

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Utilizzo di lieviti *non-Saccharomyces* per modulare l'acidità del vino

Docente di riferimento:

Dott.ssa Chiara Nadai

Laureando: Leonardo Pianca

Matricola: 2066516

Anno Accademico 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. Introduzione.....	6
1.1 Contesto e obiettivi.....	6
1.2. L'acidità.....	6
1.3 Gli acidi presenti nell'uva e nel vino.....	8
1.3.1 Gli acidi presenti nell'uva.....	8
1.3.2 Gli acidi presenti nel vino.....	9
1.4 L'instabilità degli acidi nel vino.....	10
1.5 Modulazione dell'acidità nei vini.....	10
2. I lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	12
2.1 Modalità di inoculo dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	13
2.2 Caratteristiche generali dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i> proposti per la modulazione dell'acidità dei vini.....	14
2.2.1 <i>Lachancea thermotolerans</i>	14
2.2.2 Specie di <i>Schizosaccharomyces</i>	17
2.2.3 <i>Torulaspota delbrueckii</i>	19
2.2.4 Specie di <i>Hanseniaspora</i>	20
2.2.5 <i>Starmerella bacillaris</i>	22
2.2.6 <i>Candida stellata</i>	23
3. Microrganismi acidificanti.....	24
3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.2 <i>Lachancea thermotolerans</i>	26
3.3 <i>Starmerella bacillaris</i>	29
3.4 <i>Candida stellata</i>	31

4. Microrganismi disacidificanti	32
4.1 Batteri lattici.....	33
4.1.1 Effetto di lieviti non- <i>Saccharomyces</i> sullo sviluppo dei batteri lattici.....	33
4.2 <i>Schizosaccharomyces</i>	36
4.2.1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	36
4.2.2 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	37
5. Combinazione di microrganismi acidificanti e disacidificanti	39
4.3.1 Combinazione di <i>L. thermotolerans</i> e <i>S. pombe</i>	41
4.3.2 Combinazione di <i>L. thermotolerans</i> , <i>O. oeni</i> e <i>S. cerevisiae</i>	41
4.3.3 Combinazione di <i>L. thermotolerans</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>S. cerevisiae</i>	42
6. Conclusioni	43
Bibliografia	45

RIASSUNTO

La presente tesi ha approfondito l'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* da utilizzare per modulare l'acidità dei vini, in quanto la gestione dell'acidità è diventata complessa a causa dell'influenza che il cambiamento climatico globale ha su questo parametro

Generalmente l'acidità del vino viene controllata attraverso l'aggiunta di vari prodotti enologici come acido tartarico, malico o citrico, ma negli ultimi decenni i consumatori hanno iniziato a chiedere metodi di produzione del vino sempre più naturali e sostenibili, favorendo l'uso di microrganismi anche per la gestione dell'acidità. L'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* potrebbe soddisfare queste esigenze dei consumatori, in quanto questi microrganismi possono permettere di gestire l'acidità del vino in modo biologico (attraverso l'acidificazione o la disacidificazione microbica) per evitare l'aggiunta di prodotti enologici.

Tradizionalmente considerati microrganismi contaminanti responsabili del deterioramento del vino, i lieviti non-*Saccharomyces*, presenti sia sulla superficie delle uve che in cantina, sono stati recentemente rivalutati perché è stato dimostrato che molte specie possono contribuire alla fermentazione del vino e influire positivamente sulla qualità del vino, producendo metaboliti che possono contribuire alla complessità e al profilo aromatico del vino.

L'analisi dell'attuale bibliografia riguardo alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces*, come *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora*, *Starmerella bacillaris* e *Candida stellata*, ha evidenziato le potenzialità e le criticità del loro utilizzo nella modulazione dell'acidità dei vini.

L'opzione microbiologica principale per acidificare i vini che soffrono di mancanza di acidità è *L. thermotolerans*, che può aumentare l'acido lattico di diversi grammi per litro e ridurre il pH di alcune unità decimali. Altre opzioni includono alcuni ceppi di *S. cerevisiae* in grado di produrre piccole concentrazioni di acido malico, lattico o succinico. *S. bacillaris* può produrre acido α -chetoglutarico e acido piruvico, mentre *C. stellata* è in grado di produrre concentrazioni significative di acido succinico.

Generalmente per disacidificare il vino si sfrutta la fermentazione malolattica attuata dai batteri lattici, che possono metabolizzare l'acido malico in acido lattico. Negli ultimi anni, nuove opzioni basate su lieviti come *S. pombe*, che possono metabolizzare l'acido malico in etanolo, sono risultate affidabili in situazioni specifiche correlate a elevate concentrazioni potenziali di etanolo, alti pH e rischio di zuccheri residui.

ABSTRACT

This thesis has explored the use of non-*Saccharomyces* yeasts to modulate wine acidity, as managing acidity has become complex due to the influence of global climate change on this parameter. Generally, wine acidity is controlled through the addition of various oenological products like tartaric, malic, or citric acid. However, in recent decades, consumers have started demanding more natural and sustainable wine production methods, favoring the use of microorganisms even for acidity management. The use of non-*Saccharomyces* yeasts could meet these consumer demands, as these microorganisms can manage wine acidity biologically (through microbial acidification or deacidification), avoiding the need for oenological product additions.

Traditionally considered contaminant microorganisms responsible for wine spoilage, non-*Saccharomyces* yeasts, present both on the surface of grapes and in the winery, have been recently re-evaluated because it has been shown that many species can contribute to wine fermentation and positively influence wine quality by producing metabolites that can add to the complexity and aromatic profile of the wine.

The analysis of current literature on some non-*Saccharomyces* yeast species, such as *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora*, *Starmerella bacillaris*, and *Candida stellata*, has highlighted the potential and challenges of using them to modulate wine acidity.

The primary microbiological option for acidifying wines that lack acidity is *L. thermotolerans*, which can increase lactic acid by several grams per liter and reduce pH by a few decimal units. Other options include some strains of *S. cerevisiae* capable of producing small concentrations of malic, lactic, or succinic acid. *S. bacillaris* can produce α -ketoglutaric and pyruvic acid, while *C. stellata* is able to produce significant concentrations of succinic acid. Generally, wine is deacidified using malolactic fermentation carried out by lactic acid bacteria, which can metabolize malic acid into lactic acid. In recent years, new options based on yeasts like *S. pombe*, which can metabolize malic acid into ethanol, have proven reliable in specific situations related to high potential ethanol concentrations, high pH, and the risk of residual sugars.

1. Introduzione

1.1 Contesto e obiettivi

Negli ultimi anni la gestione dell'acidità del vino è diventata complessa a causa dell'influenza che il cambiamento climatico globale ha su questo parametro (Vicente et al., 2022). Alcune regioni viticole calde hanno abitualmente mostrato una bassa acidità, mentre altre regioni viticole, che erano considerate con climi modello, iniziano a soffrire per la ridotta acidità (Mendes Ferreira e Mendes-Faia, 2020).

I consumatori cercano oggi vini con minore grado alcolico e aromi più fruttati, ma anche con un buon equilibrio in termini di acidità e sensazione al palato (Vilela, 2019).

In questa analisi e raccolta di dati di varie sperimentazioni vengono valutate le proprietà di alcuni lieviti non-*Saccharomyces*, che, per le loro caratteristiche fisiologiche e genetiche, sono in grado di modulare l'acidità del vino, sia aumentando il contenuto di acidi nel vino (acidificazione biologica) sia diminuendolo (disacidificazione biologica).

1.2. L'acidità

La gestione dell'acidità nel vino è un aspetto cruciale della vinificazione, perché l'acidità influisce su molte caratteristiche del vino, in particolare il gusto, l'equilibrio, la freschezza e la stabilità microbiologica. Inoltre mosti d'uva con pH elevato possono causare problemi tecnici di difficile soluzione durante la fermentazione alcolica (Comuzzo e Battistutta, 2019). Alcune delle tecniche principali che possono essere utilizzate per gestire l'acidità nel vino sono:

- Pratiche colturali in vigna:
 - gestione della chioma: tecniche come il diradamento dei grappoli e la defogliazione possono influenzare la maturazione dell'uva e, di conseguenza, l'acidità.
 - irrigazione: la gestione dell'acqua può influire sul metabolismo dell'uva e sulla sua acidità.
- Selezione delle uve:
 - varietà delle uve: alcune varietà di uva hanno naturalmente un'acidità più alta (ad esempio, Riesling, Sauvignon Blanc).
 - raccolta: raccogliere le uve un po' prima della piena maturazione può aiutare a preservare una maggiore acidità

- Correzione dell'acidità:
- aggiunta di acidi: si possono aggiungere acido tartarico, malico o citrico per aumentare l'acidità.
- rimozione di acidi: tecniche come la disacidificazione chimica (con bicarbonato di potassio, carbonato di calcio, o doppio sale) possono essere utilizzate per ridurre l'acidità.
- trattamenti con resine a scambio ionico ed elettromembrane.
- Metodi di vinificazione:
- macerazione a freddo: questa tecnica può aiutare a preservare l'acidità, specialmente nei vini bianchi.
- controllo della temperatura di fermentazione: temperature di fermentazione più basse possono aiutare a mantenere una maggiore acidità.
- Invecchiamento:
- uso del legno: l'invecchiamento in botti di rovere può influenzare l'acidità, in quanto il legno può contribuire a una micro-ossigenazione che può ridurre l'acidità percepita.
- contenitori inerti: l'uso di contenitori in acciaio inossidabile o cemento non altera l'acidità come può fare il legno.
- Microossigenazione:
- gestione dell'ossigeno: l'esposizione controllata all'ossigeno può influenzare l'acidità e la percezione della stessa nel vino.
- Blend:
- assemblaggio di diversi vini: miscelare vini con diverse caratteristiche di acidità può essere una strategia efficace per ottenere il profilo acido desiderato
- Monitoraggio e analisi:
- test regolari: misurare regolarmente i livelli di acidità totale e il pH durante tutto il processo di vinificazione consente di prendere decisioni precise e tempestive.
- Fermentazione malolattica:
- disacidificazione biologica: mediante l'uso di specifici batteri è possibile ottenere la riduzione dell'acidità nel vino. Questa disacidificazione influisce solo sull'acido malico, e non riduce l'acido tartarico.
- Microrganismi acidificanti e disacidificanti:
- modulazione biologica dell'acidità del vino con lieviti non-*Saccharomyces*: alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces* sono in grado di diminuire o di aumentare l'acidità nel vino grazie a specifici metabolismi.

1.3 Gli acidi presenti nell'uva e nel vino

1.3.1 Gli acidi presenti nell'uva

Gli acidi organici sono, dopo gli zuccheri, i solidi più abbondanti presenti nel mosto d'uva. Sono responsabili del gusto acido/aspro del vino e ne influenzano anche la stabilità, il colore e il pH. Infatti, la qualità e la quantità di acidi, insieme agli zuccheri, hanno un effetto significativo sulle qualità organolettiche dei vini. Il tipo di acidi presenti nel mosto d'uva e la loro concentrazione dipendono da fattori come il vitigno, la composizione del terreno e le condizioni climatiche (Vilela, 2019).

In genere gli acidi iniziano ad accumularsi nell'uva all'inizio dello sviluppo degli acini, e raggiungono la loro concentrazione all'inizio della maturazione. Gli acidi predominanti nell'uva sono il tartarico e il malico, che insieme possono rappresentare oltre il 90% dell'acidità totale nell'acino, e sono entrambi importanti per il pH del mosto e del vino.

I principali acidi che determinano l'acidità totale del vino sono:

- **acido tartarico:** è il più importante perché ha il compito di mantenere la stabilità chimica e il colore del vino, oltre ad influenzare il gusto del prodotto finito, grazie al suo gusto descritto come "minerale" o simile agli agrumi. La maggior parte della concentrazione di acido tartarico è presente come bitartrato di potassio. Durante la fermentazione, questi tartrati si legano alle fecce, ai residui di polpa, ai tannini e ai pigmenti precipitati. In genere questi aggregati sono solubili nella soluzione alcolica del vino, ma la loro cristallizzazione può avvenire in momenti imprevedibili, specialmente in bottiglia, dove si formano dei cristalli che sembrano "vetri rotti", anche se in realtà sono innocui. Non è un buon substrato per metabolico per i batteri lattici né per i lieviti (Benito, 2020).
- **acido malico:** ha un costo più elevato dell'acido tartarico ed ha un gusto più fresco e aspro, talvolta correlato al sapore delle mele verdi. La concentrazione di acido malico negli acini d'uva è maggiore appena prima dell'invasatura, quando può essere presente in concentrazioni fino a 20 g/l. Con l'avanzare della maturazione dell'uva, l'acido malico viene metabolizzato nel processo di respirazione e, alla vendemmia, la sua concentrazione può essere compresa tra 1 e 9 g/l. I mosti troppo maturi possono avere concentrazioni finali di acido malico inferiori a 1 g/l, mentre i mosti d'uva provenienti dalle regioni fredde dell'Atlantico possono raggiungere concentrazioni superiori a 6 g/l. La perdita respiratoria di acido malico è maggiore nei climi più caldi. Quando non è presente acido malico, l'uva si considera "troppo matura" o senescente, e questa perdita va compensata aggiungendo

acido in cantina in un processo noto come acidificazione. L'acido malico è utilizzato dai batteri lattici per produrre acido lattico durante la fermentazione. I batteri sono in grado di degradare tutto l'acido malico presente nel mosto con la fermentazione malolattica, invece il lievito *Saccharomyces cerevisiae* riesce a degradare solo una parte di questo acido (10-25%) (Benito, 2020).

- acido citrico: si trova solo in quantità minime nell'uva da vino. Quando viene aggiunto acido citrico al vino, questa aggiunta viene sempre eseguita dopo che la fermentazione alcolica primaria è stata completata, a causa della tendenza del lievito a convertire il citrico in acido acetico. L'acido citrico è un acido organico debole che presenta un'attività antimicrobica contro muffe e batteri. Può reagire con gli antiossidanti chelando gli ioni metallici, aiutando così a prevenire l'imbrunimento. L'acido citrico è presente nel metabolismo di quasi tutti gli organismi perché è un importante intermedio nel ciclo degli acidi tricarbossilici (ciclo TCA) (Benito, 2020).

1.3.2 Gli acidi presenti nel vino

Durante il processo di vinificazione è opportuno monitorare la concentrazione degli acidi organici, distinguendo tra quelli presenti direttamente nell'uva (tartarico, malico e citrico) e quelli che si originano durante la fermentazione (acetico, succinico, lattico).

L'acido acetico ha una soglia di percezione di 0,8-0,9 g/l, oltre la quale è immediatamente riconoscibile a causa dell'odore di aceto e del gusto acre, che compromettono la qualità del vino. L'acido acetico si può formare sull'uva o sul mosto a causa della presenza di lieviti, funghi filamentosi e batteri. Il lievito *S. cerevisiae* produce basse concentrazioni di acido acetico (0,2-0,5 g/l) durante la fermentazione alcolica, mentre lieviti non-*Saccharomyces* producono quantità maggiori di questo acido. Anche alcuni batteri possono produrre acido acetico metabolizzando gli zuccheri residui, dopo la fermentazione malolattica (Vilela, 2019).

L'acido succinico ha un gusto aspro, salato e amaro, ed è l'acido principale prodotto dal lievito durante la fermentazione. La sua concentrazione può variare da 0 a 2,6 g/l, con un valore medio di 1,2 g/l nei vini rossi e di 0,6 g/l nei vini bianchi, pertanto ha un ruolo importante nell'acidità del vino (Vilela, 2019).

L'acido lattico è un acido morbido, monoprotico e quindi più debole rispetto all'acido malico (poliprotico), e solitamente viene percepito come acido e piccante. Questo acido aumenta la complessità e la morbidezza del vino, e può essere prodotto sia dai batteri che dai lieviti.

I batteri lo producono durante la fermentazione malolattica a fini energetici, degradando l'acido L-malico e producendo acido L-lattico, mentre i lieviti possono produrre acido lattico a partire dal piruvato, per riossidare il NADH e gestire il potere riducente (Vilela, 2019).

1.4 L'instabilità degli acidi nel vino

L'acido lattico ha il vantaggio di essere stabile, mentre gli altri acidi principali, tartarico, malico e citrico, mostrano instabilità chimiche o microbiche che possono diminuire la qualità del vino.

L'acido tartarico è chimicamente instabile in quanto può precipitare sotto forma di tartrati quando si combina con i cationi potassio, provocando significative diminuzioni dell'acidità totale e aumenti del pH. L'acido malico e l'acido citrico sono instabili dal punto di vista microbiologico e possono dare origine a rifermentazioni indesiderate, torbidità e problemi di acidità volatile. L'acido malico è instabile poiché i batteri lattici possono metabolizzarlo in acido lattico e CO₂. Per questo motivo, la maggior parte dei vini rossi effettua la fermentazione malolattica prima dell'imbottigliamento. L'acido malico può essere metabolizzato anche dal lievito *Schizosaccharomyces pombe* in etanolo e CO₂ durante la fermentazione maloalcolica.

Anche l'acido citrico è instabile poiché i batteri lattici possono metabolizzarlo in acido acetico e diacetile (Capozzi et al., 2021; Sumbly et al., 2019).

1.5 Modulazione dell'acidità nei vini

Generalmente l'acidità del vino viene controllata attraverso l'aggiunta di vari prodotti enologici come acido tartarico, malico o citrico. Tuttavia, negli ultimi decenni, nei consumatori di vino sono aumentate la preoccupazione e la consapevolezza del cambiamento climatico, di conseguenza vengono richiesti metodi di produzione del vino sempre più naturali e sostenibili, favorendo l'uso di microrganismi anche per la gestione dell'acidità.

I vini biologici sono percepiti come più sani e naturali rispetto ai vini tradizionali, e i consumatori sono disposti a pagare un prezzo maggiore per alcune qualità immateriali del vino, come il rispetto della qualità ambientale, dei diritti umani e della salute (Fazio et al., 2023).

L'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* potrebbe soddisfare queste esigenze dei consumatori, in quanto questi microrganismi possono permettere di gestire l'acidità del vino

in modo biologico (attraverso l'acidificazione o la disacidificazione microbica) per evitare l'aggiunta di prodotti enologici.

2. I lieviti non-*Saccharomyces*

La fermentazione del mosto d'uva in vino è un processo complesso che coinvolge vari microrganismi, principalmente lieviti e batteri, in diverse fasi.

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è tradizionalmente il lievito più utilizzato in enologia, perché consente di produrre vino con elevata stabilità grazie alla sua elevata tolleranza all'etanolo e alla capacità di inibire batteri e altri microrganismi indesiderati durante il processo di fermentazione.

Anche se *S. cerevisiae* rimane il lievito con il miglior vigore fermentativo, alcuni studi hanno evidenziato come lieviti appartenenti a generi diversi (non-*Saccharomyces*) possano avere un ruolo cruciale nella produzione di vino in quanto sono in grado di liberare con maggiore efficienza alcuni aromi varietali, di ridurre l'acidità volatile, di abbassare la resa alcolica e di avere un'attività di biocontrollo (Vilela, 2019).

I lieviti non-*Saccharomyces* si possono trovare sia sulla superficie delle uve che in cantina (Varela e Borneman, 2017). Questi lieviti sono stati considerati in passato microrganismi contaminanti e indesiderati, responsabili di fermentazioni lente o di arresti di fermentazione, a causa della loro scarsa tolleranza all'alcol e ad un pH basso, o di profili sensoriali negativi del vino, associati ad alti livelli di acido acetico e sapori sgradevoli. Tuttavia è stato dimostrato che molte specie possono contribuire alla fermentazione del vino e influire positivamente sulla qualità del vino, producendo metaboliti che possono contribuire alla complessità e al profilo aromatico del vino (Jolly et al., 2014; Ciani e Comitini, 2015).

Negli ultimi anni, in ambito enologico, è sempre più comune l'utilizzo di lieviti *non-Saccharomyces* per produrre vini che soddisfino i requisiti del consumatore, per migliorare le caratteristiche organolettiche di alcuni vini e per gestire al meglio alcuni punti critici di processo.

Nelle prime fasi della fermentazione spontanea sono coinvolti diversi generi di lievito: *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Metschnikowia* e *Starmerella*.

Secondo un lavoro di Vilela (2019) le specie *non-Saccharomyces* più studiate sono:

Hanseniaspora uvarum

Hanseniaspora vineae

Torulaspota delbrueckii

Metschnikowia pulcherrima

Starmerella bacillaris (sin. *Candida zemplinina*)

Zygosaccharomyces florentinus

Schizosaccharomyces pombe

Hansenula anomala

Pichia kudriavzevii

Lachancea thermotolerans

Di conseguenza la fermentazione è fortemente influenzata dalle specie presenti nel mosto, e la selezione dei lieviti appropriati è importante per la qualità del vino perché producono importanti sostanze aromatiche durante la fermentazione. Sfruttando alcune caratteristiche del loro metabolismo, è infatti possibile enfatizzare nei vini finiti specifici caratteri sensoriali. Negli ultimi anni numerosi studi hanno indicato che i lieviti *non-Saccharomyces* possono produrre un gran numero di enzimi extracellulari, come la β -glucosidasi, la proteasi e la carbonio-zolfo liasi. Queste attività enzimatiche catalizzano la liberazione degli aromi dai loro precursori non-volatili. Nello specifico, la β -glucosidasi può idrolizzare i terpeni legati agli zuccheri e rilasciare forme libere per migliorare la complessità dell'aroma, mentre lipasi e proteasi possono potenzialmente degradare lipidi e proteine e quindi promuovere il rilascio di esteri, alcoli, acidi e derivati della fenilalanina. Inoltre, l'inoculo di lieviti *non-Saccharomyces* può aumentare il contenuto di polifenoli e migliorare la qualità del sapore (Qiu et al., 2022).

2.1 Modalità di inoculo dei lieviti non-Saccharomyces

I lieviti *non-Saccharomyces* solitamente non sono in grado di terminare la fermentazione alcolica, quindi vengono utilizzati in inoculi sequenziali o simultanei con *S. cerevisiae* per assicurare il completamento del processo fermentativo (Varela and Borneman, 2017). I lieviti *non-Saccharomyces*, che crescono durante le fasi iniziali della fermentazione, sono microrganismi enologici con caratteri alternativi rispetto a *S. cerevisiae*, suggerendo che un'adeguata co-fermentazione con quest'ultimo sia un fattore importante per la produzione di vini di alta qualità.

Nell'inoculo sequenziale, i lieviti *non-Saccharomyces* sono inoculati per primi, per avviare la fermentazione del mosto, e *S. cerevisiae* viene inoculato dopo uno o due giorni. Il tempo durante il quale i lieviti *non-Saccharomyces* fermentano da soli determinerà le caratteristiche del vino. Possono apportare ai vini maggiore complessità organolettica o modificare alcuni parametri critici, come l'acidità fissa (Vilela, 2019).

Un'altra buona strategia è quella di coinoculare entrambi i lieviti nel mosto iniziale. Il coinoculo di *S. cerevisiae* con altri lieviti non-*Saccharomyces* stimola l'assorbimento di glucosio e azoto da parte dei lieviti, lasciando un terreno più impoverito per i batteri lattici e influenzando negativamente le prestazioni della FML (Vicente et al., 2022).

Oggi giorno, alcuni lieviti non-*Saccharomyces* vengono utilizzati nelle fermentazioni miste per diminuire il contenuto alcolico dei vini, come *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *C. stellata* e *S. bacillaris*, possibilmente mitigando l'effetto negativo dell'etanolo sulla crescita dei batteri lattici.

2.2 Caratteristiche generali dei lieviti non-*Saccharomyces* proposti per la modulazione dell'acidità dei vini

2.2.1 *Lachancea thermotolerans*

Lachancea thermotolerans, precedentemente noto come *Kluyveromyces thermotolerans*, è un lievito non convenzionale che ha una forma piuttosto simile a *S. cerevisiae* e dimensioni leggermente più piccole, e questo li rende difficili da distinguere alle osservazioni microscopiche (Figura 1) (Benito, 2018).

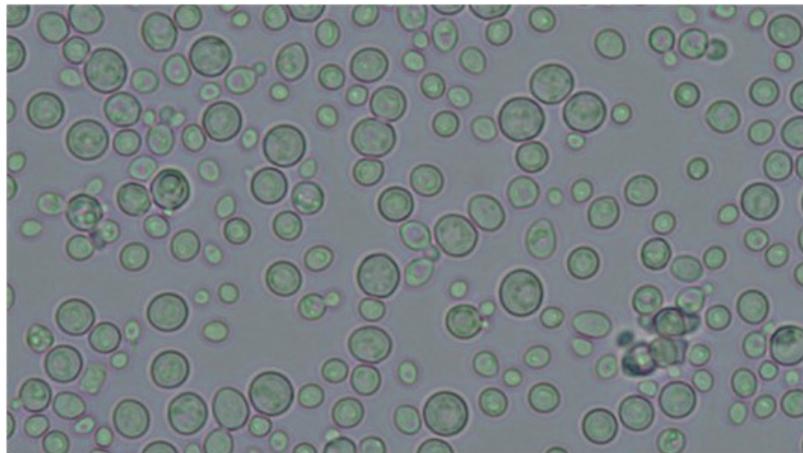


Figura 1. Osservazione al microscopio di lieviti della specie *Lachancea thermotolerans* (cellule piccole arrotondate) e lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae* (cellule grandi arrotondate).

Questo lievito presenta diverse caratteristiche che rendono interessante il suo utilizzo in vinificazione.

A differenza di *S. cerevisiae*, che produce basse concentrazioni di acido lattico, *L. thermotolerans* è in grado di produrre grandi quantità di questo acido ed è pertanto in grado

di generare acidificazioni e riduzioni di pH significative. La produzione di acido lattico è molto variabile a seconda delle condizioni e del ceppo utilizzato (Vicente et al., 2022).

L. thermotolerans mostra un'estrema tolleranza alle elevate pressioni osmotiche e può crescere in concentrazioni di zucchero fino al 60%. Tra i lieviti non-*Saccharomyces* *L. thermotolerans* è uno dei lieviti più fermentativi, e questa caratteristica gli permette di conquistare diverse nicchie.

Questo lievito può essere utilizzato per sviluppare un processo di deacetificazione biologica controllata in vini con elevata acidità volatile. Diversi studi scientifici riguardanti *L. thermotolerans* lo descrivono come in grado di produrre concentrazioni ridotte di acido acetico rispetto a *S. cerevisiae*. Le concentrazioni generalmente sono inferiori a 0,2 g/l di acido acetico (ma con un'elevata variabilità a seconda del ceppo, con variazioni da 0,03 a 0,58 g/l) (Vicente et al., 2021).

L. thermotolerans è uno scarso produttore di acetaldeide rispetto a *S. cerevisiae*, producendo concentrazioni finali di acetaldeide che variano da 15 a 19 mg/l nelle fermentazioni pure, anche se è stato riportato un effetto opposto per le fermentazioni sequenziali (Vicente et al., 2021).

Oltre ad aumentare l'acidità dei vini e a migliorare le caratteristiche sensoriali dei vini prodotti da mosti con bassa acidità, porta ad un aumento delle concentrazioni degli esteri fermentativi fruttati, migliorando significativamente anche la valutazione dei consumatori (Vicente et al., 2022).

La letteratura scientifica generalmente descrive i vini prodotti con *L. thermotolerans* come migliori da un punto di vista sensoriale rispetto ai controlli prodotti con *S. cerevisiae*, principalmente a causa di un migliore equilibrio tra acidità e altre proprietà gustative.

Gli studi hanno dimostrato che *L. thermotolerans* porta ad un aumento dell'intensità del colore di circa il 10% per il maggiore effetto colorante degli antociani nel vino quando il pH diminuisce a causa della formazione di acido lattico (Benito, 2020).

L. thermotolerans produce 2-5 volte più glutazione rispetto a *S. cerevisiae*. In uno studio è stato misurato che tre diversi ceppi di *L. thermotolerans* contenevano glutazione in concentrazioni variabili da 0,205 a 0,537 nmol/mg cellula, mentre il controllo di *S. cerevisiae* mostra 0,095 nmol/mg cellula (Vicente et al., 2021). Per questo motivo, la produzione di glutazione potrebbe rappresentare un parametro di selezione interessante per futuri processi di selezione riguardanti ceppi di *L. thermotolerans*. Infatti il glutazione possiede proprietà antiossidanti che sono interessanti nella moderna vinificazione per evitare cambiamenti

dannosi nel colore e negli aromi ossidativi e consente inoltre di ridurre l'aggiunta di anidride solforosa, composto pericoloso soprattutto per le persone che soffrono di asma (Benito, 2019). Inoltre studi recenti hanno dimostrato che le fermentazioni sequenziali che coinvolgono *L. thermotolerans* riducono la concentrazione finale di anidride solforosa (Benito, 2019). La gestione di *L. thermotolerans* potrebbe rappresentare una strategia interessante per ridurre la concentrazione finale di anidride solforosa nel vino.

Altre caratteristiche positive riscontrate in fermentazioni effettuate con ceppi di *L. thermotolerans* sono il grado alcolico ridotto, la produzione di concentrazioni più elevate di glicerolo, polisaccaridi, tioli e terpeni e la riduzione del contenuto finale di alcoli superiori, ocratossina A ed acetaldeide (Vicente et al., 2021). Tuttavia, queste caratteristiche variano ampiamente a seconda del ceppo utilizzato, quindi sono necessari processi di selezione specifici per ottenere questi obiettivi durante la vinificazione.

Molto interessante è la sua capacità di ridurre la quantità di etanolo in vini prodotti in aree viticole calde se utilizzato in fermentazioni combinate rispetto alle fermentazioni pure di *S. cerevisiae*. Il fatto che *L. thermotolerans* abbia un effetto Crabtree più debole rispetto a *S. cerevisiae* spiega questa riduzione nella produzione dell'etanolo, poiché è favorito il metabolismo respiratorio (Vicente et al., 2021).

Alcuni studi hanno riportato che fermentazioni miste con *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* avevano un contenuto di glicerolo più elevato rispetto al controllo con *S. cerevisiae*. Tali differenze risultano moderate e variano da 0,29 a 0,93 g/l (Vicente et al., 2021).

Inoltre *L. thermotolerans* produce più polisaccaridi rispetto a *S. cerevisiae* (fino al 23% in più), ma con un'elevata variabilità tra ceppi (Benito, 2018).

I vini prodotti con *L. thermotolerans* hanno solitamente basse quantità di alcoli superiori totali; ma questa caratteristica dipende dalla variabilità del ceppo. Per quanto riguarda i terpeni, *L. thermotolerans* non influenza o aumenta la concentrazione finale.

Tra gli svantaggi di questo lievito vanno elencati il moderato potere fermentativo e l'incapacità di fermentare in presenza di concentrazioni di etanolo superiori al 9–10% (v/v). Sebbene il potere fermentativo sia superiore a quello della maggior parte degli altri lieviti non-*Saccharomyces*, non è sufficiente per fermentare un normale vino secco, i cui valori variano solitamente dal 12 al 15% (v/v). Per questo motivo è necessario inocularlo con un altro genere di lievito più fermentativo, come *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, per garantire la completa fermentazione degli zuccheri del mosto (Benito, 2020).

Un'altra importante limitazione è la scarsa resistenza all'anidride solforosa; infatti raramente supera i 20 mg/l di SO₂ libera, anche se alcuni ceppi selezionati possono tollerare fino a 40 mg/l. Per questo motivo l'utilizzo di *L. thermotolerans* è limitato a uve con buone caratteristiche sanitarie, che non necessitano di elevate aggiunte correttive di SO₂, o è legato all'uso di prodotti alternativi alla SO₂ come il chitosano, il lisozima o l'acido ascorbico, che non inibiscono lo sviluppo di *L. thermotolerans* ma proteggono il vino o il mosto dai microrganismi deterioranti e dall'ossidazione (Benito et al., 2015).

2.2.2 Specie di *Schizosaccharomyces*

Secondo la classificazione tassonomica più recente, ci sono tre specie principali nel genere *Schizosaccharomyces*: *S. pombe*, *S. japonicus* e *S. octosporus*. Il genere *Schizosaccharomyces* ha una morfologia unica tra i lieviti, con una forma tendente al rettangolare, al contrario delle altre specie, che sono per lo più di forma sferoidale od ellittica (Figura 2).

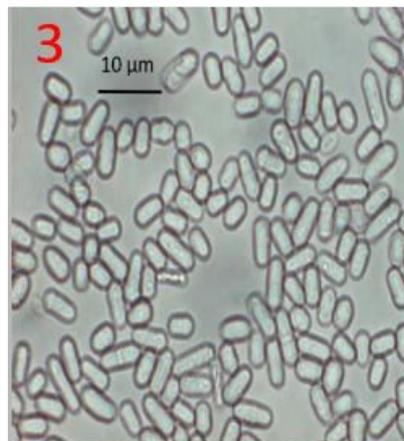


Figura 2. Osservazione al microscopio di *S. pombe*

I lieviti del genere *Schizosaccharomyces* presentano interessanti caratteristiche enologiche, come la capacità di degradare acidi organici e ridurre l'acidità totale, l'elevata produzione di glicerolo, la degradazione dell'urea (precursore dell'etilcarbammato) e la produzione di elevate quantità di acido piruvico durante i primi giorni della fermentazione alcolica (Benito et al., 2012).

S. pombe è la specie non-*Saccharomyces* più raccomandata per deacidificare vini eccessivamente acidi grazie alla capacità di degradare l'acido malico e l'acido gluconico. In particolare questi lieviti sono capaci di metabolizzare l'acido malico in anidride carbonica ed etanolo attraverso la fermentazione malo-alcolica, riducendo l'acidità totale del vino (Benito et al., 2019).

S. pombe ha un elevato potere fermentativo, simile a quello di *S. cerevisiae*, che rende alcuni ceppi capaci di fermentare fino a concentrazioni di etanolo superiori al 15% (v/v).

S. pombe è in grado di rilasciare durante la fermentazione alcolica quantità maggiori di polisaccaridi rispetto a qualsiasi altro lievito *Saccharomyces* o non-*Saccharomyces*, migliorando di conseguenza la struttura del vino. La natura di questi polisaccaridi è diversa da quella riportata per *S. cerevisiae*, includendo α -galattomannosio e β -glucani (Benito et al., 2019). I lieviti appartenenti al genere *Schizosaccharomyces* sono infatti gli unici lieviti contenenti galattomannoproteine nello strato esterno della parete cellulare, utili per sopportare elevate pressioni osmotiche. In particolare, un ceppo di *S. pombe* è stato in grado di rilasciare una quantità di polisaccaridi cinque volte maggiore rispetto a *S. cerevisiae*. Tra i principali polisaccaridi presenti nei vini, derivati dalla parete cellulare dei lieviti, ci sono le mannoproteine, rilasciate naturalmente durante la fermentazione alcolica, in seguito alla moltiplicazione cellulare, e durante l'affinamento dei vini "sur lies", in seguito alla lisi cellulare. L'impiego di mannoproteine ha molteplici vantaggi, come la riduzione dell'instabilità proteica e tartarica, la prevenzione dell'aggregazione e precipitazione dei tannini, la stabilizzazione del colore nei vini rossi e della schiuma nei vini spumanti. Poiché non tutti i vini vanno incontro ad affinamento su fecce, questa caratteristica rende molto interessante l'utilizzo di questi lieviti in grado di rilasciare elevati quantitativi di mannoproteine durante la fermentazione alcolica (Domizio et al., 2014).

Il processo di fermentazione malolattica di solito riduce il contenuto di antociani e l'intensità del colore dal 10% al 23%, a causa dell'assorbimento cellulare e dell'attività enzimatica della glicosidasi dei batteri lattici, mentre vini fermentati con *S. pombe* mostrano contenuti più alti di antociani totali e intensità di colore più elevate, in quanto in queste fermentazioni non è necessaria la fermentazione malolattica. Inoltre, l'uso combinato con *L. thermotolerans* aumenta l'intensità del colore grazie all'ulteriore riduzione del pH che aumenta l'intensità del colore (Benito et al., 2019).

S. pombe produce concentrazioni significativamente inferiori di alcoli superiori ed esteri rispetto a *S. cerevisiae* e altre specie di lieviti, aspetto molto interessante quando si desidera mantenere più l'aroma varietale delle uve che l'aroma fermentativo.

Poiché utilizzando *S. pombe* la fermentazione malolattica, in grado di produrre ammine biogene, non è necessaria, l'utilizzo di questo lievito consente il controllo di queste sostanze tossiche. Inoltre, l'ureasi prodotta da *S. pombe* elimina l'urea, il principale precursore dell'etilcarbamato (Benito et al., 2019).

Sebbene *S. pombe* sia il lievito più studiato del genere *Schizosaccharomyces*, *S. japonicus* mostra proprietà simili a *S. pombe* e una migliore performance in parametri di qualità specifici come la produzione di glicerolo e il rilascio di polisaccaridi.

Uno dei principali problemi nell'uso di *S. pombe* in vinificazione è l'elevata produzione di acido acetico, che determina un carattere di aceto di bassa qualità, che i consumatori di vini di qualità non tollerano. L'uso combinato con *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans* o *T. delbrueckii* permette la produzione di vini con contenuti di acido acetico inferiori a quelli prodotti con solo *S. cerevisiae*. Un altro effetto indesiderato è l'aumento della concentrazione di etanolo, dovuto al fatto che la degradazione di 2,33 g/l di acido malico comporta un aumento di etanolo di circa lo 0,1% (v/v) (Benito et al., 2019).

2.2.3 *Torulaspota delbrueckii*

Torulaspota delbrueckii è stato uno dei primi lieviti non-*Saccharomyces* commerciali a essere rilasciato. Precedentemente classificato come *Saccharomyces rosei*, era suggerito per la vinificazione di mosti a basso contenuto di zuccheri e acidi e veniva utilizzato per la produzione commerciale di vini rossi e rosati in Italia (Jolly et al., 2014).

Le specie del genere *Torulaspota* hanno cellule sferiche o ellissoidali, leggermente più piccole di quelle di *S. cerevisiae* (Figura 3).

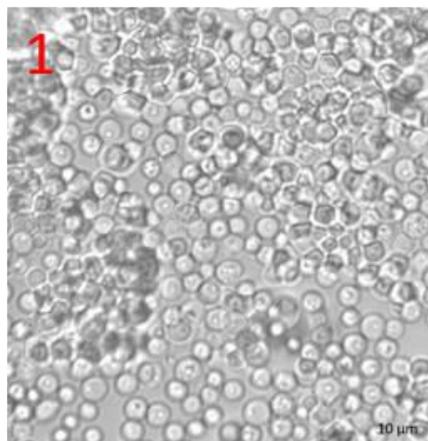


Figura 3. Osservazione al microscopio di *T. delbrueckii*

La gestione di *T. delbrueckii* è relativamente semplice rispetto ad altre specie non-*Saccharomyces* grazie al suo potere fermentativo relativamente alto, fino al 9-10% (v/v). Questa resistenza all'etanolo gli consente di influenzare notevolmente il prodotto finale per quasi tutta la fermentazione alcolica, anche se è spesso necessario un lievito maggiormente fermentativo per concludere correttamente la fermentazione alcolica. Nonostante ciò l'uso

di *T. delbrueckii* in inoculo singolo in fermentazione è stato suggerito per la produzione di birra o di vini base spumanti (Benito et al., 2019).

Uno dei principali vantaggi di *T. delbrueckii* è la riduzione della concentrazione di acidità volatile nei vini, con riduzioni nella concentrazione finale di acido acetico di circa 0,14 a 0,28 g/l rispetto a *S. cerevisiae*, insieme ad un consumo moderato di acido malico osservato in fermentazioni sequenziali in quantità variabili dal 20% al 25%. Inoltre l'utilizzo di *T. delbrueckii* può ridurre la concentrazione finale di etanolo nei vini fino all'1% (v/v), aumentando di conseguenza la concentrazione di glicerolo da 0,2 a 0,9 g/l. Diversi studi riportano anche che *T. delbrueckii* rilascia una quantità maggiore di mannoproteine rispetto a *S. cerevisiae* e ad altre specie non-*Saccharomyces*.

Altri metaboliti prodotti da *T. delbrueckii* includono l'acido succinico e, per ceppi particolari, il linalolo, derivato da alcoli monoterpenici che contribuisce all'aroma varietale dei vini tipo Moscato. Poiché *T. delbrueckii* influenza la composizione del vino, può migliorare l'intensità e la qualità dell'aroma del vino, soprattutto in inoculo con *S. cerevisiae*, aumentando la percezione dei caratteri varietali e fruttati grazie alla riduzione delle concentrazioni di alcoli superiori (Jolly et al., 2014). La produzione di esteri fruttati risulta dipendente dalla grande variabilità tra i ceppi di questa specie.

Un effetto indesiderato moderato riportato dalla maggior parte degli autori è un ritardo nella fermentazione sequenziale con *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* rispetto al controllo con solo *S. cerevisiae*.

2.2.4 Specie di *Hanseniaspora*

Le specie del genere *Hanseniaspora* possiedono una caratteristica forma apiculata (Figura 4).

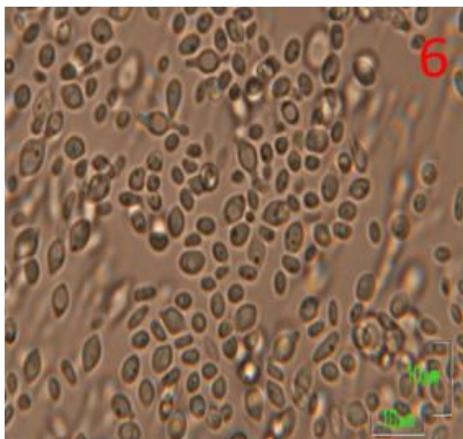


Figura 4. Osservazione al microscopio di *H. uvarum*

La maggior parte dei lieviti presenti all'inizio della fermentazione spontanea appartiene a questo genere, e si suppone che costituiscano una percentuale importante dei lieviti presenti nell'uva (superiore al 65% del totale dei lieviti indigeni), presentando una grande variabilità di specie. Questo indica che, nelle fermentazioni spontanee, il genere *Hanseniaspora* contribuisce notevolmente alla qualità del vino nelle fasi iniziali della fermentazione, fino a quando i livelli di etanolo raggiungono circa il 4%, concentrazione alla quale la maggior parte dei ceppi di *Hanseniaspora* non riesce a sopravvivere a causa della bassa tolleranza all'etanolo. Le specie di *Hanseniaspora* hanno generalmente un basso potere fermentativo, ma sono importanti nella produzione di composti volatili del vino, e se usati in inoculo con *S. cerevisiae* possono influenzare positivamente la composizione chimica e la qualità del vino (Jolly et al., 2014).

H. guilliermondii, *H. uvarum* e *H. vineae* sono le specie più appropriate da usare in vinificazione per migliorare l'intensità del gusto e la complessità dell'aroma del vino. Grazie alla produzione di concentrazioni elevate di 2-feniletile acetato, esteri di acetato come l'acetato di isoamile, esteri di etile e acidi grassi a catena media, benzenoidi e terpeni, e alla riduzione della concentrazione finale degli alcoli superiori, sono in grado di migliorare il profilo aromatico dei vini. Le specie più appropriate per migliorare il colore e la composizione polifenolica nei vini rossi, in grado di migliorare parametri di qualità come l'intensità del colore e gli antociani totali, sono *H. clermontiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii* e *H. vineae* (Benito et al., 2019).

Uno degli svantaggi di questi lieviti apiculati è la notevole produzione di acido acetico (0,75–2,25 g/l) e acetato di etile, che li rendono poco interessanti per la produzione di vino. Esiste comunque una grande variabilità tra i ceppi e alcuni producono livelli di acidità volatile comparabili con quelli prodotti da *S. cerevisiae*. Sebbene possano essere associati alla produzione di composti aromatici indesiderabili (acidità volatile, composti solforati, ecc.), possono avere un'influenza positiva sul profilo aromatico di certi vini.

Altri aspetti metabolici di *Hanseniaspora* riguardano la produzione di acetoino nel mosto d'uva, la formazione di ammine biogene indesiderate e la capacità di ridurre i livelli di ocratossina A nel mosto. Il genere *Hanseniaspora* è anche una fonte interessante di enzimi, in particolare β -glucosidasi, β -xilosidasi, enzimi glicolitici e proteasi. Alcuni studi riportano un effetto ritardante da parte di *Hanseniaspora* sulla crescita di *S. cerevisiae* che potrebbe causare fermentazioni lente o bloccate (Jolly et al., 2014).

2.2.5 *Starmerella bacillaris*

Starmerella bacillaris (sinonimo *Candida zemplinina*) è un lievito ascomicete, con cellule ellissoidali/allungate (Figura 5). È stato isolato per la prima volta in Napa Valley (California) nel 2002, durante la fermentazione di mosto derivante da uve bottrizzate e, poco tempo dopo, su mosto bottrizzato a Zemplin (Ungheria), e viene spesso associato alle uve troppo mature e bottrizzate (Raymond Eder e Rosa, 2021).

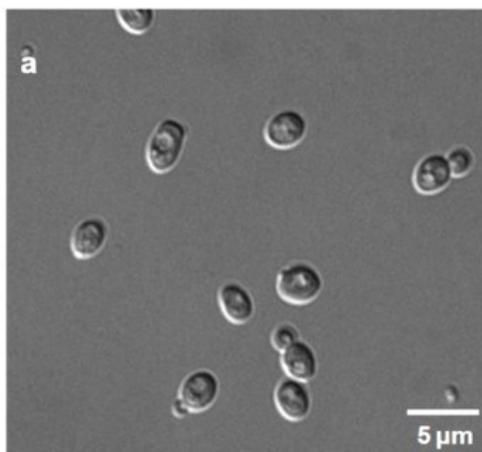


Figura 5. Osservazione al microscopio di *S. bacillaris*.

Tratto distintivo della specie è il carattere fruttosifilo, ossia la preferenza nel consumo di fruttosio rispetto al glucosio quando entrambi gli zuccheri sono presenti. Altri caratteri interessanti per l'enologia sono la bassa produzione di acido acetico ed acetaldeide, la capacità di crescere anche ad elevate concentrazioni di zucchero, e la produzione elevata di glicerolo derivata dal consumo degli zuccheri (Raymond Eder e Rosa, 2021).

In alcuni studi è stata rilevata la presenza di *S. bacillaris* alla fine della fermentazione alcolica, suggerendo che alcuni ceppi abbiano elevata tolleranza all'alcol e potere fermentativo (Rantsiou et al., 2012).

Vini prodotti con inoculazione sequenziale di *S. bacillaris* e *S. cerevisiae* hanno mostrato profili volatili molto diversi rispetto ai vini fermentati solo con *S. cerevisiae*, e avevano concentrazioni significativamente aumentate di terpenoli (linalolo, citronellolo, geraniolo, nerolidolo e farnesolo) e ridotte di aldeidi e acetati (Jolly et al., 2014).

2.2.6 Candida stellata

Candida stellata è un lievito isolato originariamente da mosto d'uva troppo maturo in Germania, ma si può trovare in diversi habitat naturali e artificiali. Le cellule di *C. stellata* sono sferiche/ovoidali e di solito si trovano come cellule singole (Figura 6).

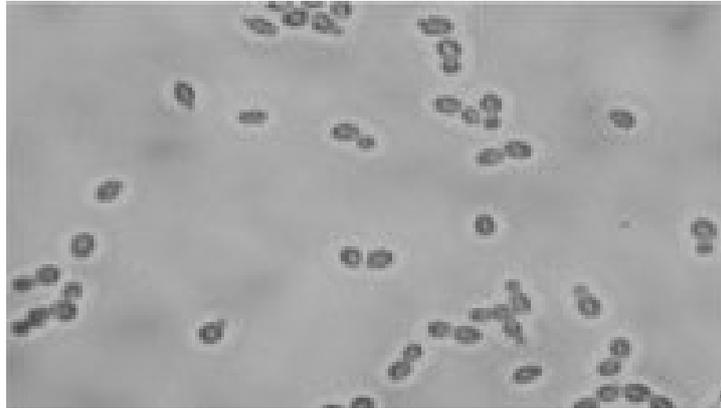


Figura 6. Osservazione al microscopio di *C. stellata*.

Durante l'inizio della fermentazione alcolica è generalmente presente in quantità considerevoli (tra il 5% e il 12%, e addirittura fino al 50% della popolazione totale), ed è frequentemente associato a mosti derivati da uve bottrizzate. È in grado di fermentare glucosio, saccarosio e raffinoso, e utilizza la lisina come unica fonte di azoto. È in grado di crescere a valori di pH più alti, non è sensibile all'etanolo e sebbene non sia un grande fermentatore, può occasionalmente rimanere attivo fino alla fine della fermentazione, grazie alla presenza di vitamine come la biotina o la tiamina. Queste caratteristiche lo rendono un buon candidato per il coinoculo con *S. cerevisiae* (Maicas e Mateo, 2023).

C. stellata produce elevate quantità di glicerolo (fino a 14 g/l nel vino), è osmofilo e consuma preferibilmente il fruttosio rispetto al glucosio. Poiché *S. cerevisiae* è un lievito glucosofilo, non è inusuale osservare alti residui di fruttosio dopo la fermentazione di mosti d'uva con elevate concentrazioni iniziali di zucchero. Inoltre, in alcuni studi di inoculo con *S. cerevisiae*, sono stati riportati un aumento di glicerolo e acido succinico e una riduzione di acido acetico e alcoli superiori (Jolly et al., 2014).

3. Microrganismi acidificanti

La mancanza di acidità è uno dei problemi chiave che affliggono i vigneti nelle zone viticole calde, e altre regioni più fredde potrebbero soffrire di problemi simili in futuro a causa dell'evoluzione del cambiamento climatico.

Durante il processo di maturazione, le piante di vite sintetizzano lo zucchero mentre consumano gli acidi. Il primo acido ad essere degradato è l'acido malico, la cui concentrazione è talvolta molto bassa nelle uve molto mature o troppo mature, provocando problemi sensoriali e tecnici nella vinificazione.

La moderna vinificazione nelle regioni viticole calde basa la gestione microbiologica dell'acidità del vino sull'acidificazione per migliorare la percezione sensoriale, dato che in queste zone i vini hanno spesso acidità molto basse.

Esistono diverse strategie biologiche per migliorare l'acidità del vino, le principali sono riportate nella Tabella 1.

Il genere *Saccharomyces* può migliorare l'acidità, aumentando la concentrazione di acido malico o lattico in piccole quantità al di sotto di 1 g/L per i ceppi naturali. Anche i ceppi di *Saccharomyces* geneticamente modificati possono influenzare significativamente l'acidità, ma il loro uso è vietato o regolamentato nella maggior parte dei paesi.

Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, *L. thermotolerans* si è già affermato come il miglior bioacidificante nel settore enologico e potrebbe essere una valida soluzione per combattere il cambiamento climatico nella moderna vinificazione.

Anche altri lieviti non-*Saccharomyces*, come *S. bacillaris* o *C. stellata*, possono migliorare leggermente l'acidità, aumentando la concentrazione finale di acido lattico o succinico. *S. bacillaris* può produrre acido α -chetoglutarico e acido piruvico e *C. stellata* è in grado di produrre concentrazioni significative di acido succinico (Vicente et al., 2022).

	Principle	Acidification Effect	Advantages	Disadvantages	Price
<i>Saccharomyces</i> malic acid formation	MA ↑ Microbial metabolism	Strain selection: MA → 0.3-0.7 g/L ↑ pH → 0.10 ↓		Malic acid is not microbially stable Malic acid can be harsh in high concentrations	Commercial dry yeast price n.d. for GMO
	Strain selection	GMO: MA → 12 g/L ↑		GMO legislation	
<i>Saccharomyces</i> lactic acid formation	GMO LA ↑ Microbial metabolism	Strain selection: Traces GMO: LA → 2.6-8.6 g/L ↑ pH → 0.23-0.35 ↓	Lactic acid stability	GMO legislation	n.d. for GMO
<i>Saccharomyces</i> genus succinic acid formation	GMO SA ↑ Microbial metabolism	Strain selection: SA → 0.5-1.8 g/L ↑ Total acidity → 1.3 g/L ↑ pH → 0.1 ↓		Succinic acid sensory properties	Commercial dry yeast price: 500 g 53.00 €
<i>Lachancea thermotolerans</i> lactic acid production	LA ↑ Microbial metabolism	LA → 1-9 g/L ↑ pH → 0.1-0.5 ↓	Lactic acid stability	Ethanol and SO ₂ resistance of <i>L. thermotolerans</i> .	Commercial dry yeast: 500 g 40 to 90 €
<i>Stammerella bacillaris</i>	α-ketoglutaric and PA ↑ Microbial metabolism	TA → 0.5-1.1 g/L ↑	color intensity ↑, aroma ↑, acetic acid ↓, ethanol ↓ Alcohol ↓ Acetic Acid ↓ Wine aroma ↑ Color intensity ↑		
<i>Candida stellata</i>	SA ↑ Microbial metabolism	SA → 1.83 g/L ↑ TA → 2 g/L ↑ pH → 0.1 ↓		Succinic acid sensory properties Sensitive to low pH	

MA: Malic acid, LA: Lactic acid, SA: Succinic acid, PA: Pyruvic acid, TA: Total Acidity, GMO: Genetically Modified Organisms, ↑: Increase, ↓: Decrease.
The range of the prices of microorganisms is the one the main Spanish marketers offer in 2022 (Agrovin, Spain; Lallemand, Canada; Hansen, Denmark).

Tabella 1. Sintesi delle principali strategie di acidificazione biologica studiate per la vinificazione.

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Durante la fermentazione alcolica, specifici ceppi di *S. cerevisiae* possono produrre quantità moderate di acido malico attraverso la via del fumarato catalizzata dalla fumarasi citosolica o mitocondriale, o tramite l'acido ossalacetico catalizzato dalla malato deidrogenasi.

Uno studio di Yéramian e colleghi (2007) ha riportato che 10 ceppi di *S. cerevisiae* su 282 possiedono la capacità di produrre acido malico durante la fermentazione alcolica, mentre la maggior parte dei ceppi di *S. cerevisiae* lo consuma. In questo studio la produzione di acido malico variava da 0,39 a 0,76 g/L.

Questi ceppi provenienti da regioni calde tendono a conservare o produrre acido malico, mentre quelli provenienti da regioni fredde hanno una tendenza al consumo. Anche le condizioni di fermentazione hanno influenzato significativamente la produzione di acido malico. Bassa temperatura, pH elevato, basso contenuto di zuccheri e bassa concentrazione di acido malico e azoto assimilabile dal lievito sono parametri correlati all'aumento dell'acido malico. Inoltre, l'aumento delle concentrazioni di piruvato e fumarato aumenta anche il contenuto finale di acido malico.

Poiché la produzione di acido malico mediante la selezione di ceppi di *S. cerevisiae* è moderata, raggiungendo incrementi inferiori a 1 g/L, alcuni ricercatori hanno tentato di migliorare questo parametro attraverso l'ingegneria molecolare. La sovraespressione di un isoenzima della malato deidrogenasi può causare un'alta resa di produzione di acido malico fino a 12 g/L. Tuttavia, gli organismi geneticamente modificati sono spesso considerati potenziali rischi per la sicurezza alimentare e diversi paesi hanno normative severe a riguardo (Vicente et al., 2022).

S. cerevisiae può produrre tracce di acido lattico durante la fermentazione alcolica a causa dell'inefficienza della lattico deidrogenasi nei mitocondri. Tuttavia, a meno che non siano ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati, la produzione di acido lattico è molto bassa e non influisce in modo significativo sull'acidità totale.

Il genere *Saccharomyces* può rilasciare altri acidi organici diversi dagli acidi malico, acetico o lattico che possono influenzare l'acidità totale del vino. Gli acidi principali sono l'acido succinico, α -chetoglutarico, piruvico e fumarico che sono intermedi o sottoprodotti del ciclo del ciclo di Krebs (TCA) o della glicolisi. Il ciclo TCA genera acido succinico in condizioni anaerobiche. L'acido piruvico e l' α -chetoglutarico sono principalmente intermedi nella glicolisi (Vicente et al., 2022).

Uno studio di Chidi e colleghi (2015) ha confrontato la produzione di acidi organici di alcuni ceppi di lievito commerciali largamente utilizzati (EC1118, DV10, VIN13, BM45 e 285), riportando una grande variabilità tra i ceppi. Il ceppo VIN13 è stato il più alto produttore di acido succinico in condizioni anaerobiche (0,575–0,611 g/L) e aerobiche (2,195–3,816 g/L). Gli altri ceppi hanno mostrato una minore produzione di acido succinico in condizioni anaerobiche (0,296–0,418 g/L) e aerobiche (1,133–1,834 g/L), con il ceppo DV10 che ha avuto la produzione più bassa (0,198 g/L in condizioni anaerobiche e 0,855–1,709 g/L in condizioni aerobiche). Inoltre, l'acido piruvico raggiunge il suo valore massimo dal secondo al quarto giorno di fermentazione alcolica, per poi diminuire rapidamente. Le concentrazioni medie più alte di acido piruvico variavano da 150 a 250 mg/L e l'effetto sul pH non è significativo a causa della bassa concentrazione.

3.2 *Lachancea thermotolerans*

La principale opzione microbiologica per acidificare i vini che soffrono di mancanza di acidità è *Lachancea thermotolerans* che può aumentare l'acido lattico di diversi grammi per litro, influenzando in modo significativo l'acidità finale e il pH del vino (Tabella 1).

Ha la capacità unica di generare acido L-lattico durante la fermentazione alcolica dal metabolismo degli zuccheri fermentativi, senza consumare in modo significativo acido malico o aumentare l'acidità volatile (Figura 7). Questo metabolismo differisce da quello dei batteri lattici sull'acido malico. L'acido lattico ha il vantaggio di essere stabile, mentre la maggior parte degli acidi principali del vino presentano instabilità chimiche o microbiologiche.

La produzione di acido lattico coinvolge l'enzima lattato deidrogenasi, che catalizza il piruvato come intermedio nella glicolisi in acido lattico. Sono stati identificati tre geni (LDH1, LDH2 e LDH3) correlati alla lattato deidrogenasi che interconvertono il piruvato in acido lattico, accompagnati dall'interconversione di NADH e NAD⁺ (Vicente et al., 2022).

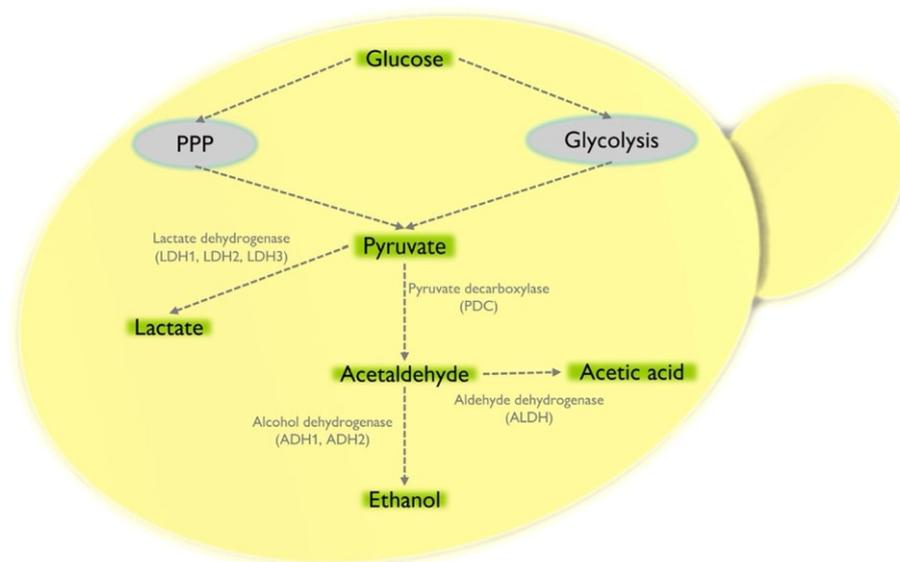


Figura 7. Metabolismo fermentativo del glucosio di *L. thermotolerans*

La capacità acidificante riportata nella letteratura scientifica per *L. thermotolerans* varia da 1 a 9 g/L di acido lattico (Tabella 1) e da 1 a 6 g/L di acidità totale. Le riduzioni del pH variano da 0,1 a 0,5 unità a seconda della quantità di acido L-lattico generato durante la fermentazione alcolica (Benito et al., 2018). Queste variazioni dipendono principalmente dal ceppo selezionato, dalle condizioni di fermentazione e dalla modalità di inoculo. La modalità di inoculo sequenziale è quella che ottiene i migliori risultati, permettendo a *L. thermotolerans* di fermentare in purezza per un periodo più lungo senza competizione. Il co-inoculo iniziale con altre specie di lieviti, come *S. cerevisiae* o *S. pombe*, mostra effetti

acidificanti inferiori a causa della competizione iniziale esercitata da questi microrganismi più fermentativi.

I primi lavori di acidificazione legati al vino che impiegano *L. thermotolerans* si sono svolti nei paesi mediterranei come Grecia e Italia, dove diverse regioni viticole soffrono del cambiamento climatico (Benito, 2018a; Vicente et al., 2021b). Gli studi si sono concentrati anche su varietà a maturazione precoce. Successivamente, la Spagna ha applicato *L. thermotolerans* nei vitigni precoci spagnoli come il Tempranillo (Benito et al., 2015), con rischio di maturazione eccessiva nelle zone geografiche calde, o nei vitigni considerati neutri a causa della loro elevata produttività caratterizzata da bassa acidità ed elevate concentrazioni di zucchero, come il vitigno più coltivato Airen (Benito et al., 2016b).

La letteratura scientifica generalmente descrive i vini di *L. thermotolerans* come migliori dal punto di vista sensoriale rispetto ai controlli di *S. cerevisiae*, principalmente a causa di un migliore equilibrio tra acidità e altre proprietà gustative (Vicente et al., 2022).

Le acidificazioni ottenute e le riduzioni del pH legate all'uso di *L. thermotolerans* rappresentano una seria alternativa ad altre tecnologie di acidificazione come la riduzione degli ioni di potassio, l'aggiunta di acido sintetizzato o la raccolta anticipata.

L. thermotolerans è diventato il lievito non-*Saccharomyces* più popolare nelle aree viticole che soffrono di mancanza di acidità ed oggi sono disponibili sul mercato sette ceppi commerciali, il primo dei quali è apparso nel 2013.

Gallo e colleghi nel 2023 hanno valutato per la prima volta l'uso di *L. thermotolerans* nella produzione di Vino Santo di Gambellara, un vino dolce tradizionale prodotto nella regione del Veneto. *L. thermotolerans* è stata utilizzata in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae*, quest'ultimo inoculato dopo 5 giorni.

Sono due i caratteri di *L. thermotolerans* che destano interesse soprattutto nella produzione dei vini passiti. Il principale è la produzione di acido lattico, con la conseguente acidificazione che influisce positivamente sulla stabilità microbiologica del vino e sull'equilibrio organolettico, evitando alterazioni o acidificazioni esogene per compensare la carenza di acidità fissa persa durante l'appassimento in fruttai. Un'altra caratteristica delle uve sottoposte ad appassimento è l'eccessivo contenuto di zucchero, che porta a concentrazioni di etanolo elevate e alla massiccia produzione di sottoprodotti fermentativi, come l'acido acetico, sintomo di stress osmotico per i comuni lieviti enologici.

Dai risultati di questo studio è emerso che l'inoculo precoce con *L. thermotolerans* ha garantito la riduzione dell'acidità e del pH, infatti i vini prodotti hanno mostrato un contenuto

più elevato di acido lattico che ha portato a un pH di 3,30 (Tabella 2), inferiore al valore 3,50 che generalmente è riconosciuto come critico per la stabilità microbiologica del vino. Inoltre, la fermentazione sequenziale di *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* ha avuto un impatto positivo sugli altri parametri: i vini avevano un contenuto alcolico più moderato (12,54% v/v) e un'acidità volatile inferiore (1,65 g/L).

	SC	LTNM
EtOH (% vol)	15.85±0.15 ^a	12.54±0.39 ^b
pH	3.51±0.02 ^a	3.30±0.01 ^b
Titrate acidity (g L ⁻¹ of tartaric acid)	7.00±0.00 ^b	8.87±0.15 ^a
Volatile acidity (g L ⁻¹ of acetic acid)	1.80±0.03 ^a	1.65±0.01 ^b
Reducing sugars (g L ⁻¹)	150.23±3.65 ^b	195.53±5.73 ^a
Lactic acid (g L ⁻¹)	0.01±0.00 ^b	2.51±0.24 ^a
Malic acid (g L ⁻¹)	0.61±0.01 ^a	0.54±0.03 ^b

Tabella 2. Principali parametri chimici del Vino Santo ottenuti con l'uso di *L. thermotolerans* (LTNM) e *S. cerevisiae* (SC) I dati sono riportati come media dei valori ± deviazione standard (n=3). Diverse lettere in apice indicano dati statisticamente diversi (test ANOVA e Tukey's HSD $\alpha = 5\%$).

Inoltre, nel profilo volatile dei vini è stato osservato che *L. thermotolerans* ha prodotto una maggiore concentrazione di esteri acetici rispetto a *S. cerevisiae*. L'etil lattato, che conferisce al vino note burrose e fruttate, era l'estere predominante nei vini fermentati da *L. thermotolerans*, probabilmente a causa dell'alta disponibilità di acido lattico come suo precursore. Le concentrazioni, anche se importanti, non hanno raggiunto la soglia di percezione (146 mg/L).

L. thermotolerans ha mostrato quindi un potenziale promettente nel ripristinare un adeguato profilo acido nei vini ottenuti da uve appassite, conferendo anche un carattere peculiare grazie alla sintesi di specifici metaboliti volatili.

3.3 *Starmerella bacillaris*

Starmerella bacillaris potrebbe contribuire alla degradazione dell'acido malico grazie alla sua capacità di produrre un ampio spettro di enzimi idrolitici extracellulari.

S. bacillaris è un importante produttore di acido piruvico in condizioni anaerobiche grazie alla sua preferenza per la via glicero-piruvica. Alcuni ceppi di *S. bacillaris* producono circa 100 mg/L di acido piruvico, mentre i controlli di *S. cerevisiae* producono solo circa 20 mg/L,

il che suggerisce che in ambienti con ossigeno limitato *S. bacillaris* può formare diversi acidi organici tramite il ciclo TCA.

In un lavoro di Englezos e colleghi (2018) sono stati usati quattro mosti di uva bianca (Chardonnay, Muscat, Riesling and Sauvignon blanc) per testare l'effetto dell'inoculo sequenziale di *S. bacillaris* e *S. cerevisiae*. Sono stati utilizzati i lieviti *S. bacillaris* FC54 e *S. cerevisiae* Uvaferm BC. Nell'inoculo sequenziale *S. cerevisiae* è stato inoculato 48 ore dopo *S. bacillaris*, e *S. cerevisiae* è stato inoculato anche da solo come controllo.

Le fermentazioni con *S. bacillaris* + *S. cerevisiae* hanno mostrato un aumento dell'acidità totale finale maggiore rispetto al controllo con solo *S. cerevisiae* (Tabella 3).

Grape variety	Inoculation protocol	Residual sugars (g/L)	Malic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Succinic acid (g/L)	Glycerol (g/L)	Ethanol (% v/v)	Y (gly/sugar) (g/g)	Y (eth/sugar) (g/g)	pH	TA (g/L)
Chardonnay	Prior inoculation	246.0 ± 2.6	2.55 ± 0.03	< 0.1	0.06 ± 0.01	< 0.1	< 0.1	-	-	3.99 ± 0.01	4.33 ± 0.02
	Pure	0.4 ± 0.2	1.55 ± 0.03	0.29 ± 0.10	1.27 ± 0.08	8.4 ± 0.1	14.9 ± 0.1	0.034 ± 0.001	0.061 ± 0.001	3.26 ± 0.27	5.84 ± 0.11
	Mixed	0.5 ± 0.1	1.88 ± 0.01	0.28 ± 0.01	1.29 ± 0.02	10.3 ± 0.1	14.7 ± 0.1	0.042 ± 0.001	0.06 ± 0.001	3.35 ± 0.06	6.92 ± 0.06
Sign.	NS	***	NS	NS	***	*	***	*	NS	***	***
Muscat	Prior inoculation	244.0 ± 1.2	1.28 ± 0.03	< 0.1	0.05 ± 0.01	< 0.1	< 0.1	-	-	3.81 ± 0.03	3.15 ± 0.04
	Pure	0.5 ± 0.1	0.83 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.94 ± 0.01	7.8 ± 0.1	14.8 ± 0.1	0.032 ± 0.001	0.061 ± 0.001	3.22 ± 0.14	6.69 ± 0.04
	Mixed	0.7 ± 0.1	0.94 ± 0.01	0.27 ± 0.01	1.14 ± 0.01	9.3 ± 0.1	14.6 ± 0.1	0.038 ± 0.002	0.06 ± 0.02	3.24 ± 0.11	7.16 ± 0.04
Sign.	NS	***	***	***	***	*	***	*	NS	***	***
Riesling	Prior inoculation	245.9 ± 1.1	2.26 ± 0.01	< 0.1	0.04 ± 0.01	< 0.1	< 0.1	-	-	3.82 ± 0.01	4.35 ± 0.06
	Pure	0.4 ± 0.1	1.44 ± 0.02	0.36 ± 0.03	1.13 ± 0.03	8.6 ± 0.1	14.7 ± 0.1	0.035 ± 0.001	0.06 ± 0.001	3.35 ± 0.08	5.67 ± 0.06
	Mixed	0.9 ± 0.1	1.60 ± 0.01	0.32 ± 0.01	1.21 ± 0.01	10.3 ± 0.1	14.6 ± 0.1	0.042 ± 0.001	0.06 ± 0.001	3.34 ± 0.03	6.27 ± 0.05
Sign.	***	***	NS	**	***	*	***	NS	NS	***	***
Sauvignon blanc	Prior inoculation	245.7 ± 0.6	1.23 ± 0.01	< 0.1	0.03 ± 0.01	< 0.1	< 0.1	-	-	3.56 ± 0.02	6.51 ± 0.04
	Pure	0.7 ± 0.1	0.81 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.92 ± 0.01	8.3 ± 0.1	14.9 ± 0.1	0.034 ± 0.001	0.061 ± 0.001	3.09 ± 0.07	7.08 ± 0.01
	Mixed	1.1 ± 0.1	0.86 ± 0.01	0.33 ± 0.01	1.02 ± 0.06	9.8 ± 0.1	14.7 ± 0.1	0.04 ± 0.002	0.06 ± 0.002	3.15 ± 0.03	8.11 ± 0.02
Sign.	***	**	***	*	***	***	***	***	NS	***	***

The values are mean ± standard deviation of three independent experiments. Sign.: *, **, *** and NS indicate significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and not significant, respectively. TA: titratable acidity expressed as tartaric acid, Y (gly/sugar consumption): glycerol yield and Y (eth/sugar consumption): ethanol yield.

Tabella 3. Parametri chimici dei mosti e dei vini prodotti da fermentazioni in coltura pura e mista.

Il vino Chardonnay ha mostrato un'acidità totale finale di 6,3 g/L nella fermentazione con solo *S. cerevisiae*, mentre nella fermentazione sequenziale misurava 7,1 g/L. Gli altri esperimenti hanno mostrato risultati simili, con le fermentazioni sequenziali che hanno mostrato acidità totale più elevate da 0,5 g/L a 1,1 g/L. La formazione primaria di acidi organici (tartarico, malico, lattico, citrico e succinico) non può spiegare l'aumento dell'acidità, ma altri acidi come l' α -chetoglutarico o l'acido piruvico devono contribuire all'aumento. Inoltre, il consumo di acido malico è stato relativamente inferiore nella fermentazione sequenziale con 0,5 g/L rispetto ai 0,7 g/L di consumo osservato nella fermentazione con solo *S. cerevisiae* (corrispondente a una riduzione del contenuto di acido malico del 28% e del 36%, rispettivamente). Inoltre, la fermentazione mista ha comportato concentrazioni più elevate di esteri e tioli, migliorando l'aroma del vino nei campioni di Sauvignon blanc.

A causa della riduzione del pH, *S. bacillaris* potrebbe anche influenzare il colore del vino, e l'acido piruvico potrebbe combinarsi con gli antociani, formando la Vitisina A, un pigmento colorato molto stabile. *S. bacillaris* è anche un basso produttore di acido acetico, e il co-

inoculo con *S. cerevisiae* ha portato a una diminuzione di 0,3 g/L di acido acetico rispetto a un controllo di *S. cerevisiae* puro (Vicente et al., 2022).

L'uso di fermentazioni miste con *S. bacillaris* e *S. cerevisiae* potrebbe essere un metodo biologico per ridurre l'acido acetico nei vini dolci.

3.4 *Candida stellata*

Una caratteristica interessante di *Candida stellata* è la sua capacità di formare acido succinico.

Ciani e Ferraro (1996) hanno scoperto che ceppi di *C. stellata* producono più acido succinico rispetto a ceppi di controllo di *Saccharomyces* in mosto sintetico. La maggiore produzione di questo acido è stata anche associata a livelli più alti di glicerolo, a una alta produzione di etanolo e una buona tolleranza all'etanolo.

Nel loro lavoro hanno utilizzato i ceppi di *C. stellata* 3827 e di *S. cerevisiae* 6663, selezionati per la vinificazione, provenienti dalla Collezione di Lieviti Industriali del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Perugia (DBVPG). Il mosto d'uva (varietà Pinot grigio, con zucchero al 18,5% (p/v) e pH 3,10) è stato portato a una concentrazione di zucchero del 27% (p/v) mediante l'aggiunta di saccarosio e sterilizzato.

I ceppi di *C. stellata* e di *S. cerevisiae* sono stati inoculati sia in singolo, sia in co-inoculo, effettuando un inoculo sequenziale (*S. cerevisiae* 3 giorni dopo *C. stellata*) o simultaneo.

C. stellata ha prodotto acido succinico fino a 1,83 g/L, mentre il controllo *S. cerevisiae* ha mostrato un massimo di 0,45 g/L (Tabella 4). La fermentazione sequenziale si è conclusa con una concentrazione finale di 1,10 g/L di acido succinico.

	Acetic acid (g l ⁻¹)	Succinic acid (g l ⁻¹)	Acetaldehyde (mg l ⁻¹)	Ethyl acetate (mg l ⁻¹)	Acetoin (mg l ⁻¹)	Higher alcohols (mg l ⁻¹)	Isoamyl acetate (μg l ⁻¹)	Ethyl caproate (μg l ⁻¹)	Ethyl caprylate (μg l ⁻¹)	Ethyl caprate (μg l ⁻¹)	2-Phenyl ethanol (μg l ⁻¹)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> control strain	0.45	0.45	38.4	73.8	9.2	350.5	1116	188	87	87	5905
<i>Candida stellata</i> immobilized cells	0.20	1.83	130.8	22.3	60.3	69.8	30	10	0	108	3222
Simultaneous fermentation	0.27	0.29	24.4	84.8	16.3	393.9	1110	170	75	82	4250
Sequential fermentation (after 3 days)	0.20	1.10	22.2	73.0	9.9	250.3	3052	403	288	84	3265
Partial fermentation (3 days)	0.15	0.73	24.9	59.6	11.3	289.3	1109	261	162	45	3671

Tabella 4. Parametri chimici dei vini ottenuti.

L'acido succinico potrebbe influenzare positivamente il profilo sensoriale e la sensazione in bocca dei vini con acidità insufficiente. Tuttavia, a causa del suo gusto "salato-amaro-acido", livelli eccessivi potrebbero influenzare negativamente la qualità del vino.

4. Microrganismi disacidificanti

Il cambiamento climatico ha portato alla produzione di mosti d'uva che in alcune regioni viticole hanno concentrazioni di acido malico molto basse, vicine a 0,5 g/L, mentre nelle regioni atlantiche possono avere concentrazioni finali fino a 7 g/L.

La moderna vinificazione basa la gestione microbiologica dell'acidità del vino sulla disacidificazione per migliorare la percezione sensoriale dei vini provenienti dalle aree atlantiche o per raggiungere la stabilità microbica nei vini rossi prima dell'imbottigliamento.

Le principali strategie di disacidificazione microbiologica si concentrano sul metabolismo dell'acido malico.

La maggior parte dei vini rossi effettua la stabilizzazione dell'acido malico prima dell'imbottigliamento per evitare rifermentazioni indesiderate durante la fase di commercializzazione. L'opzione più popolare per stabilizzare il vino rosso da un punto di vista microbiologico è la fermentazione malolattica con l'uso di *Oenococcus oeni*, un batterio lattico che metabolizza l'acido malico in CO₂ e acido lattico. Tuttavia, bisogna tenere in considerazione un aspetto importante: la disacidificazione biologica influisce solo sulla porzione di acido malico, non riduce l'acido tartarico.

Negli ultimi anni, l'enologia ha sviluppato altre opzioni, come l'utilizzo di altri batteri lattici, come il *Lactiplantibacillus plantarum*, o il lievito *S. pombe*.

Nella Tabella 5 sono riportate le principali strategie biologiche per diminuire l'acidità del vino.

	Principle	De-acidification effect	Advantages	Disadvantages	Price
<i>Oenococcus oeni</i> Malic acid metabolism	MA ↓	MA 1 g/L ↓ → TA 0.3 g/L ↓ → pH 0.03 ↓	Classical secondary fermentation.	Sensitivity to high ethanol and sulfur concentrations and low temperatures.	Commercial dry bacteria 60-90 €/kg
	Microbial metabolism		Wine microbial stability.		
	Malolactic Fermentation		Esters↑, terpenes↑, haze↓, acetaldehyde↓, SO ₂ ↓	Biogenic amines, ethyl carbamate, color intensity losses.	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Malic acid metabolism	MA ↓	MA 1 g/L ↓ → TA 1.12 g/L ↓ → pH 0.11 ↓	Fast wine microbial stability.	For not selected strains: Acetic acid ↑, sulfidric acid ↑, acetaldehyde ↑	Commercial liquid yeast 90 €/kg
	Microbial metabolism		Color intensity ↑, Biogenic amines ↓, Ethyl carbamate ↓, Higher alcohols ↓, Polysaccharides ↑		
	Maloethanolic fermentation				
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Malic acid metabolism	MA ↓	MA 1 g/L ↓ → TA 0.3 g/L ↓ → pH 0.03 ↓	Fast wine microbial stability.	Sensitivity to high ethanol and sulfur concentrations.	Commercial liquid bacteria 100 €/kg
	Microbial metabolism		Homofermentative character, Color intensity ↑, Esters↑, thiols↑, acetic acid↓, biogenic amines ↓	Limited de-acidification activity.	
	Malolactic Fermentation			Better performance at high pH Possible incompatibilities Ethyl carbamate Ethyl phenols ↑	

MA: Malic acid, TA: Total Acidity,

↑: Increase, ↓: Decrease, n.d: No data available.

The range of the prices of microorganisms is the one the main Spanish marketers offer in 2022 (Agrovin, Spain; Lallemand, Canada; Hansen, Denmark; Bioenologia, Italy).

Tabella 5. Sintesi delle principali strategie di disacidificazione biologica studiate per la vinificazione.

4.1 Batteri lattici

I batteri lattici svolgono un ruolo significativo nella fermentazione del vino, pur non essendo lieviti. Durante la fermentazione alcolica, i ceppi di lievito convertono gli zuccheri dell'uva in etanolo e altri composti aromatici, e dopo l'esaurimento degli zuccheri e il calo della popolazione di lieviti, i batteri lattici proliferano utilizzando la fermentazione malolattica. Quest'ultima è una reazione enzimatica in cui l'acido malico viene decarbossilato in acido lattico e CO₂. Questo processo riduce anche la potenziale fonte di carbonio per i microrganismi deterioranti e porta alla stabilizzazione microbica del vino. L'eliminazione dell'acido malico è fondamentale perché diminuisce il rischio di rifermentazione in bottiglia e di torbidità nei vini rossi.

Sebbene la fermentazione malolattica sia un processo necessario prima dell'imbottigliamento dei vini rossi, in alcune occasioni può influenzare negativamente l'intensità del colore, l'acidità volatile, le ammine biogene, il carbammato di etile e le proprietà sensoriali.

I batteri lattici più utilizzati per la fermentazione malolattica sono *O. oeni* e *L. plantarum*. Tuttavia, per effetto della fermentazione alcolica ad opera dei lieviti, il vino in cui si trovano a svilupparsi è caratterizzato da pH basso, dalla presenza di anidride solforosa, dall'alto contenuto di etanolo, da composti fenolici e dal basso contenuto di nutrienti. Questi batteri sono molto sensibili a tutti questi fattori, che possono quindi inibire la crescita dei batteri lattici e la loro cinetica di fermentazione.

Per superare queste problematiche si stanno studiando ceppi di lievito non-*Saccharomyces* in grado di effettuare la fermentazione alcolica e di creare condizioni più favorevoli per lo sviluppo dei batteri lattici e per lo svolgimento della fermentazione malolattica.

4.1.1 Effetto di lieviti non-*Saccharomyces* sullo sviluppo dei batteri lattici

L' inoculazione sequenziale dei lieviti non-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae* può produrre vini con minor contenuto di etanolo, una maggiore concentrazione di mannoproteine, una minore produzione di acido acetico e di anidride solforosa e aumentare il pH, con effetti positivi sull'adattamento dei batteri lattici alle difficili condizioni del vino.

4.1.1.1 *Torulaspora delbrueckii*

In un lavoro di Balmaseda e colleghi (2021) il ceppo commerciale di *T. delbrueckii* Biodiva prodotto da Lallemand (Lallemand Inc., Montreal, Canada) è stato testato in inoculo sequenziale con il ceppo commerciale di *S. cerevisiae* QA23 prodotto da Lallemand (Lallemand Inc., Montreal, Canada). *T. delbrueckii* è stato scelto perché studi precedenti mostravano un consumo inferiore di acido L-malico, una produzione di SO₂ inferiore e una maggiore produzione di mannoproteine da parte di alcuni ceppi, suggerendo che potesse stimolare la performance della fermentazione malolattica in condizioni enologiche difficili.

Le fermentazioni sono state condotte con varietà di uva bianca Macabeo e rossa Cabernet Sauvignon durante la vendemmia 2018. Le fermentazioni alcoliche sono state effettuate inoculando *S. cerevisiae* 48 ore dopo *T. delbrueckii*. *S. cerevisiae* è stato inoculato anche da solo come controllo.

La fermentazione alcolica è stata considerata terminata quando la concentrazione di zucchero era inferiore a 2 g/L. Le fermentazioni del Macabeo sono state condotte a 18 °C e quelle del Cabernet Sauvignon a 22 °C.

I vini sono stati addizionati di acido L-malico per raggiungere una concentrazione di 2 g/L. Successivamente, il pH è stato corretto al valore precedente l'aggiunta di acido L-malico. I vini aggiustati sono stati inoculati con due ceppi di *O. oeni*, ed è stata anche effettuata una fermentazione malolattica spontanea.

Nel caso del vino Macabeo la produzione di acido acetico alla fine della fermentazione alcolica nei vini con *T. delbrueckii* era significativamente inferiore rispetto ai vini con solo *S. cerevisiae*, e non è stato trovato acido citrico. Durante la fermentazione malolattica i batteri lattici possono metabolizzare l'acido citrico, aumentando l'acidità volatile; non essendo presente questo acido nei vini con *T. delbrueckii*, in questi vini sono state registrate le concentrazioni più basse di acido acetico.

In questo studio non è stata osservata una diminuzione del contenuto di alcol associata a *T. delbrueckii*. Dopo la fermentazione malolattica il pH è aumentato come previsto a causa della decarbossilazione dell'acido L-malico, anche se nei vini con *T. delbrueckii* è aumentato di meno rispetto a *S. cerevisiae*. Questo pH inferiore potrebbe essere dovuto al fatto che alcuni composti acidi organici non sono stati inclusi nell'analisi eseguita.

L'anidride solforosa totale è diminuita nei vini con *T. delbrueckii* dopo la fermentazione alcolica. In ogni caso, il contenuto totale di SO₂, sempre inferiore a 10 mg/L, era molto più basso del limite di tolleranza per alcuni ceppi di *O. oeni*.

Nel caso dei vini Cabernet Sauvignon l'acido citrico era presente in concentrazioni simili alla fine della fermentazione alcolica, e veniva consumato in tutti i casi durante la fermentazione malolattica. Di conseguenza, la concentrazione di acido acetico aumentava in quantità simili in tutti i vini a causa del metabolismo di *O. oeni*.

L'anidride solforosa totale alla fine della fermentazione alcolica era significativamente inferiore nei vini con *T. delbrueckii*, e comunque inferiore a 10 mg/L, come nei vini Macabeo. L'uso di *T. delbrueckii* ha portato alla fermentazione malolattica più veloce nei vini Macabeo e alla massima diversità dei ceppi di *O. oeni* nei vini Cabernet Sauvignon.

Inoltre, l'uso di *T. delbrueckii* ha portato a concentrazioni più basse di SO₂ e di acidi grassi a catena media alla fine della fermentazione alcolica, offrendo condizioni più favorevoli per la fermentazione malolattica rispetto a *S. cerevisiae* da solo. Complessivamente, l'impronta metabolica di *T. delbrueckii* nel vino sembra promuovere lo sviluppo di *O. oeni* e migliorare le prestazioni della fermentazione malolattica.

4.1.1.2 *Hanseniaspora*

In un lavoro del 2020 di Ferrando e colleghi è stato valutato l'effetto sulla fermentazione malolattica di due ceppi di *Hanseniaspora uvarum*, 13130 e 10389, e due ceppi di *Hanseniaspora vineae*, T02/5AF e 1471, utilizzati per la fermentazione alcolica in inoculo sequenziale con il ceppo commerciale di *S. cerevisiae* QA23 (inoculato dopo 24 ore). Quest'ultimo è stato inoculato anche da solo come controllo.

Nei vini con *H. uvarum* 13130 la fermentazione malolattica non è stata completata. Questo è stato associato a un rapido calo della popolazione di *O. oeni* dopo l'inoculo, mentre negli altri casi era alta fino alla fine della fermentazione. Questo ceppo aveva prodotto quasi 150 mg/L di SO₂ totale, e questa concentrazione ha inibito la vitalità e la capacità fermentativa dei ceppi *O. oeni*. Anche le proteine totali alla fine della fermentazione alcolica erano significativamente più basse nei vini con *H. uvarum*, di conseguenza c'era meno azoto disponibile per *O. oeni*, e questo essere un altro fattore che spiega le difficoltà osservate nell'evoluzione della fermentazione malolattica.

H. uvarum 13130 ha prodotto anche elevate quantità di acido succinico, che è stato descritto come un possibile inibitore competitivo della fermentazione malolattica.

I vini inoculati con tutti i ceppi testati di *H. vineae* e *H. uvarum* 13130 hanno mostrato una significativa diminuzione dell'acido L-malico alla fine della fermentazione alcolica rispetto alla condizione di controllo.

4.2 *Schizosaccharomyces*

Diverse specie di *non-Saccharomyces* possiedono la capacità di degradare l'acido malico di circa il 20%. Tuttavia, solo il genere *Schizosaccharomyces* può consumare tutto l'acido malico iniziale. Uno degli obiettivi primari dell'utilizzo di specie appartenenti al genere *Schizosaccharomyces* è quello di ottenere una stabilizzazione microbiologica, dal punto di vista dell'acido malico, che eviti possibili rifermentazioni indesiderate dopo l'imbottigliamento del vino.

4.2.1 *Schizosaccharomyces pombe*

I lieviti appartenenti alla specie *S. pombe* ormai da diversi anni sono proposti in vinificazione in quanto capaci di trasformare l'acido malico in etanolo e CO₂ attraverso la fermentazione malo-alcolica. La fermentazione maloalcolica abbassa molto di più l'acidità rispetto alla fermentazione malolattica.

Questo metabolismo consente la disacidificazione biologica dei mosti, che occasionalmente presentano un'eccessiva acidità a causa della mancata maturazione dell'uva.

Molti studi descrivono *S. pombe* e altri lieviti dello stesso genere come capaci di consumare interamente l'acido malico in mosti con un alto contenuto di acido malico superiore a 5 g/L. È stato misurato un aumento del pH superiore a 0,4 unità in un mosto di Riesling con una concentrazione iniziale di acido malico vicina a 5 g/L e inferiore a 0,1 unità di pH in mosti con un contenuto iniziale di acido malico inferiore a 0,5 g/L della varietà di uva Garnacha (Vicente et al., 2022). Il consumo di acido malico avviene poco dopo l'inoculazione di *S. pombe* nel mosto durante la fermentazione alcolica.

Nel metabolismo di *S. pombe* (Figura 8) l'acido malico viene decarbossilato in acido piruvico, che segue il percorso della fermentazione alcolica, venendo decarbossilato ad acetaldeide e successivamente ridotto ad etanolo.

Sebbene le specie *Schizosaccharomyces* possiedano molte proprietà che possono migliorare la qualità del vino, sono stati segnalati anche alcuni svantaggi, tra cui la tendenza della maggior parte dei ceppi della specie e del genere a produrre elevate concentrazioni di acido acetico, probabilmente dovute ad una cinetica di fermentazione molto lenta.

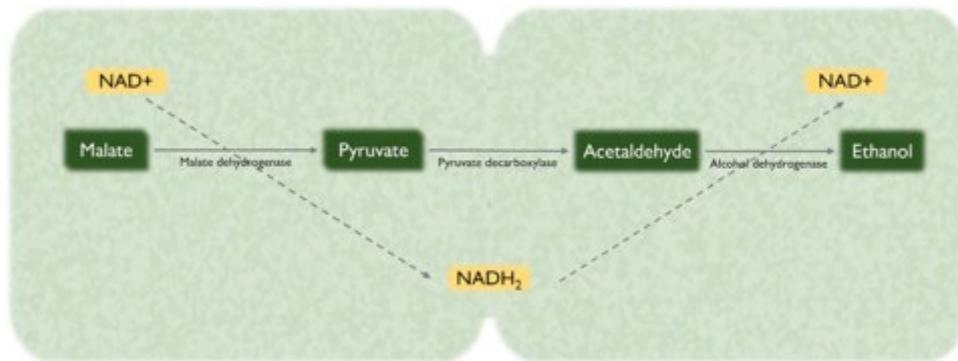


Figura 8. Processo di fermentazione malo-alcolica da parte di *S. pombe*

Recentemente, l'uso di *S. pombe* per demalicare il mosto è stato suggerito in aree viticole calde dove i mosti contengono alti livelli di zucchero, valori di pH vicini a 4 e concentrazioni di acido malico solitamente inferiori a 1 g/L. In queste circostanze, la fermentazione malolattica può risultare dannosa, con un alto rischio di produrre livelli indesiderati di acidità volatile o ammine biogene. In questi scenari, l'uso di *S. pombe* da solo o in piccole percentuali in inoculi combinati con *S. cerevisiae* consente di ottenere stabilità microbiologica, in modo che il vino possa essere imbottigliato senza il rischio di rifermentazione in bottiglia.

S. pombe è stato anche utilizzato per rimuovere parzialmente l'acido gluconico durante la fermentazione alcolica, con una percentuale di rimozione fino al 91%. L'acido gluconico può influenzare negativamente la qualità del vino, generando instabilità microbiologica, poiché può essere utilizzato dai batteri dell'acido lattico per aumentare l'acidità volatile, riducendo l'effetto protettivo dell'anidride solforosa. Tuttavia, i vini prodotti contenevano molta più acetaldeide e aromi responsabili dei caratteri ossidati dei vini Sherry, rispetto ai vini non trattati. Questo uso di *S. pombe* è stato anche associato a un'aumentata produzione di sapori indesiderati in questi vini (Jolly et al., 2014).

4.2.2 *Schizosaccharomyces japonicus*

Fino ad oggi i lieviti appartenenti alla specie *Schizosaccharomyces japonicus* non sono mai stati utilizzati in vinificazione nonostante la loro interessante capacità di rilascio di un elevato quantitativo di polisaccaridi durante la fermentazione alcolica.

La capacità di metabolizzare l'acido malico, tipica dei lieviti appartenenti alla specie *S. pombe*, è stata confermata anche per il ceppo UCD2489 appartenente alla specie *S.*

japonicus. In particolare, il ceppo *S. japonicus* in coltura pura, sia nella forma libera sia in quella immobilizzata, già al terzo giorno di fermentazione è riuscito a metabolizzare rispettivamente il 52% e il 59% dell'acido malico iniziale (2,85 g/L).

5. Combinazione di microrganismi acidificanti e disacidificanti

Le nuove tendenze enologiche iniziano a combinare microrganismi in grado di acidificare con microrganismi in grado di disacidificare, consentendo di raggiungere la stabilità microbica dal punto di vista dell'acido malico subito dopo la fermentazione alcolica (Vicente et al., 2022). Gli studi riguardo queste tecniche enologiche si sono concentrati sulle zone viticole calde, dove le concentrazioni di acido malico sono particolarmente basse a causa dell'elevata maturità delle uve.

Nella Tabella 6 sono riportati i risultati di due studi di Kapsopoulou e colleghi (2007) e di Hranilovic e colleghi (2021), nei quali sono stati testati ceppi di *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* in inoculo sequenziale e in co-inoculo. Nel lavoro del 2007 i ceppi di *L. thermotolerans* TH941 e *S. cerevisiae* SCM952 sono stati testati sia in inoculo simultaneo, sia in inoculo sequenziale in tre tempi diversi: *S. cerevisiae* infatti è stato inoculato dopo 24, 48 o 72 ore dall'inoculo di *L. thermotolerans*. Nel lavoro del 2021 5 ceppi di *L. thermotolerans* e un ceppo di *S. cerevisiae* sono stati testati sia in inoculo simultaneo, sia in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae* inoculato dopo 48 ore dall'inoculo di *L. thermotolerans*.

L'inoculo sequenziale utilizzando *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* è risultato in entrambi i casi più efficiente del coinoculo per quanto riguarda la produzione di acido lattico ed è la modalità con la quale si ottengono i migliori risultati, soprattutto quando l'inoculo di *S. cerevisiae* viene fatto più tardivamente, lasciando a *L. thermotolerans* la possibilità di fermentare in purezza per un periodo più lungo senza competizione. L'effetto si può osservare anche nell'acidità totale, che è sempre maggiore nel caso dell'inoculo sequenziale, e del pH.

	Mosto	<i>S. cerevisiae</i>	SC + LT	SC...LT	<i>L. thermotolerans</i>	FONTE
Acido lattico (g/L)	n.d.	0,032	0,18	1,8 24h 4,20 48h 5,13 72h	n.d.	<u>Kapsopoulou et al., 2007</u>
Acidità totale (g/L)	7,4	7,50	8,10	9.44 24 h 11.84 48 h 12.60 72 h	n.d.	
pH	3,5	3,43	3,46	3.37 24 h 3.26 48 h 3.20 72 h	n.d.	

Acido lattico (g/L)	n.d.	0,4	0.6–5	1–8.1	n.d.	<u>Hranilovic et al.,</u> <u>2021</u>
Acidità totale (g/L)	n.d.	5	5.2–8.9	5.1–11.1	n.d.	
pH	3,9	3,86	3.49–3.85	3.36–3.58	n.d.	

Tabella 6. Riepilogo dell'effetto sull'acidità del vino delle fermentazioni sequenziali con *L. thermotolerans* (LT) e *S. cerevisiae* (SC) per diversi studi.

I vinificatori cercano strategie per evitare di effettuare fermentazioni malolattiche in vini con un contenuto alcolico superiore al 15% (v/v), che generalmente comportano tempi lunghi di fermentazione, hanno un pH superiore a 4 e zuccheri residui. In queste situazioni, le fermentazioni malolattiche con *O. oeni* possono rovinare la qualità finale del vino a causa dell'alto contenuto finale di acido acetico, diacetile e ammine biogeniche.

Per questo motivo, i vinificatori iniziano a utilizzare *L. plantarum* o *S. pombe* per stabilizzare il vino durante la fermentazione alcolica, eliminando le piccole quantità di acido malico per ottenere la stabilizzazione dell'acido malico, ma riducono ulteriormente la bassa acidità. Per questo motivo, *L. thermotolerans* compensa la perdita di acidità generando acido lattico in inoculi combinati.

L'utilizzo di *S. pombe* negli inoculi sequenziali permette di produrre vini stabili dal punto di vista microbiologico in tempi minori e di migliorare alcuni dei parametri di qualità come acido acetico, colore o contenuto di diacetile.

Le combinazioni con altri ceppi *non-Saccharomyces* come *Torulaspota delbrueckii* consentono di aggiungere ulteriori valori all'acidificazione, come il miglioramento dell'aroma. Il prodotto commerciale Melody™ (Hansen, Horsholm, Danimarca) combina *L. thermotolerans* con *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* (Vicente et al., 2021).

L. thermotolerans aumenta l'acidità, *T. delbrueckii* aumenta gli aromi di frutta tropicale e *S. cerevisiae* garantisce che la fermentazione alcolica venga completata correttamente.

Alcune strategie che combinano *L. thermotolerans* con *S. pombe* o *O. oeni* o *L. plantarum* sono riportate nella Tabella 7.

	Principle	De-acidification effect	Acidification effect	Advantages	Disadvantages	Price
<i>L. thermotolerans</i> × <i>S. pombe</i>	LA ↑ MA ↓ Combined microbial metabolism	Total removal of unstable malic acid	LA → 1.63–2.77 g/L ↑ pH → 0.2–0.3 ↓	Lactic acid stability Malic acid removal color intensity ↑, aroma ↑, acetic acid ↓, ethanol ↓	<i>L. thermotolerans</i> : ethanol and SO ₂ resistance. <i>S. pombe</i> strain must be selected.	Commercial <i>L. thermotolerans</i> : 500 g 40 to 90 \$ Commercial <i>S. pombe</i> : 1 L 90 €
<i>L. thermotolerans</i> × <i>O. oeni</i> × <i>S. cerevisiae</i>	Combined microbial metabolism	Total removal of unstable malic acid	LA → 2.91–11.1 g/L ↑ pH → 0.23–0.61 ↓	Lactic acid stability Malic acid removal	Heterofermentative sugar metabolism of <i>O. oeni</i> may increase acetic acid during long alcoholic fermentations.	Commercial <i>L. thermotolerans</i> : 500 g 40 to 90 \$ Commercial dry bacteria 60–90 €/kg
<i>L. thermotolerans</i> × <i>L. plantarum</i> × <i>S. cerevisiae</i>	Combined microbial metabolism	Total removal of unstable malic acid	LA → 2.88 g/L ↑ pH → 0.26 ↓	Lactic acid stability Malic acid removal color intensity ↑, aroma ↑, acetic acid ↓, ethanol ↓	Limited de-acidification activity of <i>L. plantarum</i> when malic acid concentration is high.	Commercial <i>L. thermotolerans</i> : 500 g 40 to 90 \$ Commercial liquid bacteria 100 €/kg

MA: Malic acid, LA: Lactic acid, ↑: Increase, ↓: Decrease.

Tabella 7. Riepilogo delle principali combinazioni studiate di acidificanti e disacidificanti biologici.

4.3.1 Combinazione di *L. thermotolerans* e *S. pombe*

La combinazione di *L. thermotolerans* con un altro potente lievito fermentativo, come *S. pombe*, consente di evitare la fermentazione malolattica in vini con elevate concentrazioni di etanolo e alti livelli di pH provenienti da zone viticole calde o prodotti da uve troppo mature. In questa combinazione, *L. thermotolerans* aumenta l'acidità, generando acido lattico, mentre *S. pombe* consuma l'acido malico instabile e termina la fermentazione alcolica (Benito, 2020). Il risultato è un vino stabilizzato dal punto di vista dell'acido malico e acidificato durante la fermentazione alcolica. Pertanto non è necessario che il vino subisca la fermentazione malolattica dopo la fermentazione alcolica.

Durante la fermentazione malolattica l'intensità del colore può diminuire, mentre l'uso combinato di *L. thermotolerans* e *S. pombe* permette il mantenimento del colore rosso in quanto il pH è abbassato per la produzione di acido lattico da parte di *L. thermotolerans*.

La presenza stessa dell'acido lattico inibisce la fermentazione malolattica, infatti livelli superiori a 6 g/L possono bloccare completamente la crescita dei batteri lattici (Snyder et al., 2021).

4.3.2 Combinazione di *L. thermotolerans*, *O. oeni* e *S. cerevisiae*

Questa combinazione di microrganismi si basa sull'utilizzo di *L. thermotolerans* per aumentare l'acidità, mentre *O. oeni* metabolizza l'acido malico in acido lattico durante l'inizio

della fermentazione alcolica (Urbina et al., 2021; Snyder et al., 2021). L'obiettivo principale di questa combinazione è ridurre le ore di produzione nella vinificazione aumentando l'acidità del vino. Lo svantaggio principale di questa combinazione è il carattere eterofermentativo di *O. oeni* che può consumare zucchero durante le lunghe fermentazioni alcoliche, aumentando la concentrazione finale in acido acetico e diacetile. Alcuni studi riportano un aumento significativo dell'intensità del colore finale di circa il 20% rispetto alla fermentazione sequenziale classica tra *S. cerevisiae* e *O. oeni* (Vicente et al., 2022)

4.3.3 Combinazione di *L. thermotolerans*, *L. plantarum* e *S. cerevisiae*

Questa nuova opzione alternativa si basa sull'uso di *L. thermotolerans* per aumentare l'acidità mentre *L. plantarum* metabolizza l'acido malico in acido lattico durante l'inizio della fermentazione alcolica (Urbina et al., 2021). È un'opzione interessante per mosti che soffrono di mancanza di acidità e contengono elevate concentrazioni iniziali di zucchero che possono provenire da fermentazioni alcoliche prolungate più di 21 giorni (Urbina et al., 2021).

L'obiettivo principale di questa combinazione è evitare il carattere eterofermentativo di *O. oeni*, che può consumare zucchero durante lunghe fermentazioni alcoliche di mosti ad alto contenuto di zucchero, con conseguente aumento dell'acidità volatile.

Questa combinazione richiede sempre un inoculo finale di un lievito ad alto potere fermentativo, come *S. cerevisiae*, per terminare la fermentazione alcolica, soprattutto nei vini con un'elevata concentrazione potenziale di etanolo.

Per quanto riguarda i composti aromatici, questo approccio produce vini con concentrazioni più elevate di lattato di etile, a causa della maggiore formazione di acido lattico e minori concentrazioni di diacetile (Vicente et al., 2022).

6. Conclusioni

Questo elaborato ha analizzato la bibliografia recente riguardo alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces*, come *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora*, *Starmerella bacillaris* e *Candida stellata*, ha evidenziato le potenzialità e le criticità del loro utilizzo nella modulazione dell'acidità dei vini.

L. thermotolerans, in grado di aumentare l'acido lattico di diversi grammi per litro e ridurre il pH di alcune unità decimali, è sicuramente l'opzione più interessante per acidificare i vini con acidità molto basse. Anche l'utilizzo di *S. bacillaris*, in grado di produrre acido α -chetoglutarico e acido piruvico, e *C. stellata*, capace di produrre concentrazioni significative di acido succinico, sono delle alternative interessanti.

In alternativa alla fermentazione malolattica, utilizzata per ridurre l'acidità in quanto i batteri lattici che la attuano sono in grado di metabolizzare l'acido malico in acido lattico, negli ultimi anni sono state proposte nuove strategie, come l'utilizzo di *S. pombe*, che può metabolizzare l'acido malico in etanolo.

Le nuove tendenze combinano microrganismi acidificanti e disacidificanti durante la fermentazione alcolica per correggere l'acidità e stabilizzare i vini dal punto di vista microbiologico subito dopo la fermentazione alcolica, ma sono necessari ulteriori studi volti ad approfondire le potenzialità di questo approccio.

In conclusione, molti lieviti non-*Saccharomyces* presentano proprietà enologiche interessanti in termini di purezza di fermentazione e produzione di metaboliti secondari o addirittura di etanolo. Se utilizzati in colture singole o miste con *S. cerevisiae*, questi ceppi di lievito possono modulare l'acidità del vino e aumentare la produzione di alcuni composti interessanti, come polisaccaridi, glicerolo e composti volatili. L'uso di questi lieviti non-*Saccharomyces* in vinificazione richiede però un'attenta gestione per evitare potenziali problemi, come sapori sgradevoli o deterioramento del vino.

Il controllo di alcuni parametri di fermentazione come la temperatura, la disponibilità di nutrienti e l'esposizione all'ossigeno è fondamentale per il successo della fermentazione con lieviti non-*Saccharomyces*.

L'utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* rappresenta sicuramente una via interessante per modulare l'acidità dei vini. Viste le prospettive interessanti per il loro utilizzo in rifermentazione, gli studi futuri dovranno approfondire le caratteristiche enologiche di questi lieviti per fornire nuovi dati da considerare nel controllo della fermentazione, con particolare

riguardo ai vini prodotti in regioni dai climi caldi e ai vini dolci bottrizzati, dove si trovano comunemente popolazioni miste.

Bibliografia

- Balmaseda, A., Rozès, N., Leal, M. Á., Bordons, A., & Reguant, C. (2021). Impact of changes in wine composition produced by non-*Saccharomyces* on malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108954.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2012). New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International journal of food science & technology*, 47(10), 2101-2108.
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., ... & Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241, 707-717.
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 6775-6790.
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). Mixed alcoholic fermentation of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* and its influence on mannose-containing polysaccharides wine Composition. *Amb Express*, 9, 1-8.
- Benito, S. (2019). The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(11), 4291-4312.
- Benito, S. (2020). Combined use of *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* in winemaking: A review. *Microorganisms*, 8(5), 655.
- Comuzzo, P., & Battistutta, F. (2019). Acidification and pH control in red wines. In *Red wine technology* (pp. 17-34). Academic Press.
- Capozzi, V., Tufariello, M., De Simone, N., Fragasso, M., & Grieco, F. (2021). Biodiversity of oenological lactic acid bacteria: Species-and strain-dependent plus/minus effects on wine quality and safety. *Fermentation*, 7(1), 24.
- Chidi, B. S., Rossouw, D., Buica, A. S., & Bauer, F. F. (2015). Determining the impact of industrial wine yeast strains on organic acid production under white and red wine-like fermentation conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 316-327.
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1, 1-6.

- Ciani, M., & Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of applied microbiology*, 85(2), 247-254.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food microbiology*, 43, 5-15.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Fracassetti, D., ... & Cocolin, L. (2018). Volatile profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food chemistry*, 257, 350-360.
- Fazio, N. A., Russo, N., Foti, P., Pino, A., Caggia, C., & Randazzo, C. L. (2023). Inside current winemaking challenges: Exploiting the potential of conventional and unconventional yeasts. *Microorganisms*, 11(5), 1338.
- Ferrando, N., Araque, I., Ortis, A., Thornes, G., Bautista-Gallego, J., Bordons, A., & Reguant, C. (2020). Evaluating the effect of using non-*Saccharomyces* on *Oenococcus oeni* and wine malolactic fermentation. *Food Research International*, 138, 109779.
- Gallo, A., Guzzon, R., Ongaro, M., Paolini, M., Nardin, T., Malacarne, M., ... & Larcher, R. (2023). Biological acidification of "Vino Santo di Gambellara" by mixed fermentation of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*: role of nitrogen in the evolution of fermentation and aroma profile. *OENO ONE*, 57(3), 205-217.
- Hranilovic, A., Albertin, W., Capone, D. L., Gallo, A., Grbin, P. R., Danner, L., ... & Jiranek, V. (2021). Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines. *Food chemistry*, 349, 129015.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast research*, 14(2), 215-237.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 735-739.
- Maicas, S., & Mateo, J. J. (2023). The life of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in drinking wine. *Microorganisms*, 11(5), 1178.

- Mendes Ferreira, A., & Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, 9(9), 1231.
- Qiu, S., Chen, K., Liu, C., Wang, Y., Chen, T., Yan, G., & Li, J. (2022). Non-*Saccharomyces* yeasts highly contribute to characterisation of flavour profiles in greengage fermentation. *Food Research International*, 157, 111391.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., ... & Cocolin, L. (2012). *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1987-1994.
- Snyder, E. C., Jiranek, V., & Hranilovic, A. (2021). Impact of *Lachancea thermotolerans* strain and lactic acid concentration on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation in wine. *OENO One*, 55(2), 365-380.
- Sumbly, K. M., Bartle, L., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2019). Measures to improve wine malolactic fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 2033-2051.
- Urbina, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2021). The combined use of *Lachancea thermotolerans* and *Lactiplantibacillus plantarum* (former *Lactobacillus plantarum*) in wine technology. *Foods*, 10(06), 1356.
- Varela, C., & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111-128.
- Vicente, J., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). An integrative view of the role of *Lachancea thermotolerans* in wine technology. *Foods*, 10(11), 2878.
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., ... & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726.
- Vilela, A. (2019). Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Fermentation*, 5(1), 27.
- Yéramian, N., Chaya, C., & Suárez Lepe, J. A. (2007). L-(-)-malic acid production by *Saccharomyces* spp. during the alcoholic fermentation of wine (1). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 912-919.