26	16/10/2010	TEST20S	3	$4x10^{5}$	$9x10^{5}$	
	18/10/2010				$7x10^{5}$	
	19/10/2010				$4x10^{5}$	
	21/10/2010				$1x10^{5}$	
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$3x10^{5}$	$1x10^{5}$
27	15/10/2010	CRIO30NoS	3		$8x10^{5}$	
	16/10/2010				$4,1x10^5$	
	17/10/2010				$1,5x10^5$	
	13/10/2010			$4x10^{4}$	4,5x10 ⁵	$1x10^{4}$
	14/10/2010				$4x10^{6}$	
	15/10/2010			$3x10^{5}$	$3x10^{6}$	
28	16/10/2010	MPF30S	3	$8x10^{5}$	$5x10^{5}$	
	18/10/2010				$5,5x10^5$	
	19/10/2010				$1x10^{5}$	
	21/10/2010				$2x10^{2}$	
	13/10/2010	•		$3x10^{5}$	8x10 ⁵	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$1x10^{6}$	
29	15/10/2010	TEST30NoS	3	$1x10^{5}$	$5x10^{5}$	
	16/10/2010				$2,8x10^5$	
	18/10/2010				$1x10^{2}$	
	14/10/2010	•		$4x10^{5}$	$6x10^{5}$	$2x10^{5}$
	15/10/2010			$6x10^{5}$	$1,3x10^6$	$1x10^{5}$
30	16/10/2010	CRIO30NoS	3	$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	
	17/10/2010				$3x10^{4}$	
	20/10/2010				$1x10^{2}$	
	13/10/2010			1x10 ⁵	2x10 ⁵	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$2x10^{5}$	
31	15/10/2010	MPF30NoS	3		$1x10^{5}$	
	16/10/2010			$3x10^{5}$	$1,5x10^6$	
	18/10/2010				$1x10^{6}$	
	19/10/2010				$1x10^{5}$	

Tabella n. 3.45 Valori delle popolazioni delle specie di lievito Non Saccharomyces rilevate, in ciascuna test, nei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica3) –LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca N.	Data	Tesi	Replica	Klockera apiculata UFC/mL	Candida zemplinina UFC/mL	Candida sorbosa UFC/mL
	13/10/2010		-	$3x10^{4}$	1,9x10 ⁵	$1x10^{4}$
	14/10/2010				$7x10^{5}$	
	15/10/2010				$8x10^{5}$	
32	16/10/2010	TEST20NoS	3		$1,3x10^6$	
	18/10/2010				$4x10^{5}$	
	19/10/2010				$4x10^{5}$	
	21/10/2010				$1,5x10^5$	
	14/10/2010			$5x10^{5}$	$1,6x10^6$	$1x10^{5}$
	15/10/2010			$6x10^{5}$	$1x10^{6}$	
33	16/10/2010	CRIO30NoS	3	$4x10^{5}$	$1x10^{6}$	$2x10^{5}$
	17/10/2010			$2x10^{5}$	1×10^{6}	
	20/10/2010				$4x10^{5}$	
	22/10/2010				8x10 ⁴	
	14/10/2010			$1x10^{5}$	$4x10^{5}$	$1x10^{5}$
	15/10/2010			$1x10^{5}$	$5x10^{5}$	
34	16/10/2010	MPF20S	3	$1x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	18/10/2010			$6x10^{5}$	$1,5x10^6$	
	19/10/2010			$1x10^{5}$	$5x10^{5}$	
	21/10/2010				4x10 ⁵	
	13/10/2010			$3x10^{5}$	$8x10^{5}$	$1x10^{5}$
	14/10/2010			$4x10^{5}$	$7x10^{5}$	
35	15/10/2010	TEST30S	3	$5x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	16/10/2010				$4x10^{5}$	
	18/10/2010				$8x10^{2}$	
	19/10/2010				$4x10^{3}$	
	14/10/2010			$3x10^{5}$	$4x10^{5}$	$1x10^{5}$
	15/10/2010				$9x10^{5}$	
36	16/10/2010	CRIO20S	3		$1,1x10^6$	
	17/10/2010				$8x10^{5}$	
	20/10/2010				$3x10^{5}$	
	22/10/2010				$4x10^4$	
	13/10/2010			8x10 ⁴	$3,2x10^5$	
	14/10/2010			$2x10^{5}$	$6x10^{5}$	$1x10^{5}$
	15/10/2010			$2x10^{5}$	$1x10^{5}$	
37	16/10/2010	MPF20NoS	3	$7x10^{5}$	$6x10^{5}$	
	18/10/2010			$3x10^{5}$	$1x10^{6}$	
	19/10/2010			$4x10^{5}$	$6x10^{5}$	
	21/10/2010				$6,8x10^5$	

3.7.9 Composizione chimica dei mosti e dei vini alla svinatura

Tabella n. 3.46 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) in corrispondenza dei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica1).

Vasca N.	Tesi	Giorni di Fermentazione	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)	Acido Lattico (g/L)
		1	108	114	0,05		0	0
		2	102	109	0,24	1,09	0,06	0
1	MPF30S	4	89	109	2,12	3,61	0,21	0,06
		5	45	75	5,79	6,31	0,22	0,1
		7	5	21	11,68	8,52	0,32	0,16
		1	105	111	0,4		0,12	0
2	TEST20NoS	2	99	108	1,69	2,75	0,14	0
		4	40	68	6,87	6,86	0,15	0,13
		7	3	15	12,1	8,41	0,18	0,24
		1	106	113	0,05		0,07	0
3	MPF20NoS	2	102	109	0,14	0,93	0,07	0
		5	73	93	2,69	3,93	0,06	0,06
		7	26	52	8.6	6,39	0,13	0,07
		1	108	115	0,05		0	0
		2	99	110	1,12	2,17	0,11	0
4	CRIO20NoS	4	23	51	8,26	7,06	0,2	0,14
		5	15	18	11,3	7,51	0,15	0,24
		1	107	113	0,05		0,06	0
		2	105	110	0,11	0,94	0,07	0
5	MPF30NoS	4	99	109	0,85	2,09	0,12	0,04
		5	58	84	4,16	5,25	0,14	0,05
		7	7	25	11,23	6.99	0.16	0,16
		1	108	114	0,05		0	0
		2	86	99	2,33	2	0,05	0
6	CRIO20S	4	25	50	8,41	7,11	0,17	0,13
		5	13	35	11,16	8,92	0,07	0,19
		1	104	109	0,5		0	0
		2	75	88	2,35	3,1	0,12	0
20	TEST20S	4	29	55	7,72	6,97	0,12	0,11
		5	13	34	9,92	7,72	0,17	0,18
		7	1	8	12,13	8,42	0.18	0,24
		1	108	114	0,05	-	0	0
21	CRIO30NoS	2	68	86	2,33	3,84	0,1	0,04
		5	0	3	12,83	8,63	0,28	0,19
		1	106	113	0,03		0,09	0
		2	62	80	2,8	4,54	0,11	0
22	TEST30S	4	9	29	10,27	7,96	0,22	0,15
		5	1	9	12,2	8,64	0,28	0,19
		7	0	2.5	12,67	8,57	0,28	0,18
		1	105	112	0,05		0	0
23	CRIO30S	2	55	65	6,1	5,51	0,15	0,08
		4	2	13	11,46	7,86	0,25	0,11
		. 5	0	3	12,53	8,41	0,27	0,17
		1	103	109	0,5		0,11	0
		2	72	90	2,8	4,26	0,08	0,06
24	TEST30NoS	4	12	33	10,2	7,9	0,23	0,13
		5	2	12	11,78	8,35	0,27	0,19
		7	0	2.6	12,3	9	0,3	0,2
		1	109	116	0,05		0,05	0
25	MPF20S	3	88	104	1,68	3,03	0,12	0,05
		4	61	88	4,42	5,44	0,12	0,1
		6	21	47	8,63	7,34	0,18	0,13

Tabella n. 3.47 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) in corrispondenza dei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica2).

Vasca N.	Tesi	Giorni di fermentazione	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)	Acido Lattic (g/L)
		1	107	111	0,05		0,06	(g/L)
7	CRIO20S	2	68	92	3,38	4,58	0,13	0,07
	01410200	5	17	42	9,55	7,39	0,19	0,25
		7	3	15	12,39	6,96	0,24	0,15
		1	107	111	0.05	0,70	0	0
		2	99	108	0,5	0,7	0,05	0
8	TEST20NoS	5	31	60	7,42	7,1	0,12	0,13
	1201201100	8	3	16	12,31	7,88	0,19	0,21
		1	107	111	0.05	7,00	0.05	0,21
9	MPF20S	4	82	102	2.11	3.46	0.03	0.04
	WIFF 205							
		5	57	85	4.57	5.29	0.16	0.04
		8	11	34	10.86	7.81	0.17	0.1
		1	108	112	0,05		0,1	0
10	CRIO30S	2	44	72	5,78	6,09	0,15	0,06
		4	4	18	11,39	8,34	0,24	0,19
		. 5	0	5	12,51	8,35	0,29	0,18
		1	99	103	0,65		0,15	0
11	TEST30S	2	96	101	1,42	1,65	0,1	0
		3	67	85	3,3	3,93	0,1	0,03
		6	2	14	11,71	8,51	0,29	0,14
		1	105	109	0,05		0,05	
		2	67	91	3,42	4,63	0,08	0,04
12	CRIO20NoS	4	2	12	12,28	8,09	0,22	0,21
		7	0	5	12,77	8,84	0,3	0,18
		1	109	113	0,08		0,04	0
		2	105,5	109,5	0,05	0,73	0,08	0
13	MPF30NoS	5	59,5	86	4,13	5,14	0,14	0,06
		8	1	9	11,85	7,86	0,28	0,22
		1	102	106	0,5		0	0
14	TEST20S	2	101	106	0,24	1	0,09	0
		5	22	50	9,15	7,75	0,2	0,17
		8	1	7	11,91	7,87	0,21	0,2
		1	86	89	2,05		0,13	0
		2	65	85	4,06	2,78	0,1	0,05
15	CRIO30NoS	3	51	78	4,87	5,55	0,18	0,09
		4	6	22	10,76	7,63	0,27	0,17
		5	0	8	12,43	8,39	0,3	0,19
		1	105,5	109,5	0,05		0	0
		2	101	105	0,74	1,05	0,07	0
16	MPF30S	4	73	95	2,67	4,31	0,1	0,06
		5	40	70	6,63	6,91	0,17	0,07
		8	0	3	12,47	8,36	0,21	0,2
		1	104	108	0,4		0	0
		2	99	103	0,16	0,72	0,08	0
17	TEST30NoS	3	74	91	2,7	3,25	0,09	0,06
		5	6	24	11,26	8,03	0,24	0,14
		1	107,5	111,5	0,05		0	0
		5	75	98	2,85	3,86	0,1	0,05
	MPF20NoS	7	29	60	7,61	6,56	0,18	0,05
	2 201 100	8	15	45	8,92	6,81	0,15	0,03

Tabella n. 3.48 Analisi chimiche (laboratorio DIBA) in corrispondenza dei campionamenti effettuati durante la fermentazione (replica3).

Vasca N.	Tesi	Giorni di Fermentazione	Glucosio (g/L)	Fruttosio (g/L)	Etanolo (% v/v)	Glicerina (g/L)	Acido Acetico (g/L)	Acido Lattico (g/L)
		1	107	116	0,05		0,09	0
		2	102	107	0,15	1,2	0,1	0
26	TEST20S	4	65	90	4,21	5,67	0,11	0,04
		7	8	26	11,02	8,32	0,19	0,2
		1	109,5	118,5	0,05		0	0
		2	91	107	1,71	3,33	0,06	0
27	CRIO30NoS	3	53	81	5,32	6,1	0,19	0,06
		5	8	27	11,59	8,68	0,34	0,17
		1	107,5	116,5	0,05		0	0
		3	104	111	0,41	1,61	0,08	0
28	MPF30S	4	87	104	1,77	3,47	0,05	0,06
		7	4	20	11,57	8,48	0,26	0,13
		1	107	116	0,2	1,41	0,09	0
		2	106,5	115,5	0,3		0,09	0
29	TEST30NoS	3	82	104	2,68	4,62	0,14	0,07
		4	39	67	6,66	6,87	0,15	0,08
		5	15	39	9,4	8,30	0,21	0,11
		1	108	117	0,05		0	0
••	an a saa	2	100	112	1,08	2,61	0,08	0
30	CRO30S	3	57	86	5,17	6,37	0,2	0,09
		4	21	48	9,04	8,21	0,14	0,31
		5	4	20	12,08	9,12	0,29	0,17
	A FREDONI G	1	113	118	0,05	0.00	0	0
31	MPF30NoS	2	109	117	0,05	0,99	0	0
		3	108	116	0,8	1,11	0,04	0
		. <u>7</u>	8	29	11,06	8,35	0,26	0,22
		2	108,5 96	117,5 102	0,05 1,32	1,04	0,07 0,08	0
32	TEST20NoS	3	96 66	91	3,8	5,29	0,08	0.05
32	1E3120N03	6	11	31	10,58	8,1	0,09	0,03
		1	108	117	0,05	0,1	0,10	0,12
		2	105	117	0,03	1,72	0,08	0
33	CRIO20NoS	5	25	51	8,59	7,5	0,16	0,17
33	CKIO201405	8	2	10	12,33	8,21	0,10	0,17
		1	109,5	118,5	0,05	0,21	0,2	0,17
		2	109,5	116,5	0,03	1,16	0	0
34	MPF20S	4	89	102	1,27	2,73	0,16	0.05
٥.		7	23	51	8,79	7,6	0,15	0,07
		1	108	117	0,05	.,.	0,08	0
		2	107	114	0,22	1,43	0,09	0
35	TEST30S	3	42	69	6,55	6,98	0,14	0,08
		4	17	41	9,85	8,22	0,24	0,11
		1	110	119	0,05	· · ·	0	0
36	CRIO20S	2	104	114	0,63	1,93	0,07	0
		5	21	47	9,2	7,67	0,2	0,14
		8	1	6	12,19	7,98	0,17	0,19
	*	1	109	118	0,05	1,01	0	0
37	MPF20NoS	4	102	114	0,41	1,81	0,06	0
		7	33	64	7,47	7,14	0,16	0,09

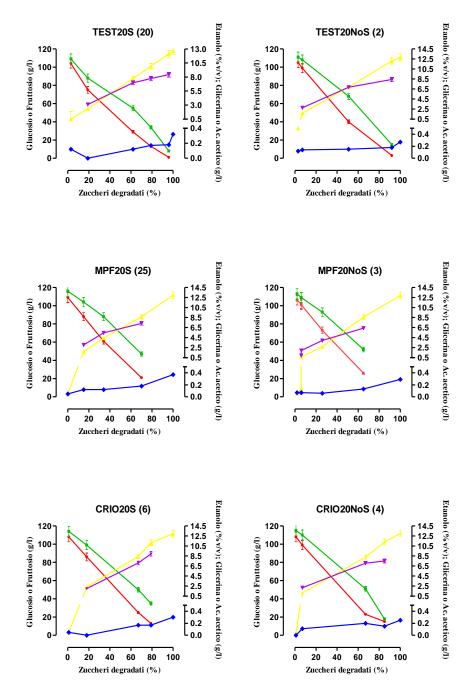


Figura 3.69 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 20°C, replica1.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

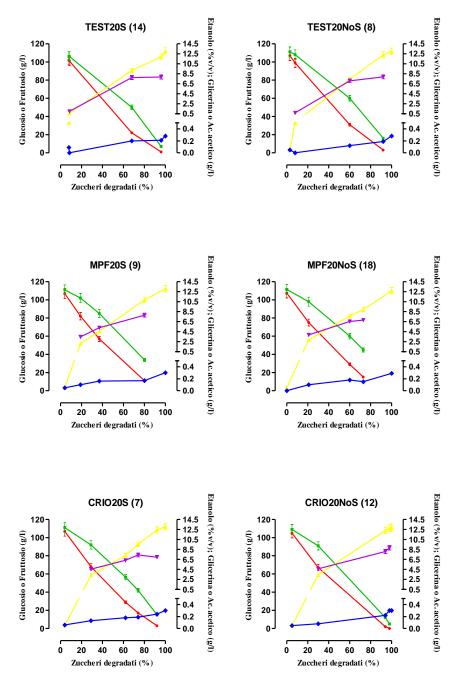


Figura 3.70 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 20°C, replica2.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

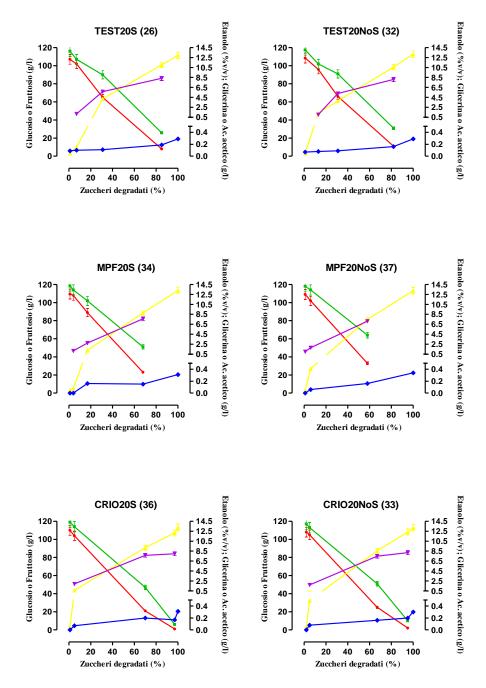


Figura 3.71 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 20°C, replica3.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

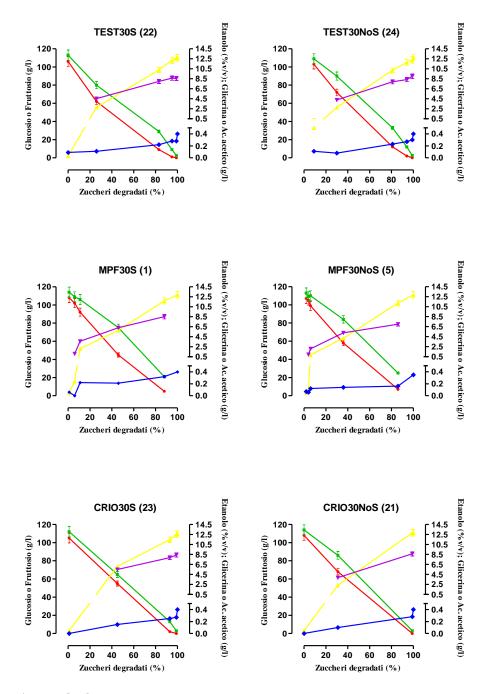


Figura 3.72 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 30°C, replica1.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

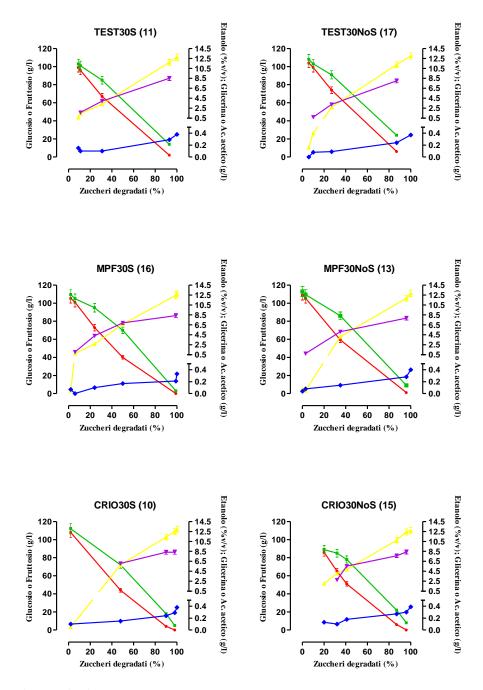


Figura 3.73 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 30°C, replica2.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

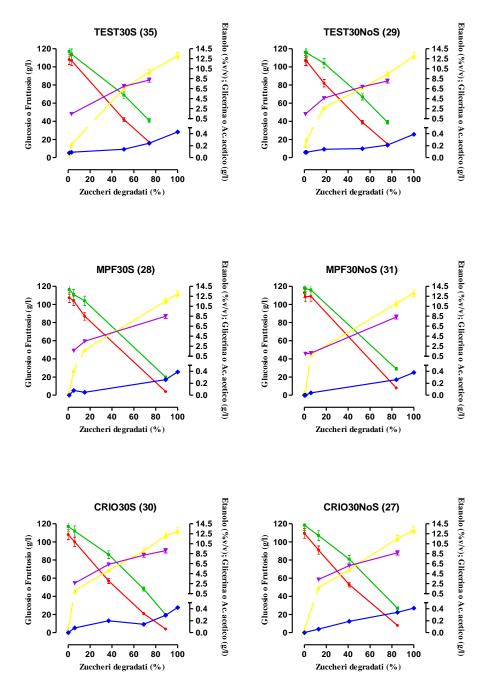


Figura 3.74 Andamento dei principali composti chimici delle tesi fermentate a 30°C, replica3.(--- glucosio;--- fruttosio; --- etanolo; --- glicerina; --- Ac. Acetico)

Tabella n. 3.49 Analisi chimiche (laboratorio ISVEA) dopo svinatura – LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Vasca	Tesi	Replica	Data	Etanolo	Zuccheri	pН	Acidità Volatile	Solforosa	Acido Malico
N.	1631	керпса	Data	(% v/v)	(g/L)	pm	(g/L)	(mg/L)	(g/L)
4		1	25/10/10	13,00	1,0	3,53	0,25	59	2,82
2	CRIO20NoS	2	26/10/10	12,95	1,0	3,50	0,30	54	2,64
33		3	29/10/10	13,20	1,0	3,51	0,30	33	2,57
					-,-	-,	,		
6		1	25/10/10	12,95	1,0	3,55	0,30	45	2,81
7	CRIO20S	2	26/10/10	13,05	1,0	3,51	0,30	53	2,63
36		3	08/11/10	13,30	1,0	3,54	0,31	46	2,50
				,	,-	-,- :	-,		
21		1	25/10/10	12,85	1.0	3,59	0,40	49	2,60
15	CRIO30NoS	2	26/10/10	12,70	1,0	3,60	0,39	39	2,68
27	01110001100	3	08/11/10	13,20	1,0	3,55	0,41	44	2,43
	1			13,20		3,33	0,11		2,13
23		1	25/10/10	12,60	1,0	3,62	0,40	40	2,65
10	CRIO30S	2	26/10/10	12,90	1,0	3,60	0,38	36	2,55
30	C1110000	3	08/11/10	13,05	1,0	3,59	0,42	45	2,47
				13,03	. 1,0	3,37	0,42		
3		1	27/10/10	12,90	1.0	3,61	0,29	60	2,69
18	MPF20NoS	2	08/11/10	13,15	1,0	3,52	0,29	61	2,53
37	1411 1 201103	3	29/10/10	13,15	1,0	3,52	0,23	61	2,24
			2)/10/10	13,23	1,0	3,32	0,54	. 01	
25		1	27/10/10	13,05	1.0	3,53	0,37	51	2,47
9	MPF20S	2	08/11/10	13,10	1,0	3,54	0,37	60	2,59
34	WIF F 203	3	29/10/10	13,10	1,0	3,54	0,30	57	2,39
34			27/10/10	13,30	1,0	3,34	0,31		2,31
5		1	27/10/10	12,90	1,0	3,55	0,35	47	2,58
13	MPF30NoS	2	08/11/10	12,85	1,0	3,54	0,33	51	2,48
31	WII F SUNUS	3	29/10/10	13,15	1,0	3,59	0,38	62	2,35
- 31			27/10/10	13,13	1,0	3,39	0,36	02	2,33
1		1	27/10/10	12,90	1,0	3,42	0,40	46	2,37
16	MPF30S	2	08/11/10	12,70	1,0	3,58	0,33	49	2,54
28	WII 1303	3	29/10/10	13,00	1,0	3,61	0,39	54	2,19
40			- 27/10/10	15,00	1,0	5,01	0,33		۷,17
2		1	25/10/10	12,85	1,0	3,55	0,27	63	2,76
8	TEST20NoS	2	26/10/10	13,00	1,0	3,55	0,27	64	2,63
32	11231201103	3	08/11/10	13,20	1,0	3,51	0,29	56	2,54
32				13,20	1,0	3,31	0,27	- 30	2,57
20		1	25/10/10	12,70	1,0	3,57	0,32	56	2,78
14	TEST20S	2	26/10/10	13,05	1,0	3,55	0,32	60	2,78
26	11201200	3	08/11/10	12,95	1,0	3,51	0,28	54	2,55
20			30/11/10	12,73	,0	3,31	0,27		- 4,33
24		1	25/10/10	12,75	1,0	3,61	0,41	45	2,42
17	TEST30NoS	2	26/10/10	13,00	1,0	3,61	0,41	50	2,42
29	1201301105	3	08/11/10	13,05	1,0	3,55	0,37	53	2,32
49	-		00/11/10	13,03	1,0	3,33	0,37		۷,+1
22		1	25/10/10	12,70	1.0	3,63	0,40	47	2,66
11	TEST30S	2	26/10/10	12,70	1,0	3,63	0,40	41	2,63
35	11201300	3	08/11/10	13,10	1,0	3,55	0,38	43	2,38
L 33	-	<u></u>	00/11/10	13,10	1,0	3,33	0,43		2,30

3.7.10 Popolazione dei lieviti e dei batteri lattici al momento dell'inoculo della fermentazione malolattica

Tabella n. 3.49 Valori delle popolazioni di Saccharomyces cerevisiae, prima e dei batteri lattici, prima e dopo, l'inoculo della fermentazione malolattica – LINEA B.4 (vendemmia 2010)

VASCA	TESI	REPLICA	S. cerevisiae		
N.			(UFC/mL)	(UFC	(/mL)
20			$1x10^{5}$	2.5×10^6	5 6 106
20		1			
14	TEST20S	2	$2x10^4$	4.8×10^5	7(U) ri Lattici C(mL) 5,6x10 ⁶ 5,2x10 ⁶ 4,3x10 ⁶ 4,4x10 ⁶ 7,9x10 ⁵ 2x10 ⁶ 4,1x10 ⁶ 4,3x10 ⁶ 4,5x10 ⁶ 4,4x10 ⁶ 3,9x10 ⁶ 6,7x10 ⁶ 2,8x10 ⁶ 3,7x10 ⁶ 1,7x10 ⁶ 2,4x10 ⁶ 3,1x10 ⁶ 5,6x10 ⁶ 4x10 ⁶ 4,2x10 ⁶ 5,8x10 ⁶ 4x10 ⁶ 4,2x10 ⁶ 5,1x10 ⁶ 5
26		3	1,6x10 ⁵	1,6x10 ⁶	4,3x10°
			1 5 106	2 1 106	4.4.106
2		1	$1,5 \times 10^6$	$2,1x10^6$	
8	TEST20NoS	2	$1,3x10^5$	$2x10^{5}$	
32	-	3	1,6x10 ⁵	1x10 ⁶	2x10°
22		1	$8.3x10^3$	2.9×10^6	4.1 106
	TECTAGE			,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	,
11	TEST30S	2	$4,2x10^4$	3.4×10^6	
35		3	1.9x10 ⁴	2,2x10 ⁶	4,5x10°
24		1	1.5×10^4	$3,9x10^6$	4.4×10^{6}
17	TEST30NoS	2	$2x10^4$	$3,5x10^6$	
29	1231301403	3	$4,6x10^4$	$2,6x10^6$	
29			4,0110	2,0110	0,7110
25		1	4.6×10^{5}	1.6×10^6	2.8×10^6
9	MPF20S	2	$5x10^{5}$	$3,5 \times 10^6$	3.7×10^6
34		3	$3,3x10^5$	1.1×10^6	1.7×10^6
					-,,,,,,,
3		1	3.8×10^4	4.4×10^6	$2,4x10^6$
18	MPF20NoS	2	3.3×10^{5}	$3x10^{6}$	$3.1x10^6$
37		3	1.8×10^6	$2,1x10^6$	$5,6x10^6$
				-	
1		1	$1,5x10^4$	$8,5 \times 10^{5}$	$4x10^{6}$
16	MPF30S	2	$5,3x10^4$	$2,5 \times 10^6$	
28		3	8,7x10 ⁴	$2,9x10^6$	$5,8x10^6$
			4		
5		1	2.8×10^4	$3,4x10^6$	
13	MPF30NoS	2	$5,2x10^4$	$3x10^{6}$	$5,1x10^{\circ}$
31		3	2,1x10 ⁴	$2,3x10^6$	5x10 ⁶
		1	$3x10^{5}$	2.2×10^6	4 0 - 106
6 7	CRIO20S	2	4.1×10^{5}	2,2x10 $2,4x10^6$	
36	CNIUZUS	3	$1,6x10^5$	1.6×10^6	2.0x10
30			1,0710	1,0110	2,7710
4		1	$2,5x10^5$	$2,2x10^6$	2,9x10
12	CRIO20NoS	2	$9,2x10^4$	$4,3x10^5$	
33		3	$1x10^{6}$	$4,6x10^6$	
	•		_		
23		1	$5,5 \times 10^3$	$3,2x10^6$	
10	CRIO30S	2	$8,5x10^4$	$2,6x10^6$	
30		3	8,9x10 ⁴	$2,8x10^6$	5,8x10 ⁶
			4	6	6
21		1	$4,4x10^4$	$2,4x10^6$	$4,4x10^{6}$
	CRIO30NoS	2	$5,3x10^4$	$2,5 \times 10^6$	3.8×10^{6}
15 27	Citiosolitos	3	$1,5 \times 10^{5}$	4.7×10^6	

3.7.11 Analisi Statistica dei dati relativi alle tesi condotte a 20°C

Parametri microbiologici considerati per l'analisi della varianza

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* a densità del mosto di 1050 (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces a densità del mosto di 1050 *(*non-SACC2)
- e. Popolazione di *S. cerevisiae* a densità del mosto di 1020 (SACC3)
- f. Popolazione dei non-Saccharomyces a densità del mosto di 1020 (non-SACC3)
- g. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- h. Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento
- i. Popolazione massima di *S. cerevisiae* (MAX SACC)
- l. Popolazione massima dei lieviti non-Saccharomyces (MAX non-SACC)

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi statistica delle dei soli parametri per i quali almeno una variabile è risultata statisticamente significativa.

a. <u>Popolazione di S.cerevisiae 18h dopo l'inoculo</u>

Analysis of Variance							
Source	Type III SS c	df Mea	n Squares	F-ratio	p-value		
TRATT\$	2.141E+014	2 1.0	70E+014	8.012	0.008		
SALASSO\$	1.089E+009	1 1.0	89E+009	0.000	0.993		
REPLICA	1.180E+014	2 5.9	01E+013	4.416	0.042		
SALASSO\$*TRATT\$	2.000E+012	2 9.9	98E+011	0.075	0.928		
Error	1.336E+0141	0 1.3	36E+013				

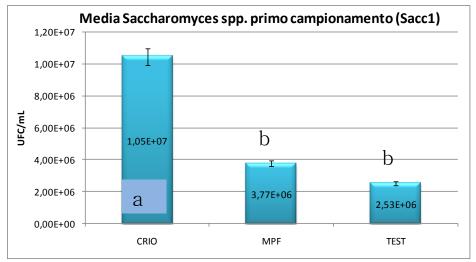


Figura n. 3.75 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Saccharomyces cerevisiae 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo presenta differenze significative per le tesi CRIO che mostrano una popolazione maggiore rispetto alle tesi MPF e TEST

c. Popolazione di *S.cerevisiae* a densità del mosto di 1050

Analysis of Variance							
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value		
TRATT\$	7.082E+014	2	3.541E+014	5.516	0.024		
SALASSO\$	2.134E+013	1	2.134E+013	0.332	0.577		
REPLICA	9.045E+014	2	4.522E+014	7.044	0.012		
SALASSO\$*TRATT\$	1.504E+014	2	7.518E+013	1.171	0.349		
Error	6.420E+014	10	6.420E+013				

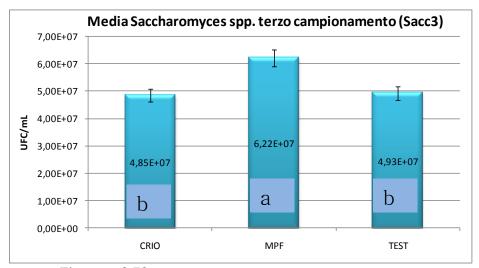


Figura n. 3.76 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Saccharomyces al terzo campionamento - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* al terzo campionamento presenta differenze significative nelle tesi MPF rispetto alle altre due tesi

h. <u>Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento</u>

Analysis of Variance								
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value			
TRATT\$	36.211	2	18.105	18.962	0.000			
SALASSO\$	1.573	1	1.573	1.647	0.228			
REPLICA	10.167	2	5.084	5.324	0.027			
SALASSO\$*TRATT\$	4.645	2	2.322	2.432	0.138			
Error	9.548	10	0.955					

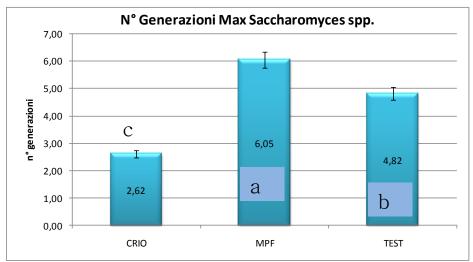


Figura n. 3.77 Effetto del trattamento dul numero massimo di generazioni compiuto da S. cerevisiae - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* compie un numero massimo di generazioni significativamente diverso nelle tesi MPF rispetto alle tesi CRIO e TEST

i. Popolazione massima di S. cerevisiae

Analysis of Variance								
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value			
TRATT\$	1.288E+015	2	6.442E+014	8.859	0.006			
SALASSO\$	3.441E+014	1	3.441E+014	4.732	0.055			
REPLICA	2.728E+014	2	1.364E+014	1.876	0.203			
SALASSO\$*TRATT\$	1.226E+014	2	6.131E+013	0.843	0.459			
Error	7.272E+014	10	7.272E+013					

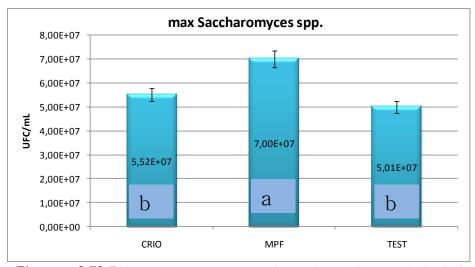


Figura n. 3.78 Effetto del trattamento sul massimo della popolazioni di Saccharomyces cerevisiae - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* presenta valori massimi significativamente diversi per le tesi MPF rispetto alle altre due tesi.

1. Popolazione massima dei lieviti Non-Saccharomyces

Analysis of Variance								
			Mean Squares					
TRATT\$	1.816E+012	2	9.078E+011	4.517	0.040			
SALASSO\$	2.358E+011	1	2.358E+011	1.173	0.304			
REPLICA	2.853E+012	2	1.426E+012	7.097	0.012			
SALASSO\$*TRATT\$	6.884E+010	2	3.442E+010	0.171	0.845			
Error	2.010E+012	10	2.010E+011					

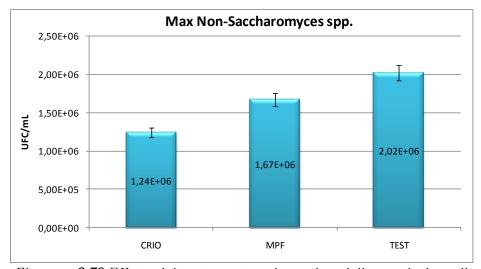


Figura n. 3.79 Effetto del trattamento sul massimo della popolazione di Non-Saccharomyces - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di Non-Saccharomyces presenta valori massimi significativamente diversi per le tesi TEST rispetto alle altre due tesi.

3.7.12 Analisi Statistica dei dati relativi alle tesi condotte a 30°C

Parametri microbiologici considerati per l'analisi statistica

- a. Popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo (SACC1)
- b. Popolazione dei non-Saccharomyces 18h dopo l'inoculo (non-SACC1)
- c. Popolazione di *S. cerevisiae* a densità del mosto di 1050 (SACC2)
- d. Popolazione dei non-Saccharomyces a densità del mosto di 1050 (non-SACC2)
- e. Popolazione di *S. cerevisiae* a densità del mosto di 1020 (SACC3)
- f. Popolazione dei non-Saccharomyces a densità del mosto di 1020 (non-SACC3)
- g. Rendimento di crescita delle popolazioni di S. cerevisiae
- h. Numero di generazioni di *S. cerevisiae* tra primo e secondo campionamento
- i. Popolazione massima di S. cerevisiae (MAX SACC)
- l. Popolazione massima dei lieviti non-Saccharomyces (MAX non-SACC)

a. Popolazione di S. cerevisiae 18h dopo l'inoculo

Analysis of Variance								
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value			
TRATT\$	4.629E+015	2	2.314E+015	16.387	0.001			
			3.556E+012					
REPLICA	2.668E+014	2	1.334E+014	0.945	0.421			
SALASSO\$*TRATT\$	9.449E+013	2	4.724E+013	0.335	0.723			
Error	1.412E+015	10	1.412E+014					

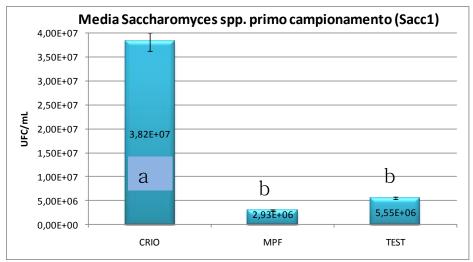


Figura n. 3.80 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Saccharomyces cerevisiae 18h dopo l'inoculo - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* 18h dopo l'inoculo presenta differenze significative per le tesi CRIO che mostrano una popolazione maggiore rispetto alle tesi MPF e TEST

e. Popolazione di *S.cerevisiae* a densità del mosto di 1020

Analysis of Variance							
			Mean Squares				
TRATT\$	2.731E+015	2	1.366E+015	32.508	0.000		
SALASSO\$	2.254E+014	1	2.254E+014	5.367	0.043		
REPLICA	1.486E+015	2	7.431E+014	17.691	0.001		
SALASSO\$*TRATT\$	1.982E+014	2	9.911E+013	2.359	0.145		
Error	4.201E+014	10	4.201E+013				

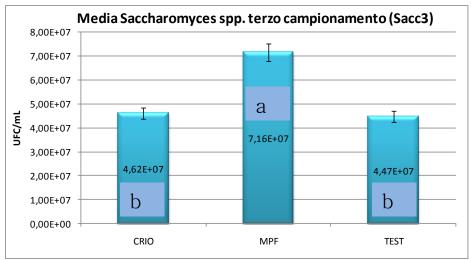


Figura n. 3.81 Effetto del trattamento sulle popolazioni di Saccharomyces al terzo campionamento - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* al terzo campionamento presenta differenze significative nelle tesi MPF rispetto alle altre due tesi

h. <u>Numero di generazioni di S. cerevisiae tra primo e</u> secondo campionamento

Analysis of Variance								
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value			
TRATT\$	68.832	2	34.416	14.912	0.001			
SALASSO\$	3.058	1	3.058	1.325	0.276			
REPLICA	4.086	2	2.043	0.885	0.443			
SALASSO\$*TRATT\$	7.866	2	3.933	1.704	0.231			
Error	23.079	10	2.308					

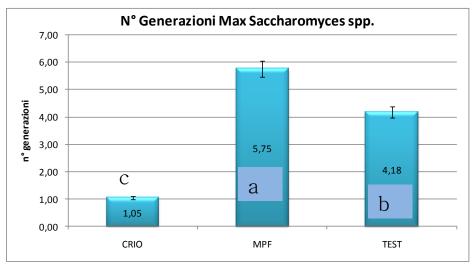


Figura n. 3.82 Effetto del trattamento sul numero massimo di generazioni compiuto da S. cerevisiae - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

La popolazione di *S. cerevisiae* compie un numero massimo di generazioni significativamente diverso nelle tesi MPF rispetto alle tesi CRIO e TEST

Successivamente all'analisi della varianza condotta considerando separatamente le fermentazioni condotte a 20° e 30°C, con la finalità di valutare in modo globale l'effetto dei trattamenti sulla composizione microbiologica delle popolazioni e sul loro comportamento metabolico, sono state effettuate sia l'Analisi delle Componenti principali sia l'Analisi Discriminante. Pertanto, in un primo momento, alcuni parametri correlati alle popolazioni microbiche (numero massimo delle popolazioni di S. cerevisiae (MAX SACC) e Non-*Saccharomyces (MAX NON SACC)*, numero di generazioni massimo compiuto da Saccharomyces cerevisiae(n° GEN), purezza fermentativa e rendimento di crescita di Saccharomyces cerevisiae) sono stati elaborati con l'Analisi delle Componenti Principali (figure 3.83-3.85). Analizzando la PCA relativa alle tesi condotte a 20°C si nota che, già le prime due componenti principali consentono di spiegare il 77% della varianza. Considerando la prima componente le tesi CRIO (salasso e non salasso), si distribuiscono nei riquadri di destra in quanto caratterizzate, dal punto di vista microbiologico, specialmente da un minor numero di generazioni massimo compiuto da S. cerevisiae, ed anche da livelli inferiori di popolazioni massime di Saccharomyces cerevisiae e Non-Saccharomyces e da una minore purezza fermentativa, principalmente rispetto alle tesi MPF che al contrario, rispetto alla prima componente si distribuiscono tutte nei riquadri di destra, ad eccezione di una. Le tesi controllo (TEST), al contrario non si distribuiscono in maniera uniforme all'interno dei riquadri, ad indicare che le diversità riscontrate in tali vinificazioni sono dovute alla tesi. Invece, prendendo considerazione la seconda componente non è possibile determinare alcun influenza del trattamento relativamente ai parametri considerati.

Osservando la disposizione delle tesi relative al medesimo trattamento ed alla medesima replica e che si differenziano solo per la variabile salasso e non salasso, si nota come

nella maggior parte dei casi esse si dispongano vicine ipotizzando il non effetto da parte di tale pratica.

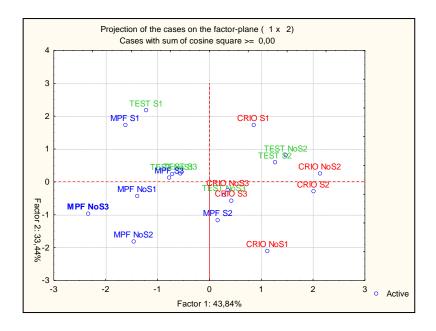


Figura n. 3.83 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali delle tesi condotte a 20°C (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

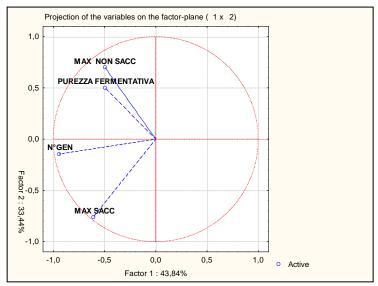


Figura n. 3.84 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi – LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Analizzando la PCA relativa alle tesi condotte a 30°C, le prime due componenti principali consentono di spiegare il 68% circa della varianza. Osservando la disposizione delle tesi rispetto alle prime due componenti principali non è possibile effettuare una discriminazione in funzione dei trattamenti. L'unica annotazione possibile riguarda la purezza fermentativa, relativamente alla quale le tesi CRIO si differenziano rispetto alle altre tesi in quanto caratterizzate da livelli superiori di tale parametro.

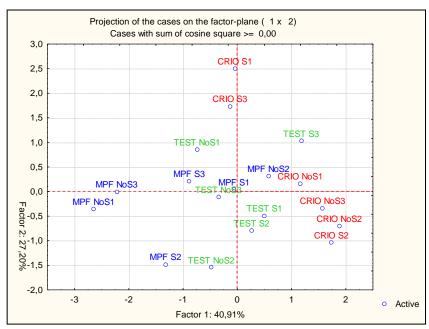


Figura n. 3.85 Risultato dell'Analisi delle Componenti Principali delle tesi condotte a 30°C (1,2, e 3 = repliche) - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

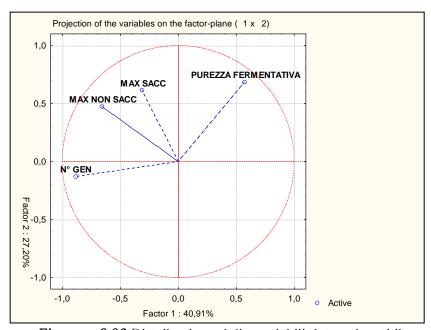


Figura n. 3.86 Distribuzione delle variabili determinanti il posizionamento delle diverse tesi - LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Successivamente, sempre allo scopo di evidenziare una differenziazione statisticamente significativa tra i tre gruppi di tesi considerate, è stata condotta l'Analisi Discriminante considerando le variabili più significative, ovvero le stesse utilizzate per l'Analisi delle Componenti Principali ad eccezione del rendimento di crescita.

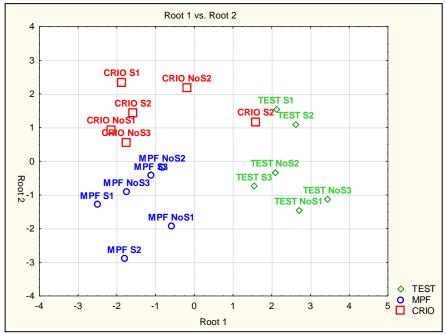


Figura n. 3.87 Risultato dell'Analisi Discriminante delle tesi condotte a 20°C

- LINEA B.4 (vendemmia 2010)

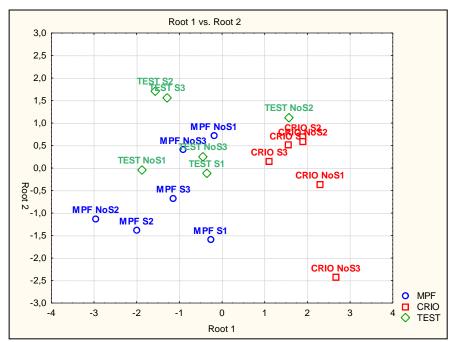


Figura n. 3.88 Risultato dell'Analisi Discriminante delle tesi condotte a $30^{\circ}\mathrm{C}$

- LINEA B.4 (vendemmia 2010)

Riferimenti bibliografici

- Cavazza A., Grando M.S. e Zini C., 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini, 9: 217-220
- Charpentier C. Colin A., Alais A, Legras J.L. 2009. French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. Antoine van Leeuwenhoek; 95: 263-73.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. & Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int. J. Food Microbiol. 99: 237-243.
- Fleet G.H., 1990. Growth of yeasts during wine fermentations. Journal of Wine Research, 1: 211-223.
- Lambrechts M.G., Pretorius I.S. 2000 Yeast and its importance to wine aroma. South Afric. J. Enol. Vitic. 21: 97-129.
- Fleet G.H. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res 8: 979-995.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D. & Vicenzini, M., 1998. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello de Montalcino wines. Food Technol. Biotechnol. 36: 313-318.
- Granchi L., Bosco M., Messini A. e Vincenzini M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol., 87: 949-956
- Granchi L., Carobbi M., Guerrini S., Vincenzini M. 2006 Rapid enumeration of yeasts during wine fermentation by the combined use of thoma chamber and epifluorescence microscopy. Atti del XXIX Congresso Mondiale della Vigna e del Vino, OIV 2006, Logroño, Spagna 25-30 Giugno, pp. 1-5.
- Howell K.S., Cozzolino D., Bartowsky E.J., Fleet G.H., Henschke P.A. 2006 Metabolic profiling as a tool for

- revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. FEMS Yeast Res 6: 91-101.
- Lefebvre D., Gabriel V., Vayssier Y., Fontagné-Faucher C. 2002. Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 35: Issue 5: 407-414
- Lema C., Garci-Jares C., Orriols I., Angulo L. 1996 Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. Am. J. Enol. Vitic. 47: 206-216.
- Martini, A, 1993 Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Wine Research, 4: 165-176.
- Mora J, Barbas JI & Mulet A. 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am J Enol Viticult 41: 156-159.
- Pretorius, I.S, 2000 Tailoring wine yeast for the new millenium. Yeast, 16: 675-729.
- Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A & Masneuf-Pomarede I 2008 Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. Int J Food Microbiol 125: 197-203.