



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

LE FERMENTAZIONI SPONTANEE NELLA PRODUZIONE DI SIDRO

Relatrice

Prof.ssa Viviana Corich

Laureando

Alessandro Sandonà

Matricola n. 1230685

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Alla zia Laura.

INDICE

RIASSUNTO	7
1. DEFINIZIONE E STORIA.....	8
1.1 Definizione	8
1.2 Tipologie di sidro	8
1.3 Etimologia.....	9
1.4 Storia	9
1.5 Volumi e mercato del sidro	10
2. LE MELE UTILIZZATE PER LA PRODUZIONE DI SIDRO	11
2.1 Varietà	11
2.2 Composizione chimica delle mele	12
2.2.1 Carboidrati.....	13
2.2.2 Acidi organici	13
2.2.3 Composti azotati.....	13
2.2.4 Composti fenolici.....	14
2.2.5 Lipidi	14
2.2.6 Vitamine	14
2.2.7 Minerali	14
2.3 Comunità microbica presente sulla superficie delle mele	15
3. PROCESSO DI PRODUZIONE DEL SIDRO	17
3.1 Lavaggio delle mele	17
3.2 Blending.....	17
3.3 Macinazione	18
3.4 Pressatura.....	19
3.5 Solfitazione	21
3.6 Chiarifica prefermentativa.....	22
3.7 Fermentazione	23
3.8 Maturazione	25
3.9 Carbonatazione e rifermentazione in bottiglia	26
3.10 Pastorizzazione e microfiltrazione	26
4. LE FERMENTAZIONI CON COLTURE STARTER	28
4.1 La fermentazione alcolica guidata	28
4.2 La fermentazione malolattica guidata	31

5. LA FERMENTAZIONE ALCOLICA SPONTANEA	34
5.1 Fattori che influenzano il processo della fermentazione spontanea	34
5.2 Lieviti e diversità.....	36
5.3 Dinamica delle fermentazioni alcoliche spontanee	39
5.4 Prodotti metabolici durante la fermentazione alcolica spontanea del sidro	45
5.4.1 Consumo degli zuccheri e produzione di etanolo	45
5.4.2 Produzione di acidi organici, acidi grassi e cambiamenti del pH.....	46
5.4.3 Esteri di fermentazione	47
5.4.4 Alcol superiori.....	48
5.4.5 Glicerolo	49
5.4.6 Composti solforati	50
6. LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SPONTANEA	51
6.1 Batteri lattici e diversità	52
6.2 Dinamica delle fermentazioni malolattiche spontanee	53
6.3 Prodotti metabolici durante la fermentazione malolattica spontanea del sidro	56
6.3.1 Acido lattico e acido malico	56
6.3.2 Acido citrico.....	57
6.3.3 Esteri.....	57
6.3.4 Glicerolo	57
6.3.5 Consumo di acetaldeide	57
6.3.6 Diacetile, 2,3-butandiolo e acetoino.....	58
6.3.7 Esopolisaccaridi	58
CONCLUSIONE	59
BIBLIOGRAFIA.....	63

RIASSUNTO

Negli ultimi anni, la ricerca da parte dei consumatori di prodotti differenti e di qualità ha riportato all'attenzione del mercato le bevande alcoliche a fermentazione spontanea. In questo caso il processo di produzione dell'etanolo è a carico della comunità microbica naturalmente presente nella matrice vegetale oggetto della trasformazione. Non solo i vini naturali e le birre Lambic, ad oggi sono stati riscoperti anche i sidri tradizionali, produzioni tipiche di Spagna settentrionale, Francia occidentale, Repubblica d'Irlanda e Regno Unito.

Risulta dunque interessante analizzare quali lieviti e batteri siano coinvolti nelle fermentazioni spontanee del succo di mela, quali siano le differenze con i sidri presenti sul mercato e quali processi conducano all'ottenimento di determinati prodotti.

Nelle produzioni industriali, infatti, le fermentazioni alcoliche sono condotte da ceppi selezionati di *S. cerevisiae*, che offrono risultati costanti e permettono un buon controllo del processo, ma che producono una bevanda con minor complessità e diversità dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche, se paragonati alle produzioni tradizionali.

L'analisi della varietà di lieviti e batteri lattici autoctoni, ossia presenti naturalmente nel succo di mela, che concorrono alla fermentazione spontanea, permette, inoltre, di determinare quali specie di lieviti e batteri siano responsabili dei diversi composti aromatici, in modo da poterli eventualmente selezionare per un utilizzo mirato, con lo scopo di ottenere miglioramenti organolettici specifici. Tra i composti presi in considerazione, i più importanti sono gli acidi organici, gli esteri di fermentazione e gli alcol superiori: prodotti metabolici secondari che concorrono alla formazione del profilo aromatico dei sidri.

1. DEFINIZIONE E STORIA

1.1 Definizione

Il sidro è la bevanda alcolica ottenuta dalla fermentazione del succo di mela (Beech, 1972). Più precisamente, è definita come sidro di mele la bevanda alcolica ottenuta solo tramite la fermentazione completa o parziale di succo di mele fresche, succo ricostituito prodotto con succo concentrato di mele, oppure l'unione di succo di mele fresche e succo ricostituito da succo di mele concentrato. Il prodotto ha contenuto alcolico generalmente compreso tra 1,2% e 8,5% (v/v) e l'aggiunta di alcol distillato è proibita. Esistono sidri a ridotto contenuto di alcol, classificati come sidri analcolici (<0,5% v/v) o sidri a basso contenuto di alcol (tra 0,5% e 1,2% v/v). A partire dalla fine degli anni '80, alle produzioni tradizionali si affiancano le prime produzioni moderne: i sidri aromatizzati a base di succo di mela, con aggiunta di succhi di altri frutti, estratti, aromi, ecc. In aggiunta, nasce anche l'*ice cider*, sidro prodotto dalla sola fermentazione di succo congelato o di succo prodotto da mele congelate, senza aggiunta di zucchero, acqua o alcol e con contenuto alcolico superiore a 7% (v/v) (AICV - European Cider and Fruit Wine Association, 2022).

1.2 Tipologie di sidro

Il sidro prodotto viene suddiviso in due categorie, sulla base degli ingredienti utilizzati per la produzione, come di seguito evidenziato.

- Sidro standard: sidro ottenuto esclusivamente attraverso l'utilizzo di succo di mela, senza l'aggiunta di altri frutti o aromi. È permesso l'utilizzo di alcuni zuccheri, con ruolo di regolazione del livello di carboidrati necessari a condurre la fermentazione oppure per l'aumento della dolcezza del sidro fermentato.
- Sidro speciale: sidro ottenuto attraverso l'utilizzo di succo di mela, altri frutti (pera, bacche, ...), aromi naturali (zenzero, cannella, lemongrass, noce moscata), zuccheri, dolcificanti o miele, ma non additivi.

Inoltre, il sidro è classificato in base alla quantità di zuccheri residui presente nel prodotto: dry (sidro secco, quindi con concentrazione di zuccheri residui molto bassa), semi-dry, medium, semi-sweet e sweet (alta concentrazione di zuccheri) (Calugar, et al., 2021).

1.3 Etimologia

Inizialmente nominato 'pomorum' nei testi degli antichi Romani, il termine 'sidro' deriva dall'ebraico 'sekhar' (radice della parola 'ubriaco'), poi detto 'sikera' (dal greco, bevanda intossicante) e infine ripreso dai Romani con il termine 'sicera' (dal latino, succo di mela fermentato) (Watson, 2013). Oggi è definito 'cider' in inglese, con alcune varianti: 'cyder', ossia il sidro ottenuto con metodi tradizionali, ma anche 'scrumpy' che sta ad indicare il sidro ottenuto con metodi tradizionali, non filtrato, torbido e privo di anidride carbonica (Johansen, 2000); negli Stati Uniti il sidro alcolico è chiamato 'hard cider', mentre con 'cider' ci si riferisce al succo di mela non fermentato.

1.4 Storia

Le mele sono da sempre utilizzate dall'uomo come parte dell'alimentazione. Già tra il 35000 a.C. e l'8000 a.C. si trovano le prime testimonianze dell'utilizzo di questo frutto (Watson, 2013); gli storici datano attorno al 1300 a.C. la presenza di meli sul delta del Nilo e molti documenti citano una bevanda alcolica ottenuta da mele e pere (Cousin, et al., 2017). Alcune referenze storiche relative a bevande fermentate ottenute da mele e altra frutta, ad opera di Greci e Romani, si trovano a partire dal 900 a.C. (Calugar, et al., 2021). La prima referenza storica che tratta specificamente il sidro risale al 55 a.C., anno in cui i soldati romani, partiti alla conquista della Britannia, scoprirono il 'pomorum', una bevanda consumata dai Celti e ottenuta tramite la fermentazione del succo delle mele selvatiche. Questo primordiale sidro si otteneva con mele selvatiche della specie *Malus sylvestris*, che crescevano spontaneamente nei boschi britannici; negli anni successivi i Romani introdussero le loro conoscenze nell'ambito dell'orticoltura, come le tecniche di coltivazione, potatura e innesto, permettendo di semplificare il reperimento delle materie prime. In Spagna la produzione di sidro viene datata a prima dell'anno 0; le regioni delle coste settentrionali Asturie e Paesi Baschi presentano una delle produzioni di mele più antiche e nel corso degli anni si sono selezionate varietà di mele amare e con un alto contenuto di tannini, adatte per la produzione di sidro (Watson, 2013). Da un documento di Carlo Magno si apprende che nel IX secolo d.C. il sidro diventò popolare nell'Europa continentale; dopo la conquista dell'Inghilterra da parte dei Normanni nel 1066, il consumo di sidro iniziò a consolidarsi anche in Gran Bretagna, dove nacquero meleti specifici per mele da sidro (Cousin, et al., 2017) e dove nel XII secolo diventò la bevanda più consumata dopo la birra. Nel 1371, un documento cita vendite di sidro pari a quelle del vino nella regione della Normandia, nel nord della Francia. Tra XVI e XVII secolo, la produzione si espanse ad altre regioni francesi, fino al 1863, anno in cui, a causa dei danni da fillossera della vite, il consumo di sidro crebbe esponenzialmente in tutta la Francia (Watson, 2013). Nel XX secolo in Francia il sidro diventò la seconda bevanda più consumata dopo il vino, ma i danni causati ai meleti durante la Seconda Guerra Mondiale ne limitarono drasticamente la produzione (Cousin, et al., 2017). Negli Stati Uniti vennero introdotte le prime coltivazioni di mele nel 1623 a Boston, con la conseguente nascita di varietà americane (Watson, 2013).

1.5 Volumi e mercato del sidro

Il consumo a livello mondiale di sidro nel 2021 si è attestato attorno ai 24,7 milioni di ettolitri. La maggior parte dei consumi avviene in Europa occidentale con quasi 12 milioni di ettolitri consumati, che corrisponde al 48,3% dei consumi totali. A seguire si trovano Africa con 4,37 milioni di ettolitri (17,7%), Nordamerica con 2,68 milioni di ettolitri (10,9%), Europa orientale con 1,92 milioni di ettolitri (7,8%) e Australia con 1,76 milioni di ettolitri (7,1%) (AICV - European Cider and Fruit Wine Association, 2022).

A livello europeo, il mercato maggiore in termini di volumi è quello del Regno Unito, con un consumo annuo di 7,58 milioni di ettolitri, seguito da Spagna (1,05 milioni di ettolitri) e Francia (0,676 milioni di ettolitri).

Il consumo Pro Capite annuo presenta la Repubblica d'Irlanda al primo posto con 12,47 L di sidro consumati, seguita da Regno Unito (11,18 L) e Finlandia (5,66 L) (AICV - European Cider and Fruit Wine Association, 2022).

La produzione di sidro con metodi tradizionali, tra cui la fermentazione spontanea, è portata avanti in Spagna, Francia, Repubblica d'Irlanda e Slovenia (Morrissey, et al., 2004). In particolare, la produzione di sidro naturale in Spagna si concentra nella regione settentrionale delle Asturie, la quale, con circa 500.000 ettolitri prodotti ogni anno, copre quasi il 50% dei consumi nazionali di sidro (Pando Bedriñana, et al., 2010), e nei Paesi Baschi (Watson, 2013). In Francia, questa tradizione è portata avanti nelle regioni nord-occidentali della Bretagna e della Bassa Normandia (Coton, et al., 2006).

2. LE MELE UTILIZZATE PER LA PRODUZIONE DI SIDRO

La mela è la materia prima utilizzata nella produzione del sidro. È il terzo frutto più coltivato al mondo, dopo uva e pomodoro, con 78 milioni di tonnellate nel 2022 e viene impiegata principalmente per il consumo da tavola e per la produzione di succo (Soomro, et al., 2022; United States Department of Agriculture, 2022). Il maggior produttore mondiale è la Cina, con 40 milioni di tonnellate, seguita dagli Stati Membri dell'Unione Europea con 12 milioni di tonnellate (United States Department of Agriculture, 2022). La maggior parte delle mele da sidro viene coltivata in Europa occidentale. La mela da sidro si presenta diversamente dalla mela da tavola: mentre la mela da tavola è generalmente più grande e dolce, per soddisfare le esigenze anche visive del consumatore, la mela da sidro è un frutto di dimensioni inferiori, meno dolce e più acido e amaro (Alonso, et al., 2015; Soomro, et al., 2022). Le mele da sidro europee appartengono alla Famiglia delle Rosaceae, Sottofamiglia Maloideae (Al Daccache, et al., 2020); la specie è *Malus domestica*, che deriva dal processo di selezione, domesticazione e ibridazione delle specie selvatiche *Malus sylvestris* x *Malus sieversii* (Merwin, et al., 2008).

2.1 Varietà

Le mele da sidro si suddividono in 4 categorie, e vengono selezionate sulla base delle loro caratteristiche di acidità e contenuto di composti fenolici (Beech, 1972; Calugar, et al., 2021):

- **Acide o Sour:** > 0,45% w/v di acidità titolabile e < 0,20% w/v di contenuto di fenoli totali; varietà che corrispondono a questi criteri sono Golden Russet, Baldwin, Roxbury Russet, Cox's Orange Pippin, Bramley's Seedling, Raxao e Judor;
- **Amare acide o Bitter sour:** > 0,45% w/v di acidità titolabile e > 0,20% w/v di contenuto di fenoli totali; le varietà principali sono Kingston Black, Foxwhelp, Meana e Kermerrien;
- **Amare dolci o Bittersweet:** < 0,45% w/v di acidità titolabile e > 0,20% w/v di contenuto di fenoli totali; le varietà principali rappresentanti questa categoria sono Coloradona, Michelin, Binet Rouge, Somerset Redstreak, Tremletts Bitter, Dabinett e Yarlington Mill;
- **Dolci o Sweet:** < 0,45% w/v di acidità titolabile e < 0,20% w/v di contenuto di fenoli totali; tra queste le varietà Duron Arrores, Sweet Alford e Bedan.

Class	Chemical Composition Based on Cider Apple Variety				TA Range (%w/v)	TPC Range (%w/v)
	Variety	Sugar Content (°Brix)	TA (%w/v)	TPC (%w/v)		
Sour	Golden Russet	17	0.55	0.04	>0.45	<0.20
	Baldwin	11.4	0.74	0.06		
	Roxbury Russet	15.2	0.71	0.06		
	Cox's Orange Pippin	13	0.6	0.07		
	Bramley's Seedling	12.2	0.85	0.08		
	Raxao	12.5	0.6	0.1		
	Judor	-	-	0.11		
Bitter sour	Kingston Black	12.6	0.58	0.19	>0.45	>0.20
	Foxwhelp	12.6	1.91	0.22		
	Meana	-	0.5	0.3		
	Kermmerrien	13.6	-	0.38		
Bittersweet	Coloradona	-	0.1	0.2	<0.45	>0.20
	Michelin	12.6	0.25	0.23		
	Binet Rouge	10.9	0.15	0.24		
	Somerset Redstreak	-	0.19	0.28		
	Tremletts Bitter	12.4	0.27	0.38		
	Dabinett	14.9	0.18	0.43		
	Yarlington Mill	13.5	0.22	0.46		
Sweet	Duron Arrores	-	0.3	0.1	<0.45	<0.20
	Sweet Alford	15	0.22	0.15		
	Bedan	14.4	-	0.34		

Tabella 2.1. Classificazione delle mele da sidro secondo i criteri di acidità e contenuto di composti fenolici. TA = Acidità titolabile; TPC = Contenuto fenolico totale (Calugar, et al., 2021)

Nei Paesi in cui la produzione di sidro è ancora legata alla tradizione e alla fermentazione spontanea del succo, si è venuta a creare una selezione delle varietà più adatte a soddisfare diversi consumatori. In Francia si produce un sidro dolce e fruttato, risultato di blend di mele delle categorie *Bittersweet* e *Bitter sour*; le varietà più utilizzate sono Avrolles, Binet Rouge, Bedan, Bisquet, Cidor, Douce Moen, Douce Coet Ligne; in Spagna per la produzione di un sidro più acido, si utilizzano mele asturiane, basche e galiziane, come Blanquina, Carriò, Cristalina, Coloradona, Collaos, Limòn Montes, Marilena, Perezosa, Regona, Prieta, Raxao, Solarina, Teorica, Xuanina; nel Regno Unito e Irlanda, invece, si produce un sidro generalmente secco e molto tannico e complesso, risultato di un blend di Broxwood Foxwhelp, Bramley's Seedling, Brown's Apple, Backwell Red, Court Royal, Dymock Red, Cox Orange Pippin, Crimson King, Morgan Sweet, Sweet Alford (Alonso, Laca, Rendueles, Mayo, & Diaz, 2015; Calugar, et al., 2021; AICV - European Cider and Fruit Wine Association, 2021).

2.2 Composizione chimica delle mele

Le mele da sidro sono state selezionate negli anni con l'obiettivo di ottenere un succo con concentrazioni di zuccheri, acidi organici e composti fenolici adatte alla fermentazione e mirate all'ottenimento di un sidro bilanciato in acidità, grado alcolico e gusto amaro.

Le mele mature utilizzate per la produzione del succo e del sidro contengono circa 85% di acqua, 12-14% carboidrati, 0,3-1% acidi organici, 0,3% proteine, 0,2% composti fenolici, e <0,1% lipidi, minerali e vitamine.

Questi valori sono indicativi e dipendono da fattori quali la varietà, il grado di maturazione e la composizione del terreno (Al Daccache, et al., 2020).

2.2.1 Carboidrati

Gli zuccheri più presenti nel succo di mela sono i monosaccaridi glucosio e fruttosio, il polisaccaride saccarosio, oltre a polioli (sorbitolo); questi forniscono dolcezza al frutto e al succo. Altri composti appartenenti a questa categoria sono cellulosa, emicellulose, e pectine (Al Daccache, et al., 2020). Tra gli zuccheri, il fruttosio è quello presente in concentrazioni maggiori (24-65 g/L), seguito da saccarosio (fino a 32 g/L) e glucosio (fino a 22 g/L) (Calugar, et al., 2021). Sono presenti in concentrazioni molto inferiori altri composti, quali arabinosio, ramnosio, fucosio, galattosio, mannosio e xilosio, principalmente nella parete cellulare delle cellule vegetali (Al Daccache, et al., 2020). La maggior parte degli zuccheri può essere utilizzata dai lieviti durante la fermentazione e questo porta a bassa gravità residua nel sidro fermentato completamente. Le pectine solubili presenti nel succo sono dei polimeri dell'acido galatturonico esterificato con metanolo (Beech, 1972). La concentrazione degli zuccheri totali nel succo di mele da sidro si aggira attorno ai 125 g/L, corrispondente a 12,5°Brix (Calugar, et al., 2021).

2.2.2 Acidi organici

L'acido organico più presente nel succo di mela è acido L (-) malico, con una concentrazione di 2,5 – 4,9 g/L; altri acidi molto presenti sono acido shikimico e acido chinico (1,2 g/L), oltre ad acido ascorbico (0,8 – 1,1 g/L), acido succinico (0,4 – 0,6 g/L) e acido citrico (0,3 g/L). Sono stati trovati anche chetoacidi (acido ossalacetico, acido piruvico e acido chetoglutarico) a basse concentrazioni. L'acidità totale delle mele da sidro è compresa tra 5,4 e 8,4 g/L. Il pH del succo risulta essere compreso tra 3,3 e 3,8 e l'acidità titolabile è generalmente compresa tra 0,2% e 0,7% w/v (Beech, 1972; Calugar, et al., 2021; Al Daccache, et al., 2020).

2.2.3 Composti azotati

I composti azotati assimilabili dai lieviti (YAN) hanno concentrazioni comprese tra 9 e 249 mg/L, ma solitamente il succo di mela ne è carente, con concentrazioni inferiori a 100 mg/L; tra gli amminoacidi, quelli a concentrazione maggiore sono: fenilalanina (2,7 – 13 mg/L), acido aspartico (1,2 – 5,6 mg/L) e acido glutammico (1 – 3,3 mg/L) (Calugar, et al., 2021).

2.2.4 Composti fenolici

I composti fenolici fanno parte dei metaboliti secondari prodotti dalla pianta. Il contenuto di composti fenolici nel succo di mela è importante, in quanto influenza in parte la carica microbica, le proprietà antiossidanti, nutrizionali e sensoriali. Sono degli idrocarburi aromatici composti da uno o due anelli aromatici con strutture differenti. Si distinguono per numero e sequenza degli anelli, numero e posizione dei gruppi ossidrilici e presenza di sostituenti non fenolici, quali gruppi alchilici, zuccheri e acidi organici. I composti fenolici si dividono in acidi fenolici e flavonoidi.

Tra gli acidi fenolici il più rappresentativo nel succo di mela è l'acido *p*-cumarico, precursore del vinilfenolo, seguito da acido clorogenico (estere di acido caffeico e acido chinico, la sua ossidazione è la causa dell'imbrunimento del succo). A basse concentrazioni si trova infine l'acido *p*-cumarilchinico (Al Daccache, et al., 2020).

I flavonoidi sono presenti nei tessuti vegetali in generale (foglie, semi, corteccia, fiori) e sono composti da uno scheletro di difenilpropano; si suddividono a loro volta in 13 sottogruppi. Tra questi hanno importanza, nel succo di mela, le antocianidine (procianidine), i flavan-3-oli (catechina e epicatechina), i flavonoli (quercetina) e i diidrocalconi (floridzina e fletina xiloglucoside) (Beech, 1972; Al Daccache, et al., 2020).

2.2.5 Lipidi

I lipidi sono presenti in basse concentrazioni nella polpa, ma alti livelli si possono individuare nei semi. La frazione lipidica è costituita da triacilgliceroli, glicolipidi e fosfolipidi, carotenoidi, triterpenoidi e cere (Al Daccache, et al., 2020).

2.2.6 Vitamine

La vitamina C (acido L-ascorbico) viene biosintetizzata nelle piante a partire da zuccheri esosi (es. glucosio) e ha alta attività antiossidante. È presente nel succo di mela in concentrazioni comprese tra 30 e 350 mg/L. Sono inoltre presenti in tracce vitamina B12, vitamina D e tocoferoli (Al Daccache, et al., 2020).

2.2.7 Minerali

Un minerale molto presente nel succo di mela è il fosforo (11 – 76 mg/L); il catione più presente è il potassio (374 – 1568 mg/L). Altri elementi presenti in concentrazioni inferiori sono calcio (69 – 194 mg/L) e magnesio (27 – 56 mg/L) (Calugar, et al., 2021; Al Daccache, et al., 2020).

Attribute	Units	Values
Sugars	(g/L)	≈125
Glucose	(g/L)	14–22
Fructose	(g/L)	24–65
Sucrose	(g/L)	14–32
Sorbitol	(g/100 mL)	0.2–1.0
Starch	(g/L)	7.5–8.5—unripe apples 2–2.5—ripe apples not detected—stored apples
Organic acids		
Malic	(g/L)	2.5–4.9
Ascorbic	(mg/L)	800–1100
Succinic	(mg/L)	420–600
Oxalic	(mg/L)	150–240
Tartaric	(mg/L)	5–7
Fumaric	(mg/L)	3.5–5
Folic	(μg/L)	60–75
Quinic	(mg/L)	1202
Pyruvic	(mg/L)	31
Citric	(mg/L)	343
Amino acids		
Aspartic acid	(mg/L)	1.2–5.6
Glutamic acid	(mg/L)	1–3.3
Serine	(mg/L)	0.1–0.89
Histidine	(mg/L)	0.31–0.77
Glycine	(mg/L)	0.03–0.12
Arginine	(mg/L)	0.26–1.0
Alanine	(mg/L)	0.22–1.7
Tyrosine	(mg/L)	0.66–1.4
Methionine	(mg/L)	0.83–1.4
Valine	(mg/L)	0.59–1.8
Phenylalanine	(mg/L)	2.7–13
Isoleucine	(mg/L)	1.3–2.1
Leucine	(mg/L)	1.1–1.8
Lysine	(mg/L)	0.33–0.6
Minerals		
Potassium	(mg/L)	374–1568
Phosphorus	(mg/L)	11–76
Calcium	(mg/L)	69–194
Magnesium	(mg/L)	27–56
Copper	(mg/L)	4.58–1.1
Iron	(mg/L)	0.9–11
pH		3.3–3.8
Pectin	(g/100 mL)	0.1–1.0
YAN	(mg/L)	9–249

Tabella 2.2. Composizione chimica delle mele utilizzate per la produzione del sidro (Calugar, et al., 2021)

2.3 Comunità microbica presente sulla superficie delle mele

La comunità microbica indigena delle mele è differente rispetto a quella del succo di mela, in quanto, durante la macinazione e la pressatura, le attrezzature presenti in cantina possono portare delle contaminazioni di batteri e lieviti nel succo processato.

Alcuni studi hanno preso in considerazione il microbiota autoctono delle mele non ancora sottoposte ai processi di macinazione e pressatura. Nel primo studio, gli isolati ottenuti hanno mostrato come i lieviti del genere *Saccharomyces* non facciano normalmente parte del microbiota iniziale. Tra la popolazione batterica sono state infatti identificate le famiglie Lactobacillaceae (generi *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Pediococcus*), Acetobacteriaceae (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*) ed Enterobacteriaceae (compreso il patogeno *Escherichia coli* O157:H7). Tra la popolazione fungina, invece, si trovano *Candida sake*, *Pichia fermentans*, *Exobasidium* sp., alcune specie fitopatogene appartenenti alla classe Dothideomycetes e altre appartenenti alle famiglie Mycospherellaceae e Dissoconiaceae (Cousin, et al., 2017).

Un altro studio mostra come tra i lieviti *C. sake* sia la specie predominante sulle bucce delle mele da sidro, seguita da *P. fermentans*, *C. incommunis*, *C. glabrosa*, *C. oleophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. osmophila* e *H. valbyensis*, *Metschnikowia* sp., *Zygorulasporea florentina*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Vishniacozyma carnescens*, *Papiliotrema flavescens* e *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Graça, et al., 2015).

Un ulteriore studio, condotto su mele della varietà Golden Delicious, isola come principali funghi *Cladosporium*, *Alternaria* e altri lieviti; un'altra analisi su mele fresche identifica bassi livelli di batteri della famiglia delle Enterobacteriaceae (*Pantoea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*). Possono essere presenti numerosi generi di lieviti, come *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Al Daccache, et al., 2020).

3. PROCESSO DI PRODUZIONE DEL SIDRO

Il processo di produzione del sidro si divide in varie fasi; le più importanti dal punto di vista microbiologico sono la pressatura, la chiarifica, le fermentazioni alcolica e malolattica e la maturazione.

Di seguito viene descritto brevemente il processo di produzione del sidro tradizionale a fermentazione spontanea, con alcuni rimandi a fasi della produzione di sidro industriale.

3.1 Lavaggio delle mele

Dopo la raccolta, che può avvenire esclusivamente dalla pianta oppure in parte dall'albero e in parte raccogliendo i frutti già caduti a terra, le mele destinate al processo di produzione di sidro industriale vengono immerse in un bagno di acqua e cloro con una concentrazione di 50 – 200 mg/L, per 5 – 20 minuti, in modo da ottenere un forte effetto ossidante contro i microrganismi e ridurre la carica microbica presente sulle bucce. In particolare, il lavaggio delle mele riduce dal 10% al 100% della patulina, micotossina prodotta da *Penicillium expansum*, presente sulle mele, in particolare su quelle cadute a terra (Calugar, et al., 2021; Tyakht, et al., 2021). Questo metodo, però, incide negativamente sugli aromi della frutta e ne causa la diminuzione.

Il lavaggio non è una pratica comunemente implementata durante la produzione di sidro tradizionale a fermentazione spontanea, in quanto porta alla riduzione della carica microbica autoctona delle mele e del succo, con conseguenti svantaggi dal punto di vista della diversificazione di lieviti e batteri che concorrono alle fermentazioni alcolica e malolattica. Tuttavia, la produzione di sidro irlandese a fermentazione spontanea rappresenta un'eccezione: uno studio sulla diversità microbica nelle acque di lavaggio delle mele ha dimostrato la presenza di lieviti dei generi *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Metschnikowia* (Morrissey, et al., 2004), suggerendo come questa pratica sia adottata in alcuni casi anche durante le lavorazioni tradizionali.

3.2 Blending

Il processo di blending, ossia la selezione di mele di varietà diverse finalizzata all'ottenimento di un succo con le giuste caratteristiche di acidità, contenuto zuccherino e composti fenolici, è una tecnica adottata nel corso degli anni per la produzione di sidro, sia nell'industria moderna, sia nelle cantine che utilizzano il metodo tradizionale (Calugar, et al., 2021). Grazie a questa pratica si può agire sulla composizione biochimica del succo (Cabranes, et al., 1990) e in particolare sull'acidità, sul gusto amaro, sulla dolcezza, sul contenuto alcolico, sul colore e sugli aromi varietali del sidro (Calugar, et al., 2021). Un esempio di blending applicato alla produzione

di sidro tradizionale è un tipico blend di mele selezionato dalle cantine nella regione delle Asturie (Spagna), che prevede l'utilizzo delle varietà Raxao (40%, sour), Collaos (30%, mild sour), Coloradona (15%, bittersweet), Duron Arrores (10%, sweet) e Meana (5%, bitter), le quali contribuiscono a fornire l'impronta acida del sidro naturale spagnolo a fermentazione spontanea (Gomis, et al., 1991).

Durante la produzione di sidro industriale su larga scala, tramite il blending si raggiunge la costanza delle caratteristiche qualitative di sidri ottenuti tra annate e raccolti diversi (Calugar, et al., 2021).

Il blending, inoltre, come accade nel caso del vino, può essere attuato alla fine della fermentazione, prima dell'imbottigliamento, sempre nell'ottica della similarità gustativa con le annate precedenti, tramite l'aggiunta di sidro con le giuste caratteristiche per la correzione di eventuali carenze in acidità o amaro (Beech, 1972).

3.3 Macinazione

La macinazione, o *milling*, consiste nel ridurre le mele intere a una polpa fina (Beech, 1972), per semplificare l'estrazione del succo; è molto importante, durante questa fase, ridurre al minimo l'attività ossidativa operata dall'enzima polifenolossidasi (Calugar, et al., 2021) sulla polpa ottenuta, per evitare l'imbrunimento e ottenere un succo dal colore chiaro.

Gli strumenti utilizzati nelle produzioni tradizionali sono i mulini di legno che frantumano i frutti (Morrissey, et al., 2004), anche se in passato si utilizzava una pietra circolare azionata dal movimento di animali (Figura 3.1); questa svolgeva anche il compito della pressatura, ma presentava grossi limiti dal punto di vista della resa e dell'energia impiegata (Merwin, et al., 2008). Per la macinazione delle mele nelle cantine spagnole si utilizza il mulino a martelli (Figura 3.2), che riduce le mele in piccoli pezzi (Al Daccache, et al., 2020; Cabranes, et al., 1990).

I mulini utilizzati nell'industria su larga scala, sono i mulini a grattugia in acciaio inossidabile, che producono una polpa fina e resistono al basso pH del succo estratto (Beech, 1972).

Dopo la macinazione, la sansa umida, costituita dalla polpa, ma anche dai semi e dalle bucce, viene trasferita nella pressa per completare l'estrazione del succo.



Figura 3.1. Macina utilizzata tradizionalmente per la produzione di succo. (Jones, 2018)

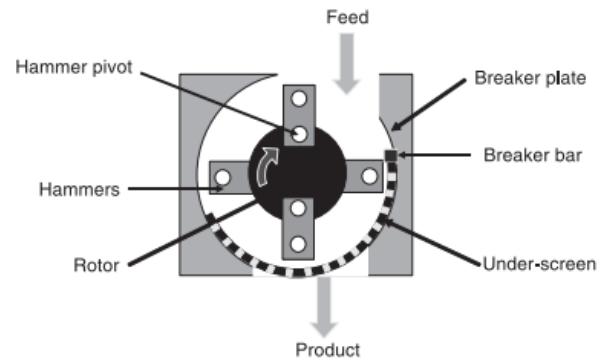


Figura 3.2. Sezione di un mulino a martelli. Carico (Feed); martelli (Hammers); perno del martello (Hammer pivot); rotore (Rotor); piastra forata (Breaker plate); barra forata (Breaker bar); scarico del prodotto (Product). (Shi, et al., 2003)

3.4 Pressatura

La pressatura consiste nell'applicare una pressione sulla polpa di mela appena macinata dal mulino, per estrarre il succo di mela. La maggior parte dei produttori di sidro riducono al minimo il tempo impiegato per il passaggio della polpa dal mulino alla pressa, ad eccezione di alcuni casi: la polpa di mele appena macinata per la produzione di sidro tradizionale francese, infatti, viene lasciata ossidare per un tempo compreso tra 30 minuti e 5 ore e successivamente trasferita nella pressa per l'estrazione del succo. Questa pratica è importante nella produzione del sidro tradizionale francese, poiché permette all'ossigeno di avviare una fase ossidativa, durante la quale la presenza di ossigeno favorisce la crescita di lieviti non-*Saccharomyces* ad inizio fermentazione; grazie a ciò sono generati molti aromi fruttati, tipici del sidro a fermentazione spontanea (Al Daccache, et al., 2020). Inoltre, questa pratica contribuisce al colore più scuro del sidro francese, in quanto favorisce l'imbrunimento della polpa prima dell'estrazione del succo.

Tradizionalmente, la pressatura era svolta contemporaneamente alla macinazione, attraverso la modalità già descritta al paragrafo 3.3. Dal XIII secolo, questo metodo, in Spagna, è stato rimpiazzato dall'utilizzo della pressa a vite o *lagar*, basato dapprima su viti in legno di rovere e successivamente in metallo, oppure su leve molto lunghe che esercitavano una pressione bassa per molti giorni sulle mele macinate grossolanamente. In questo modo si otteneva, pur con una resa bassa, un succo di mela molto colorato, a basso contenuto di composti fenolici e con alta acidità volatile (Merwin, et al., 2008).

Il metodo tradizionale, portato avanti dai piccoli produttori, prevede l'utilizzo di una pressa discontinua a piastre e telaio, solitamente a vite oppure con pistoni idraulici (Figure 3.3 e 3.4): la polpa di mele viene inserita in tessuti di nylon appositi impilati in una dozzina di strati, successivamente pressati lentamente e in maniera crescente (Merwin, et al., 2008; Morrissey, et al., 2004). Questa modalità presenta una efficienza bassa, che

non supera il 70-80%, ed impiega molto tempo (associata ad un ciclo di pressatura di 3 giorni) (Calugar, et al., 2021; Suàrez Valles, et al., 2007; Valles, et al., 2007), ma è anche meno costosa rispetto alle presse orizzontali a pistone Bucher-Guyer e alle presse continue a nastro (Merwin, et al., 2008). Esiste un metodo alternativo più rapido, con un ciclo di pressatura continuo di 8 ore e pressa idraulica (Suàrez Valles, et al., 2007). La velocità di pressatura ha un effetto significativo sull'estrazione delle sostanze pectiche, che è maggiore nei succhi ottenuti con il sistema di pressatura tradizionale, per via della locazione e della struttura di queste sostanze nelle cellule vegetali (Mangas, et al., 1994).

Nella produzione su larga scala si utilizzano presse pneumatiche automatiche che lavorano ad alte pressioni oppure presse a nastro, le quali possono pressare in continuo varie tonnellate di mele all'ora con un'efficienza di estrazione superiore all'80%. Altri metodi utilizzati dall'industria per l'estrazione del succo sono la diffusione a caldo e la liquefazione (Mangas, et al., 1994; Merwin, et al., 2008).

Nel corso degli anni sono state sviluppate nuove tecnologie che permettono di migliorare la resa di estrazione del succo dalle mele. L'utilizzo di enzimi pectolitici e coadiuvanti di pressatura, come lolla di riso o trucioli di legno, permettono di incrementare l'efficienza di estrazione del 5% (Merwin, et al., 2008). La tecnologia del campo elettrico pulsato in combinazione alla pressatura ha mostrato effetti positivi sulla resa, sul rilascio di composti fenolici e sul miglioramento del profilo aromatico del sidro, in quanto semplifica la rottura delle membrane delle cellule vegetali e favorisce il rilascio di esteri; le microonde incentivano il rilascio di composti fenolici, in particolare flavonoidi, e di solidi solubili; l'utilizzo di alte pressioni (High-Pressure Processing) è un metodo costoso ma molto efficace contro l'ossidazione e favorisce l'estrazione dei composti fenolici (Calugar, et al., 2021).

Dal punto di vista microbiologico, è stata notata una differenza nella composizione della comunità microbica presente sulle mele e di quella del succo ottenuto mediante i diversi metodi di pressatura: questo suggerisce che le attrezzature utilizzate in cantina per la trasformazione delle mele, ossia mulini e presse, portino contaminazioni nel succo e dunque incidano sulla eventuale fermentazione spontanea e sul prodotto finale (Keller, et al., 2004). Uno studio finalizzato all'identificazione dei microrganismi presenti sulle attrezzature di cantina, condotto nella Repubblica d'Irlanda, ha dimostrato la presenza di ceppi di *Saccharomyces* con concentrazioni comprese tra $5 \cdot 10^2$ e $4,2 \cdot 10^4$ CFU/cm² sulle presse (Morrissey, et al., 2004), confermando così questa ipotesi.



Figura 3.3. Pressa a vite. (Jones, 2018)

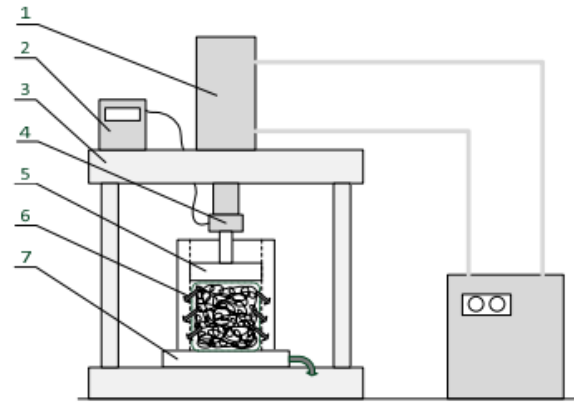


Figura 3.4. Disegno di una pressa idraulica a piastre e telaio. 1 – cilindro idraulico; 2 – sistema di misurazione della pressione; 3 – telaio; 4 – tensiometro; 5 – pistone; 6 – piastre e polpa di mela da pressare; 7 – base con raccolta e scolo del succo di mela. (Wilczynski, et al., 2019)

3.5 Solfitazione

La solfitazione è una pratica implementata principalmente nella produzione di sidro industriale con uso di starter microbici selezionati e non è utilizzata nella maggior parte dei sidri a fermentazione spontanea. I solfiti sono delle molecole ad azione antimicrobica e antiossidante e possono essere aggiunti in diversi momenti del processo, sotto forma di metabisolfito: dopo la pressatura, per ridurre la popolazione microbica indigena e prevenire l'imbrunimento del succo (Beech, 1972; Johansen, 2000); alla fine della fermentazione, per arrestare la conversione degli zuccheri a etanolo e ottenere un residuo zuccherino nel sidro; prima dell'imbottigliamento, per evitare possibili contaminazioni causate dal contatto del sidro con le attrezzature e le bottiglie (Beech, 1972) e in contrasto all'ossigeno che entra nella bottiglia durante questa fase (Le Quéré, et al., 2006). La solfitazione, dunque, permette la gestione delle fermentazioni e delle contaminazioni di cantina e per questo motivo è utilizzata come metodo di controllo nell'industria su larga scala, dove la diversità microbica potrebbe dare problemi competitivi ai lieviti inoculati.

Il sidro a fermentazione spontanea, come detto, non è solitamente solfitato, ad eccezione di alcuni sidri prodotti nella Repubblica d'Irlanda e Regno Unito, i quali vengono leggermente solfitati (< 8 ppm di anidride solforosa libera riscontrata nelle analisi) (Johansen, 2000; Morrissey, et al., 2004). Nel sidro naturale di produzione spagnola la solfitazione, pur essendo permessa al di sotto del livello di 100 mg/L, non viene attuata e la fermentazione è portata a termine senza l'aggiunta di solfiti, per mantenere la diversità microbica e per non influenzare negativamente la produzione di alcoli superiori (Johansen, 2000; Picinelli, et al., 2000). Uno studio riporta una riduzione del 98% della diversità microbica causata dalla solfitazione del succo di mela e la sopravvivenza in queste condizioni solo di alcuni ceppi delle specie *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *Saccharomycodes ludwigii*, che presentano resistenza e quindi sopravvivono nel succo, portando avanti la

fermentazione alcolica (Beech, 1972). Lo stesso studio cita i lieviti del genere *Hanseniaspora/Kloeckera* come indicatori della corretta solfitazione; la loro presenza nelle fasi finali della fermentazione e della maturazione è legata all'assenza di solfiti nel succo di mela (Pando Bedriñana, et al., 2010).

La solfitazione influisce negativamente sulla popolazione di batteri lattici che concorrono alla fermentazione malolattica: è stato notato, infatti, come la durata della conversione dell'acido malico a acido lattico abbia una durata di 11 giorni nel sidro non solfitato e di 21 giorni nel sidro solfitato con 60 ppm di anidride solforosa libera (Johansen, 2000). Questo è dovuto alla riduzione della popolazione batterica presente nel succo, che impiega più tempo per completare la conversione. Uno studio sui batteri lattici ha dimostrato come l'alta concentrazione di solfiti non influenzi lo sviluppo di alcune specie resistenti coinvolte nella fermentazione malolattica, quali *Oenococcus oeni* e il ceppo di *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Z25 (Zhao, et al., 2014). La solfitazione del succo di mela, dunque, causa una riduzione del numero e della diversità dei batteri lattici, con conseguente rallentamento nel completamento della fermentazione malolattica.

3.6 Chiarifica prefermentativa

La chiarifica del succo di mela è una tecnica prefermentativa che può avvenire spontaneamente o può essere indotta. La chiarifica può essere indotta tramite centrifugazione, filtrazione con farina fossile (Beech, 1972), utilizzo di gelatina (Johansen, 2000) oppure aggiunta dell'enzima pectinmetilesterasi (*enzymatic keeving*) e di ioni calcio in forma di cloruro di calcio diidrato (Gomis, et al., 1991).

La centrifugazione e la filtrazione non sono metodi percorsi dai piccoli produttori di sidro a fermentazione spontanea: le metodologie di produzione tradizionali prevedono infatti la chiarifica spontanea oppure indotta con enzimi o con gelatina.

Nel caso del sidro prodotto nel Regno Unito, è comune l'utilizzo di gelatina come coadiuvante per la chiarifica pre-fermentativa (Johansen, 2000). Questa pratica, però, porta alla rimozione selettiva delle procianidine ad alto grado di polimerizzazione e quindi alla diminuzione del contenuto totale di composti fenolici, modificando così non solo la composizione chimica, ma anche il gusto amaro del sidro (Le Quéré, et al., 2006), importante per il bilanciamento del gusto.

Il processo di chiarifica enzimatica è la tecnica prefermentativa più comune nella produzione del sidro tradizionale francese. Al succo di mela viene aggiunto l'enzima pectinmetilesterasi, che causa la demetilazione delle pectine estratte principalmente dalla buccia durante la pressatura. Successivamente, viene aggiunto cloruro di calcio (CaCl_2), che reagisce con le pectine demetilate e induce la formazione di un gel pectato che include le particelle in sospensione nel succo torbido. Il gel formato viene poi separato all'inizio della fermentazione per naturale flottazione, grazie alle bolle di anidride carbonica (Le Quéré, et al., 2006).

La chiarifica spontanea avviene in maniera molto simile a quella enzimatica, ma dipende dalla presenza di pectine, ioni calcio, contenuto di acido malico, contenuto fenolico, oltre che dal pH e dalla presenza dell'enzima pectinmetilesterasi nel succo. La presenza naturale di questi fattori nel succo potrebbe non essere sufficiente per avviare la chiarifica spontanea, in quanto dipende sia dal grado di maturazione delle mele che dalla tipologia di pressatura utilizzata. Se la chiarifica spontanea non avviene, si ottiene un sidro instabile dal punto di vista microbiologico (Mangas, et al., 1994). Questo metodo è il più comune nella produzione del sidro tradizionale delle Asturie (Gomis, et al., 1991).

La chiarifica è un trattamento attuato per includere nel gel pectato, e successivamente eliminare dal sidro, sostanze azotate, microrganismi e altre particelle che causano torbidità nel succo. I microrganismi presenti nel succo possono essere lieviti, batteri lattici, batteri acetici e altri contaminanti. La riduzione della carica microbica elimina le contaminazioni e quindi rende il sidro microbiologicamente più stabile evitando in particolare l'acetificazione causata dai batteri acetici contaminanti; dall'altra parte, riduce anche la presenza di lieviti e batteri lattici, rallentando le fermentazioni alcolica e malolattica e causando in alcuni casi arresti prematuri della fermentazione, con un residuo zuccherino maggiore rispetto ai sidri fermentati completamente. Il sidro spagnolo è solitamente fermentato completamente e risulta più secco e con un profilo acetico più accentuato, mentre nel sidro francese il rallentamento della fermentazione permette di ottenere un prodotto più dolce e con aromi fruttati (Gomis, et al., 1991; Le Quéré, et al., 2006; Mangas, et al., 1994).

La chiarifica può avvenire anche una volta conclusa la fermentazione, come tecnologia per la stabilizzazione microbiologica del prodotto e per la rimozione di proteine e composti fenolici che causano opacità, torbidità e depositi in bottiglia; in questo caso la chiarifica viene attuata per deposito, per centrifugazione o filtrazione (Al Daccache, et al., 2020).

3.7 Fermentazione

La fermentazione è la fase successiva alla pressatura delle mele e all'eventuale chiarifica del succo ed è suddivisa in due processi: la fermentazione alcolica e la fermentazione malolattica (Beech, 1972).

La fermentazione alcolica è mediata dai lieviti e prevede la conversione degli zuccheri in etanolo, anidride carbonica e altri prodotti metabolici che contribuiscono all'aroma del sidro (Beech, 1972; Calugar, et al., 2021; Al Daccache, et al., 2020); la fermentazione malolattica è invece mediata dai batteri lattici e consiste nella conversione dell'acido malico ad acido lattico e anidride carbonica, oltre alla produzione di alcol, carbonili, esteri e acidi grassi (Beech, 1972; Calugar, et al., 2021). Queste due fermentazioni possono avvenire contemporaneamente (quando il pH del mosto è elevato) oppure in momenti diversi, a seconda della tecnologia di produzione e della comunità microbica coinvolta (Johansen, 2000).

Le fermentazioni del sidro possono avvenire in maniera spontanea, ossia attraverso l'azione di lieviti e batteri autoctoni del succo di mela, oppure con l'inoculo di colture pure o miste, cioè di ceppi di lieviti e batteri lattici isolati e selezionati per ottenere determinati prodotti metabolici durante le fermentazioni (Beech, 1972).

La fermentazione spontanea è una pratica nata casualmente nel corso della storia dell'uomo, quando ancora non esistevano conoscenze sufficienti dal punto di vista microbiologico e le fermentazioni non potevano essere controllate. Le prime bevande fermentate prodotte erano frutto di fermentazioni spontanee involontarie, provocate dai lieviti e dai batteri autoctoni presenti nei frutti o nel miele. Nel corso degli anni, si è iniziato a capire come ottenere dei prodotti accettabili dal punto di vista sensoriale, migliorando le tecnologie, controllando i parametri ambientali e utilizzando le attrezzature, come presse e botti, che portavano ai migliori risultati. Non si conosceva infatti l'esistenza dei microrganismi, ma si osservava in quale botte si producesse il vino o il sidro migliore e con meno difetti. Questo metodo è stato portato avanti fino al 1890, quando sono stati introdotti i primi lieviti starter, isolati e selezionati per completare le fermentazioni in maniera controllata (Calugar, et al., 2021), in modo da ridurre al minimo i difetti sensoriali e gli eventuali scarti causati da contaminazioni o da fermentazioni non complete, che si traducevano in gravi perdite economiche per i produttori. Con le moderne conoscenze microbiologiche e con l'introduzione degli starter, il controllo delle fermentazioni è stato semplificato in modo da ottenere dei risultati riproducibili mantenendo alta la qualità del prodotto finito.

Se durante la produzione della birra i lieviti vengono recuperati dal fondo dei fermentatori e riutilizzati come inoculo per la fermentazione di altro mosto, per il sidro questo non è possibile (Johansen, 2000). Ad ogni ciclo di produzione è necessario un nuovo apporto di microrganismi, che possono essere quelli presenti sulle mele oppure introdotti come inoculo.

La fermentazione spontanea del succo di mela è stata sostituita quasi completamente dalla fermentazione con inoculo di colture pure o miste nel corso degli anni. Esistono però delle eccezioni: le produzioni con metodo tradizionale di sidro a fermentazione spontanea sono state mantenute e portate avanti in alcune zone europee, tra cui il *sidra natural* prodotto nelle Asturie e nei Paesi Baschi in Spagna, il *cidre* della Bretagna e della Bassa Normandia in Francia e i *cider* o *scrumpy* tipici della Repubblica d'Irlanda e dell'Inghilterra (Johansen, 2000; AICV - European Cider and Fruit Wine Association, 2021). Questi sidri hanno caratteristiche e profili aromatici profondamente diversi tra loro, dovuti a vari fattori, tra cui le varietà di mele le tecnologie e attrezzature adoperate durante la produzione. Le varietà di mele e il loro blend influenzano la composizione chimica, ma anche microbiologica del succo che si ottiene, in quanto mele raccolte in zone diverse hanno una comunità microbica autoctona diversa, che dipende tra le altre cose dalle condizioni ambientali del luogo di coltivazione (Al Daccache, et al., 2020). Anche le tecnologie di produzione hanno un effetto significativo sulla composizione microbica del succo: il microbiota presente sulle attrezzature di cantina, soprattutto quelle che

entrano in contatto con il succo, come mulini, presse, tubi e botti, portano contaminazioni nel succo e possono influire positivamente sulle fermentazioni (Morrissey, et al., 2004).

Negli ultimi anni la pratica della fermentazione spontanea è stata ripresa ed è molto apprezzata. Grazie allo sviluppo di tecnologie e conoscenze adatte, questo processo oggi è più controllabile e permette di ottenere risultati migliori dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche (Navarrete-Bolaños, 2012), riducendo il rischio di danni economici. I sidri prodotti con metodi tradizionali, infatti, sono risultati più complessi e rotondi nel gusto, più equilibrati nell'aroma e con un'acidità meno aggressiva e pungente (Han & Du, 2023).

3.8 Maturazione

La maturazione è la fase immediatamente successiva al completamento delle fermentazioni alcolica e malolattica. La maturazione avviene tradizionalmente in botti di legno di quercia, mentre per le produzioni industriali, si preferiscono contenitori di poliestere oppure di acciaio inossidabile. Durante questa fase, si mantengono temperature inferiori a quelle della fermentazione, comprese tra 3 °C e 12 °C, poiché spesso avviene nella stagione invernale (Cousin, et al., 2017). Evitare il contatto del sidro con l'ossigeno è particolarmente importante, perché i batteri acetici presenti naturalmente nel sidro continuano la loro attività e producono acido acetico in condizioni aerobiche (Picinelli, et al., 2000).

Tuttavia, nei sidri a fermentazione spontanea, i lieviti che dominano questa fase appartengono al genere *Brettanomyces / Dekkera*, in particolare *B. anomalus* e *D. anomala* nel sidro francese, ma è stato isolato anche *B. bruxellensis* nel sidro prodotto nella Repubblica d'Irlanda (Al Daccache, et al., 2020; Coton, et al., 2006; Morrissey, et al., 2004). Le concentrazioni di lieviti *Brettanomyces / Dekkera* riscontrate dallo studio sul sidro irlandese hanno mostrato valori di $3 \cdot 10^3$ CFU/mL al nono mese di maturazione (Morrissey, et al., 2004). La maturazione, infatti, dura solitamente 1 – 6 mesi (Cousin, et al., 2017), ma alcune produzioni tradizionali richiedono una maturazione di 2 anni (Beech, 1972).

Il metabolismo dei lieviti *Brettanomyces* può portare alla formazione di alcuni composti sgradevoli dal punto di vista sensoriale con odori di stalla e animalesco, tra cui 4-etilcatecolo, 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo rispettivamente da acido caffeico, acido *p*-cumarico e acido ferulico (Cousin, et al., 2017).

In questa fase avviene l'esterificazione di alcuni composti, con la formazione ad esempio di etil lattato (Mangas, Cabranes, Moreno, & Blanco, 1994); questi contribuiscono alla formazione dell'aroma terziario del sidro (Al Daccache, et al., 2020). Inoltre, i batteri lattici presenti limitano le concentrazioni di acido chinico e acido shikimico, riducendoli ad acido deidroshikimico (Picinelli, et al., 2000), che contribuisce al sapore amaro e attenua le note balsamiche e speziate dell'acido shikimico (Centorino, 2021).

3.9 Carbonatazione e rifermentazione in bottiglia

Il sidro è un prodotto solitamente frizzante, anche se ne esiste una variante, definita *scrumpy*, prodotta con metodi tradizionali, non filtrato, torbido e non carbonato. Alla fine della maturazione, solamente una piccola parte dell'anidride carbonica prodotta durante la fermentazione alcolica rimane disciolta in soluzione nel sidro. Per questo motivo, per ottenere un prodotto con la giusta quantità di anidride carbonica disciolta, sono state adottate due tecnologie: la rifermentazione in bottiglia e la carbonatazione (Johansen, 2000).

La carbonatazione è un metodo utilizzato su scala industriale e viene implementato tramite l'aggiunta di anidride carbonica esogena (Le Quéré, et al., 2006). La temperatura del sidro viene abbassata, poiché così risulta più semplice e veloce raggiungere la giusta quantità di anidride carbonica disciolta. Il sidro viene successivamente imbottigliato senza l'aggiunta di zuccheri per la rifermentazione e talvolta viene filtrato per eliminare eventuali torbidità e depositi sul fondo della bottiglia (Al Daccache, et al., 2020).

Il metodo più comune per ottenere un sidro frizzante è la rifermentazione in bottiglia. I produttori francesi imbottigliano il sidro con la quantità di zucchero e uno starter commerciale sotto forma di lievito secco attivo (LSA) sufficiente per raggiungere, una volta completata la rifermentazione in bottiglia, la concentrazione di 5 g/L di anidride carbonica disciolta nel sidro (Cousin, et al., 2017; Le Quéré, et al., 2006). Nei sidri francesi non è vietata la carbonatazione forzata del sidro (Picinelli, et al., 2000), tuttavia non è una pratica comune. La rifermentazione avviene alla temperatura di cantina e lo zucchero solitamente utilizzato è il glucosio (Tyakht, et al., 2021).

Nel caso del sidro naturale prodotto nelle Asturie, invece, il disciplinare prevede solamente la rifermentazione con l'utilizzo esclusivo di succo ottenuto dalla pressatura delle mele. Questa pratica potrebbe essere limitante, in quanto il contenuto zuccherino del succo di mela dipende dalla qualità delle materie prime e quindi varia in base alle diverse annate (Picinelli, et al., 2000); questo fattore porta alla realizzazione di sidri con carbonazione e grado alcolico diversi.

3.10 Pastorizzazione e microfiltrazione

Per la produzione di sidri industriali, la stabilizzazione microbiologica viene implementata attraverso i processi di pastorizzazione del sidro, che è il metodo più efficace per abbattere le contaminazioni dovute alle condizioni di conservazione e a pratiche igieniche non adeguate (Calugar, et al., 2021), e di microfiltrazione con membrane ceramiche. Queste pratiche non vengono attuate nella produzione dei sidri tradizionali a

fermentazione spontanea, in quanto le alte temperature causano una perdita di aromi del prodotto e i filtri eliminano parte dei composti aromatici, con una conseguente diminuzione della qualità organolettica.

4. LE FERMENTAZIONI CON COLTURE STARTER

Il concetto di fermentazione in purezza (cioè utilizzando un inoculo costituito da lieviti selezionati) è stato introdotto nel 1890. Analizzando la composizione microbica di mosti soggetti a fermentazioni alcoliche spontanee, da quelle che hanno portato i risultati migliori in termini di attività fermentativa e qualità del prodotto, sono stati isolati e selezionati dei ceppi di lievito adatti a diventare degli starter per fermentazioni guidate (Calugar, et al., 2021). Fino a quel momento, infatti, tutte le fermentazioni avvenivano spontaneamente, senza inoculo di lieviti e batteri. Tuttavia, a causa della diversità microbica presente nei succhi, molti produttori riscontravano off-flavours, aromi sgradevoli e caratteristiche sensoriali negative nel prodotto finito (Navarrete-Bolaños, 2012). L'introduzione delle colture starter per le fermentazioni alcolica e, successivamente, malolattica ha permesso ai produttori di sidro, nel corso degli anni, di elevare la qualità della produzione, ridurre le contaminazioni, e standardizzare le qualità organolettiche tra le diverse annate e raccolti (Cousin, et al., 2017; Johansen, 2000; Merwin, et al., 2008). L'aggiunta degli starter al succo di mela avviene nelle produzioni industriali, nella fase immediatamente successiva alla solfitazione (Johansen, 2000), mentre i sidri prodotti con metodo tradizionale, tipici delle Asturie, Paesi Baschi, Bretagna, Bassa Normandia, Inghilterra e Repubblica d'Irlanda, continuano a sfruttare i lieviti autoctoni dei frutti e delle attrezzature di cantina per condurre fermentazioni spontanee (Calugar, et al., 2021; Cousin, et al., 2017; Morrissey, et al., 2004; Valles, et al., 2007).

4.1 La fermentazione alcolica guidata

Tra i lieviti isolati e selezionati come colture starter pure per condurre la fermentazione alcolica, si trovano soprattutto lieviti del genere *Saccharomyces*, in particolare le specie *S. bayanus*, *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (Calugar, et al., 2021; Han & Du, 2023; Lorenzini, et al., 2019). Questi lieviti sono resistenti alla solfitazione del succo (Beech, 1972) e permettono di ottenere note sensoriali più neutre e riconoscibili nel prodotto finito (Cousin, et al., 2017). I criteri utilizzati per la selezione dei ceppi di lievito adatti alla fermentazione sono: elevate produzione di alcol superiori, di acido malico e succinico, bassa produzione di acido piruvico e α -chetoglutarato (indesiderati perché legano l'anidride solforosa SO_2); buona flocculazione; elevata velocità di fermentazione e di tolleranza all'etanolo; ridotta richiesta di vitamine; e bassa produzione di composti negativi in grado di influenzare le proprietà sensoriali del sidro (es. diacetile e acido solfidrico) (Beech, 1972). Le colture starter si presentano solitamente come lieviti secchi attivi, una polvere ottenuta per disidratazione delle cellule tramite essiccamento (Calugar, et al., 2021).

Le fermentazioni condotte con colture starter hanno sostituito quasi completamente, ad esclusione delle produzioni tradizionali, le fermentazioni spontanee; tuttavia, le fermentazioni spontanee, pur non garantendo

costanza nella qualità e nei volumi prodotti, permettono di ottenere sidri con più carattere e più complessi dal punto di vista sensoriale. Nasce così l'esigenza di studiare l'effetto di colture miste selezionate, ossia colture composte da lieviti e batteri di specie e ceppi differenti, ognuna con una definita attività metabolica, che consentono di diversificare i composti aromatici prodotti durante la fermentazione, migliorandone le caratteristiche sensoriali, pur tenendo sotto controllo la resa alcolica (Al Daccache, et al., 2020) . Alcuni lieviti non-*Saccharomyces* associati a *S. cerevisiae* e analizzati per ottenere colture miste sono *Wickerhamomyces anomalus*, *Cyberlindnera saturnus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora osmophila*, *H. uvarum*, *H. valbyensis*, *Starterella bacillaris* e *Zygosaccharomyces bailii* (Calugar, et al., 2021; Lorenzini, et al., 2019). L'aggiunta di *Hanseniaspora* sp. alla coltura mista contribuisce alla formazione di esteri e alcoli, che forniscono note fruttate più spiccate rispetto alle fermentazioni con *Saccharomyces* sp. in coltura pura. Inoltre, la selezione di ceppi non-*Saccharomyces* produttori di fattore killer permette a quest'ultimi di competere e tenere sotto controllo alcuni contaminanti come *Brettanomyces* / *Dekkera*. La coltura mista formata da ceppi di *W. anomalus* e *S. cerevisiae* dona grande complessità al sidro e ne migliora il profilo aromatico (Cousin, et al., 2017). Uno studio ha analizzato le prestazioni di alcuni ceppi in colture pure o miste con *S. cerevisiae* (Lorenzini et al., 2019), dimostrando che *S. uvarum* presenta performance fermentative simili a *S. cerevisiae*, *H. osmophila* ha buone capacità fermentative e completa la fermentazione più rapidamente di *T. delbrueckii*, mentre *Z. bailii* è meno performante di entrambi.

		EC1118	SU3	TD291	HO16	Y4M	YR21	ZB3
1-Butanol	µg/L	75.1 ± 0.9 c	67.4 ± 0.8 d	104.4 ± 3.6 b	163.1 ± 0.7 a	60.9 ± 2.9 e	47.4 ± 0.6 f	67.7 ± 3.2 d
2-Butanol	µg/L	2184.6 ± 186.5 cd	5972.2 ± 184.2 b	1866.1 ± 58.5 d	724.2 ± 35.9 e	2822.4 ± 235.1 c	7371.3 ± 494.1 a	6370.6 ± 253.6 b
3-Methyl-1-butanol	µg/L	16739.3 ± 3084.4 b	36401.7 ± 1104.3 a	13389.7 ± 9.6 bc	10331.0 ± 290.6 c	10869.9 ± 887.7 c	6633.0 ± 332.0 d	16885.8 ± 306.3 b
2-Phenylethyl alcohol	µg/L	14200.6 ± 1029.1 b	62491.7 ± 4733.7 a	8104.3 ± 98.2 c	11000.4 ± 161.1 bc	6473.1 ± 403.6 c	14374.3 ± 1182.6 b	9809.2 ± 422.0 bc
cis-3-Hexen-1-ol	µg/L	12.8 ± 0.8 a	9.5 ± 0.2 b	15.0 ± 0.8 a	9.2 ± 0.8 b	10.3 ± 1.5 b	9.4 ± 0.5 b	8.8 ± 0.1 b
trans-3-Hexen-1-ol	µg/L	26.6 ± 0.5 c	28.0 ± 0.1 bc	32.2 ± 2.3 a	30.2 ± 0.3 ab	29.6 ± 0.8 ab	32.1 ± 0.6 a	29.1 ± 0.4 bc
1-Pentanol	µg/L	7.0 ± 2.2 c	11.4 ± 0.4 b	10.6 ± 0.3 b	16.3 ± 0.9 a	9.1 ± 1.1 bc	9.1 ± 1.1 bc	9.9 ± 1.8 bc
1-Hexanol	µg/L	2011.4 ± 131.8 d	2210.2 ± 51.9 cd	3369.7 ± 229.3 ab	3556.1 ± 16.8 a	3350.6 ± 120.6 ab	2543.1 ± 119.4 c	3201.9 ± 10.4 b
Vanillic alcohol	µg/L	3.6 ± 0.1 cd	1.0 ± 0.8 e	6.5 ± 0.5 a	4.5 ± 0.3 bc	2.8 ± 0.1 d	4.9 ± 0.3 b	5.6 ± 0.2 ab
Benzyl alcohol	µg/L	12.8 ± 0.3 d	7.6 ± 0.2 e	15.9 ± 1.5 bc	18.0 ± 0.1 ab	14.4 ± 0.0 cd	18.1 ± 1.6 ab	18.6 ± 0.6 a
Ethyl butyrate	µg/L	310.2 ± 7.3 a	125.0 ± 1.4 b	35.9 ± 3.2 d	45.1 ± 0.4 c	15.7 ± 0.1 e	34.6 ±	20.7 ± 1.5 e
Ethyl isovalerate	µg/L	1.3 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.1 ab	1.2 ± 0.0 ab	1.1 ± 0.0 ab	1.1 ± 0.0 ab	1.1 ± 0.1 b	1.3 ± 0.0 a
Ethyl hexanoate	µg/L	1297.3 ± 1.1 a	438.4 ± 6.4 b	108.5 ± 1.0 c	37.4 ± 0.2 d	14.3 ± 1.4 de	0.0 e	40.4 ± 28.4 d
Ethyl octanoate	µg/L	662.0 ± 25.3 a	371.5 ± 5.8 b	67.7 ± 1.8 c	20.1 ± 5.2 d	6.1 ± 0.2 d	1.4 ± 0.0 d	9.8 ± 5.7 d
Ethyl decanoate	µg/L	396.3 ± 71.9 a	201.9 ± 16.7 b	277.4 ± 49.6 b	27.3 ± 8.0 c	22.7 ± 2.8 c	4.0 ± 0.9 c	5.2 ± 1.3 c
Ethyl lactate	µg/L	77.3 ± 1.6 d	288.7 ± 0.3 a	51.1 ± 6.7 f	123.1 ± 0.3 c	57.5 ± 2.1 ef	60.9 ± 0.9 e	153.0 ± 0.8 b ±
Ethyl cinnamate	µg/L	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0
Hexyl acetate	µg/L	2081.5 ± 36.9 a	1753.4 ± 22.7 b	5.8 ± 0.9 e	117.0 ± 6.5 cd	151.1 ± 6.1 c	2.4 ± 0.7 e	77.0 ± 12.9 d
Isoamyl acetate	µg/L	7474.6 ± 350.0 b	9206.0 ± 233.3 a	34.3 ± 0.5 e	660.9 ± 38.5 d	3371.4 ± 104.5 c	22.4 ± 2.8 e	118.9 ± 44.6 e
Isovaleric acid	µg/L	426.6 ± 10.0 b	773.3 ± 13.4 a	317.6 ± 4.6 c	177.1 ± 2.9 e	102.5 ± 1.4 f	81.8 ± 1.0 g	254.7 ± 5.9 d
Hexanoic acid	µg/L	6780.8 ± 133.5 a	3964.3 ± 36.0 b	2134.9 ± 86.8 c	743.3 ± 42. e4	888.8 ± 8.2 de	515.3 ± 12.0 f	989.6 ± 6.0 d
Octanoic acid	µg/L	10019.3 ± 171.6 a	6801.9 ± 298.8 b	2499.6 ± 254.1 c	614.7 ± 22.3 d	529.1 ± 8.6 d	233.9 ± 2.4 d	587.0 ± 158.2 d
Linalool	µg/L	1.9 ± 0.4 bc	1.4 ± 0.2 cde	0.7 ± 0.1 e	1.6 ± 0.3 cd	0.9 ± 0.4 de	3.8 ± 0.2 a	2.7 ± 0.1 b
Geraniol	µg/L	6.9 ± 0.3 b	5.4 ± 1.9 bc	2.4 ± 0.2 d	5.3 ± 0.0 bc	3.5 ± 0.1 cd	22.2 ± 1.2 a	1.6 ± 0.3 d
4-Vinyl guaiacol	µg/L	86.7 ± 1.0 a	66.0 ± 3.2 b	10.4 ± 0.5 c	9.8 ± 0.7 c	4.5 ± 0.2 d	4.8 ± 0.2 d	5.7 ± 0.1 d
Benzaldehyde	µg/L	2.4 ± 0.3 bc	3.2 ± 0.4 b	1.1 ± 0.3 c	2.0 ± 0.0 bc	1.4 ± 0.0 bc	2.3 ± 1.7 bc	7.4 ± 0.0 a
3-Hydroxy-β-damascone	µg/L	5.1 ± 0.3 d	6.2 ± 0.2 abc	6.6 ± 0.4 a	5.6 ± 0.3 bcd	4.8 ± 0.2 d	6.3 ± 0.4 ab	5.4 ± 0.0 cd
3-oxo-α-ionolo	µg/L	4.4 ± 0.0 a	1.8 ± 0.1 b	0.9 ± 0.0 d	1.3 ± 0.1 c	0.0 e	0.0 e	0.1 ± 0.0 e
β-Damasconone	µg/L	7.5 ± 0.4 bc	4.7 ± 0.0 d	8.6 ± 0.3 a	6.8 ± 0.2 c	8.5 ± 0.7 a	9.2 ± 0.3 a	6.8 ± 0.5 c

Tabella 4.1. Produzione di alcol superiori, polialcoli ed esteri da parte di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 e dei ceppi *Torulaspora delbrueckii* TD291, *Saccharomyces uvarum* SU3, *Hanseniaspora osmophila* HO16, *Hanseniaspora uvarum* Y4M, *Starterella bacillaris* YR21 e *Zygosaccharomyces bailii* ZB3 in fermentazioni miste in presenza di *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. (Lorenzini, et al., 2019)

Dal punto di vista della formazione di composti aromatici, il miglior produttore di alcoli superiori si è rivelato essere *S. uvarum*, il peggiore *H. uvarum*. I lieviti *Saccharomyces* sono anche i maggiori produttori di esteri acetici, soprattutto acetato di isoamile (7,47 – 9,21 mg/L) e acetato di esile (1,75 – 2,08 mg/L), e acidi grassi. Il contenuto di acido acetico è basso nelle fermentazioni condotte con *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *T. delbrueckii* e *Z. bailii*, mentre risulta alto con *S. bacillaris*. Il miglior produttore di acetato di esile tra i non-*Saccharomyces* è *H. uvarum*, con 151 µg/L (Lorenzini, et al., 2019). La coltura mista composta da *S. bacillaris* e *S. cerevisiae* ha mostrato una crescita significativa nelle prime 24 ore e una elevata produzione di glicerolo, che ha un ruolo importante sulla pienezza e rotondità del gusto in vino e sidro (Calugar, et al., 2021).

Il controllo della temperatura è fondamentale per favorire il metabolismo fermentativo dei lieviti inoculati, in quanto consente di influire sulla composizione del sidro a fine fermentazione e quindi sul profilo aromatico. Secondo lo studio di Cousin e collaboratori (2017), i risultati migliori sono stati ottenuti alla temperatura di 20 °C, che incentiva la produzione di esteri, composti volatili e alcoli. In generale, la fermentazione del sidro richiede temperature non superiori ai 25 °C (Beech, 1972) e non inferiori ai 10 °C (Calugar, et al., 2021). Nella fermentazione studiata da Han e collaboratori (2023), la fermentazione alcolica guidata ha una durata inferiore: il consumo degli zuccheri è completato verso il sesto giorno di fermentazione, diversamente rispetto alla fermentazione spontanea che si conclude attorno al nono giorno (Figura 4.1.); di conseguenza, anche la produzione di etanolo (Figura 4.2.) raggiunge i valori massimi prima rispetto alla fermentazione senza inoculo.

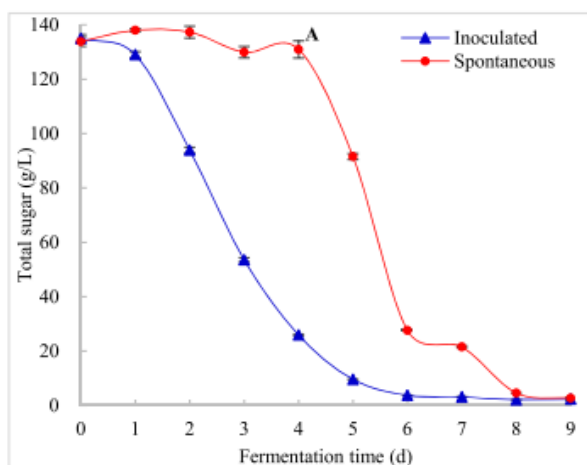


Figura 4.1. Consumo degli zuccheri (Han & Du, 2023)

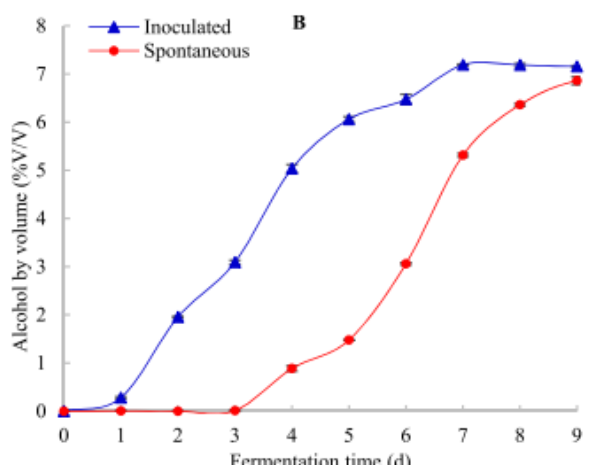


Figura 4.1. Produzione di etanolo (Han & Du, 2023)

I sidri prodotti tramite fermentazione guidata presentano un aumento dell'acidità totale fino al quinto giorno, che poi si stabilizza attorno ai 5,14 g/L (Figura 4.4.); di conseguenza il pH presenta un abbassamento iniziale e una successiva leggera crescita fino a 3,62 (Figura 4.3.). Durante la fermentazione spontanea, invece,

l'acidità si riduce drasticamente sotto i 2 g/L e il pH aumenta a 4,05 al terzo giorno (Figura 4.3. e Figura 4.4.), ma nei giorni successivi l'acidità torna ad aumentare fino a 5,4 g/L e di conseguenza il pH al nono giorno misura 3,69. Questo accade perché i batteri lattici e i lieviti non-*Saccharomyces* hanno un ruolo importante nel catabolismo di acido malico, acido citrico e acido succinico durante le fermentazioni spontanee; durante le fermentazioni guidate, invece, *S. cerevisiae* è il lievito predominante e limita l'impatto dei batteri lattici (Han & Du, 2023).

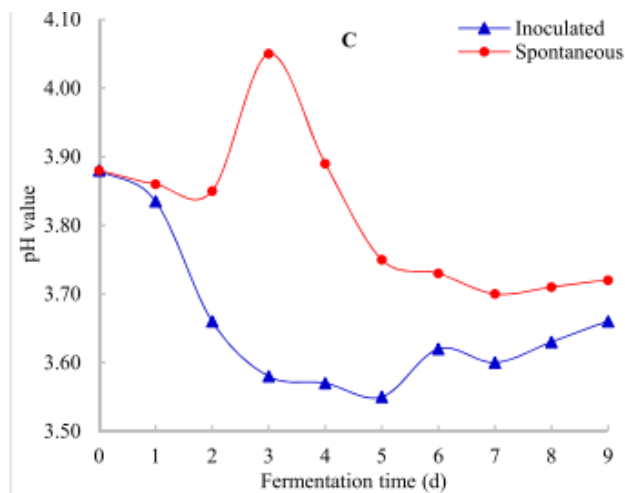


Figura 4.2. Dinamica del pH (Han & Du, 2023)

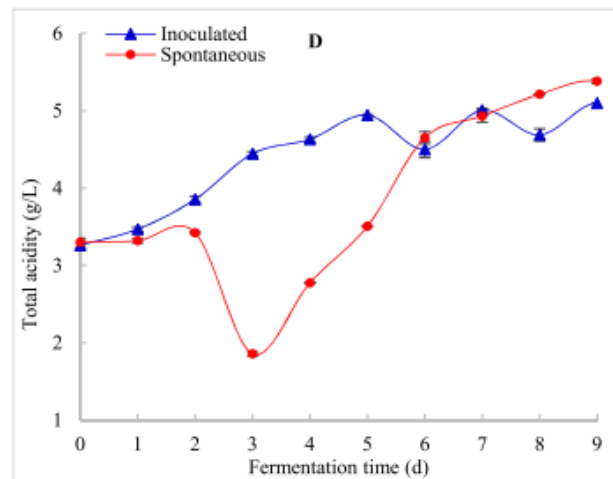


Figura 4.3. Acidità totale (Han & Du, 2023)

4.2 La fermentazione malolattica guidata

A partire dai batteri lattici isolati durante la fermentazione malolattica del vino e del sidro a fermentazione spontanea, sono state selezionate delle specie adatte a convertire l'acido malico presente nel succo in acido lattico e anidride carbonica, in modo da ridurre l'acidità del prodotto finale e renderla meno pungente. Queste sono anche responsabili di alcuni cambiamenti dell'aroma, perché donano complessità con note fruttate, floreali e di frutta secca e riducono il sapore erbaceo (Johansen, 2000).

Tra i batteri selezionati come starter per completare la fermentazione malolattica del sidro, si trovano batteri lattici dei generi *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Secundilactobacillus* e *Pediococcus*. Nella selezione delle colture di batteri lattici, alcuni fattori considerati sono la resistenza ai batteriofagi, la resistenza ai livelli di etanolo e di acidità del sidro e la buona capacità di conversione dell'acido malico (Cousin, et al., 2017; Sánchez, et al., 2010; Zhao, et al., 2014; Puertas, et al., 2014). Le specie presenti durante la fermentazione malolattica spontanea nel sidro tradizionale spagnolo sono state isolate e selezionate in base alle loro caratteristiche, per costituire colture pure o miste utilizzabili come starter per le produzioni industriali. Le specie maggiormente abbondanti e performanti sono risultate essere *Secundilactobacillus collinoides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Lactoplantibacillus*

plantarum, *Leuconostoc mesenteroides* e *Liquorilactobacillus sicerae* (del Campo, et al., 2008; Puertas, et al., 2014; Sàncnez, et al., 2010; Zhao, et al., 2014).

Nelle produzioni industriali di sidro avviene una fermentazione malolattica guidata che solitamente è successiva alla fermentazione alcolica, diversamente rispetto alle produzioni tradizionali delle Asturie e francesi, durante le quali essa avviene contemporaneamente (Johansen, 2000; del Campo, et al., 2008). A causa della solfitazione del succo, la fermentazione malolattica impiega 21 giorni per essere completata se non avviene l'inoculo (Johansen, 2000); nei succhi inoculati, invece, la popolazione dei batteri lattici rimane costante nelle prime 88 ore, per poi attraversare una fase esponenziale che permette di raggiungere concentrazioni di 10^6 CFU/mL e completare la fermentazione malolattica attorno alle 140 ore (sesto giorno dall'inoculo), quando l'88% dell'acido malico è stato convertito in acido lattico, con l'aumento del pH da 3,67 a 3,97 (Sàncnez, et al., 2010).

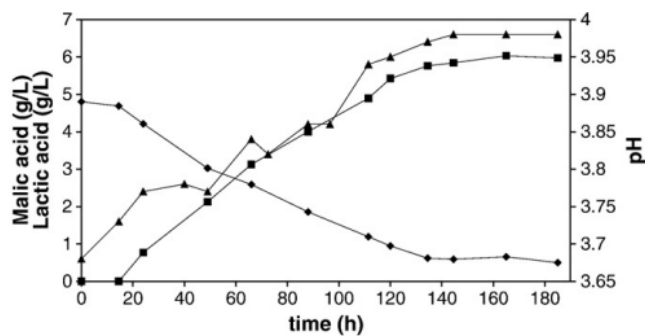


Figura 4.4. Evoluzione dell'acido lattico (■), dell'acido malico (◆) e del pH (▲) durante la fermentazione malolattica guidata (Sàncnez, et al., 2010).

La fermentazione malolattica avviene a temperature di 15 °C, utilizzando un inoculo puro o misto. A questa temperatura, il consumo di acido malico è più lento che a 20 °C o 25 °C, ma avviene comunque completamente. Tuttavia, è preferita la fermentazione a temperatura più bassa, in quanto le temperature più alte possono portare alla formazione di composti volatili indesiderati da parte del metabolismo dei lieviti. Altri fattori di influenza della fermentazione malolattica sono il pH e i ceppi di lieviti coinvolti nella fermentazione alcolica, che possono svolgere un'azione competitiva verso i batteri lattici (Sàncnez, et al., 2010).

Un esempio di starter per la fermentazione malolattica è il ceppo *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Z25. Questo ceppo ha mostrato performance fermentative molto simili alla specie *O. oeni*, il tipico batterio malolattico, e presenta alcune caratteristiche migliori, quali la maggior produzione di glicerolo e di alcol benzilico, che contribuisce all'aroma floreale. Prove sperimentali condotte con questo ceppo hanno dimostrato che durante la sua attività fermentativa, svolta a 25 °C per 12 giorni, il contenuto di acido malico

cala da 4,0 g/L a 0,25 g/L, mentre l'acido lattico passa da 0,99 g/L a 3,50 g/L. Questo ceppo cresce bene con basso pH, è resistente alla solfitazione del succo e alle alte concentrazioni di etanolo presenti nel sidro alla fine della fermentazione alcolica. In generale, questo ceppo ha un ruolo positivo nel rilascio di composti volatili che influenzano l'aroma del sidro, come esteri, alcol superiori e composti carbonilici (Zhao, et al., 2014).

5. LA FERMENTAZIONE ALCOLICA SPONTANEA

La fermentazione alcolica spontanea ha luogo grazie all'azione dei lieviti autoctoni presenti sulle mele e introdotti dalle attrezzature utilizzate per produrre il succo.

Avviene tradizionalmente in botti prodotte con legno di quercia (Cousin, et al., 2017), che hanno il compito di limitare il contatto tra sidro e ossigeno. La presenza di elevate quantità di ossigeno in botte, infatti, favorisce la crescita e il metabolismo dei batteri acetici, i quali hanno la capacità di produrre biofilm sulla superficie (del Campo, et al., 2008) e di ossidare etanolo ad acido acetico (acetificazione). Per questo motivo, le botti che risultano non idonee perché entrate in contatto con l'ossigeno durante la fermentazione e presentano un biofilm microbico, vengono utilizzate per la produzione di aceto di mele (Merwin, et al., 2008), in quanto l'azione dei batteri acetici causa la formazione di elevate concentrazioni di acido acetico, sicuramente superiori a 2,20 g/L; questo valore è stato individuato come limite sopra il quale un sidro non è adatto al consumo (Picinelli, et al., 2000). I batteri acetici individuati come responsabili dell'acetificazione del sidro includono *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter pomorum* (Tyakht, et al., 2021).

Inoltre, un altro problema causato dalla presenza di ossigeno in botte è l'ossidazione di alcuni composti chimici, come ad esempio i composti fenolici (Beech, 1972), che una volta ossidati causano l'imbrunimento del succo e l'aumento delle note amare e astringenti (Johansen, 2000).

Ad oggi, per la produzione di sidro tradizionale si utilizzano ancora botti di legno di quercia con volumi compresi tra i 45000 L e i 90000 L (Morrissey, et al., 2004), ma i nuovi produttori di sidro a fermentazione spontanea sono passati alla fermentazione in contenitori di acciaio inossidabile, materiale non poroso (Cousin, et al., 2017).

5.1 Fattori che influenzano il processo della fermentazione spontanea

La fermentazione spontanea del succo di mela può avvenire, tradizionalmente, in due momenti diversi: la fermentazione precoce parte nel periodo di settembre, con temperature maggiori, mentre la fermentazione tardiva ha luogo in dicembre, con temperature inferiori.

La fermentazione precoce, o *early fermentation*, inizia verso la metà di settembre, quando la temperatura della cantina si aggira attorno ai 20 °C e quella del succo è tra i 14 °C e i 16 °C. Uno studio specifico riporta che la conta iniziale dei lieviti è attorno a $6 \cdot 10^6$ CFU/mL: questo fattore, associato alle alte temperature, determina una fermentazione rapida e tumultuosa, con le temperature che possono raggiungere i 34 – 36 °C e una durata di 12 – 15 giorni (Morrissey, et al., 2004). Le mele utilizzate per il processo sono fresche e non conservate a basse temperature (Keller, et al., 2004).

Le fermentazioni tardive, o *later fermentations*, invece, sono condotte durante il mese di dicembre, quando la temperatura delle cantine scende a 10 – 12 °C e con succo a 12 °C. In questo periodo sono riportate concentrazioni iniziali dei lieviti più basse, generalmente inferiori a $2,5 \cdot 10^6$ CFU/mL. Ciò comporta tempi di fermentazione più prolungati, con temperature che nella fase tumultuosa non superano i 24 °C, di circa 40 giorni per raggiungere l'attenuazione e completare la fermentazione (Morrissey, et al., 2004). In questo caso, le mele sono processate dopo un periodo di conservazione inferiore ai 5 mesi a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C (Keller, et al., 2004).

In generale, la durata delle fermentazioni spontanee è influenzata dalle condizioni ambientali della cantina. Temperature alte (20 – 25 °C) comportano tempi di fermentazione ridotti (1 – 4 settimane) e fermentazioni più impetuose, con un rapido consumo degli zuccheri presenti nel succo; al contrario, con temperature basse (10 – 15 °C) i lieviti necessitano tempi maggiori (1 – 3 mesi) per completare il consumo degli zuccheri e raggiungere l'attenuazione (Johansen, 2000). La fermentazione inizia entro 24 ore dalla pressatura e solitamente la temperatura della cantina non è controllata, bensì dipende dalle condizioni ambientali delle stagioni in cui si attua il processo (Morrissey, et al., 2004).

Tra le due fermentazioni si possono notare differenze microbiologiche non solo dal punto di vista delle concentrazioni, ma anche della composizione e delle specie presenti. Infatti, come riportato nello studio di Morrissey e collaboratori (2004), nelle fermentazioni precoci il 90% dei lieviti identificati durante la conta iniziale appartiene al genere *Hanseniaspora* / *Kloeckera*. Nei primi giorni di fermentazione *Hanseniaspora uvarum* / *Kloeckera apiculata* hanno una fase di crescita esponenziale contemporaneamente a quella di *Saccharomyces cerevisiae*, il quale, a partire dal terzo giorno, diventa il lievito dominante, con concentrazioni al quinto giorno di $8,3 \cdot 10^8$ CFU/mL. Successivamente *S. cerevisiae* decresce, fino a $5 \cdot 10^6$ CFU/mL al giorno 18. Al ventiduesimo giorno, il 90% della popolazione dei lieviti è formato da *Brettanomyces* / *Dekkera* (Figura 5.1.); contestualmente, la produzione di etanolo cresce fino al sedicesimo giorno, per poi arrestarsi (Figura 5.3.).

Analizzando le fermentazioni tardive, invece, si nota come la presenza di *Saccharomyces* sia predominante fino al giorno 35 e la produzione di etanolo cresca fino al giorno 34, associata a una utilizzazione media degli zuccheri inferiore rispetto alle fermentazioni precoci (Figura 5.2. e Figura 5.4.); *Brettanomyces* / *Dekkera* in questo caso non è stato identificato fino al giorno 100 (Morrissey, et al., 2004).

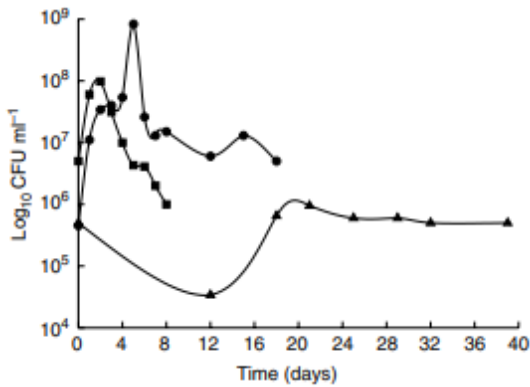


Figura 5.1.

Lieviti durante le fermentazioni precoci: *Hanseniaspora* / *Kloeckera* (■); *Saccharomyces cerevisiae* (●); *Brettanomyces* / *Dekkera* (▲). (Morrissey, et al., 2004)

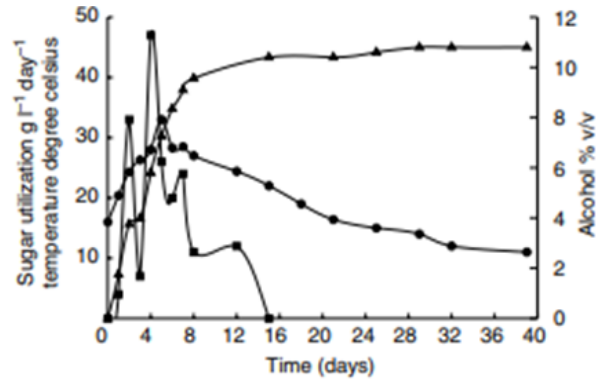


Figura 5.3.

Profilo di una fermentazione precoce: temperatura (■); consumo degli zuccheri (●); etanolo (▲). (Morrissey, et al., 2004)

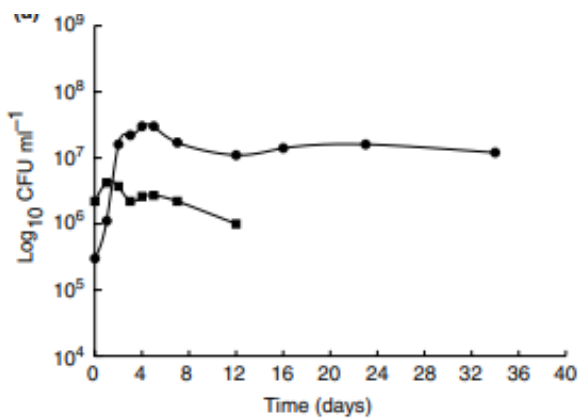


Figura 5.2.

Lieviti durante le fermentazioni tardive: *Hanseniaspora* / *Kloeckera* (■); *Saccharomyces cerevisiae* (●). (Morrissey, et al., 2004)

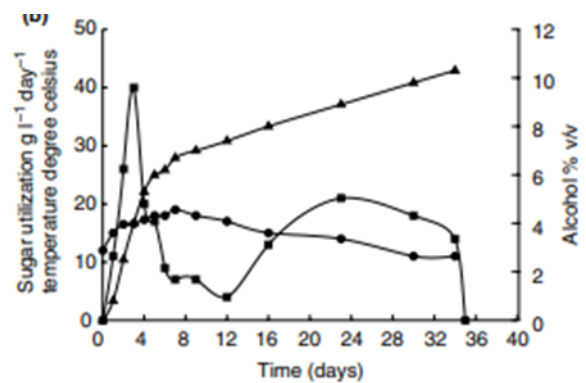


Figura 5.4.

Profilo di una fermentazione tardiva: temperatura (■); consumo degli zuccheri (●); etanolo (▲). (Morrissey, et al., 2004)

5.2 Lieviti e diversità

Le tecnologie e le attrezzature utilizzate per la produzione del sidro hanno una grande influenza sulla composizione microbiologica e di conseguenza sulla qualità sensoriale del prodotto finito. Le presse e l'attrezzatura di cantina, come il mulino per la macinazione e i tubi per pompare il succo nelle botti, non sono sterili e portano contaminazioni al succo di mela. Lo studio effettuato in una cantina irlandese da Morrissey e collaboratori (2004) ha analizzato la comunità microbica autoctona di cantina, dimostrando la presenza di lieviti del genere *Saccharomyces* sulle presse e sull'attrezzatura; le concentrazioni rientrano nel range compreso tra $5 \cdot 10^2$ CFU/cm² e $4,2 \cdot 10^4$ CFU/cm². Queste analisi hanno permesso di comprendere il motivo

per cui i lieviti del genere *Saccharomyces*, solitamente poco presenti o assenti nelle analisi condotte sulle mele prima di macinazione e pressatura, vengano identificati nel succo di mela processato nelle cantine.

Il metodo di pressatura è un altro fattore che influisce sulla composizione microbica del succo di mela. Nelle cantine delle Asturie sono state sviluppate due diverse tecnologie, che hanno mostrato risultati diversi. Come riportato dal lavoro di Suárez Valles e collaboratori (2007), il metodo tradizionale, che prevede un ciclo discontinuo di pressatura di 3 giorni con presse a piastre e telaio a 12 strati, determina la presenza di lieviti del genere *Saccharomyces* (tra il 20% e il 50% degli isolati), oltre a vari non-*Saccharomyces*, identificati principalmente in *Hanseniaspora* (tra il 40% e il 66% degli isolati) e *Metschnikowia* (10%–14%); in particolare, le specie più presenti nel succo di mela sono *H. uvarum*, *H. valbyensis*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima*, *S. bayanus* e *S. cerevisiae* (Valles, et al., 2007). I cicli lenti di pressatura, infatti, favoriscono lo sviluppo e la crescita dei lieviti provenienti dalle attrezzature.

Attraverso il metodo alternativo, che viene portato a termine in 8 ore da una pressa pneumatica che opera in continuo, i lieviti dominanti isolati dal succo sono i non-*Saccharomyces*, nello specifico *Hanseniaspora* (66%–84% degli isolati), *Metschnikowia* (16%–32%) e *Pichia* (2%). Le specie identificate sono *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *H. osmophila*, *M. pulcherrima* e *P. guilliermondii* (Valles, et al., 2007).

Yeast species	2001								2002							
	Pneumatic pressing				Traditional pressing				Pneumatic pressing				Traditional pressing			
	Sampling day				Sampling day				Sampling day				Sampling day			
	1	4	16	28	1	4	16	28	1	4	7	20	1	4	7	28
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	44	2		36	36	38	78	94			4		4	8		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	12	2							64	6	12		34			
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	28			2	30	10	12		2				2			
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	16	10			14	4			32	2	4		10	2		
<i>Pichia guilliermondii</i>									2							
<i>Saccharomyces bayanus</i>		82	100	8	18	38	8	6		32	70	26	46	48	36	28
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		4		54	2	10	2			60	10	74	4	42	64	72

Tabella 5.1. Distribuzione percentuale delle specie di lieviti durante la fermentazione spontanea in due annate di produzione, utilizzando un sistema di pressatura tradizionale e uno pneumatico. (Valles, et al., 2007)

Le concentrazioni microbiche nei succhi di mela processati e analizzati prima della fermentazione sono variabili e dipendono dagli studi presi in considerazione. La conta dei lieviti totali nei succhi può variare da $3 \cdot 10^3$ CFU/mL, nel caso di succo irlandese leggermente solfitato (Morrissey, et al., 2004), fino a $4,1 \cdot 10^7$ CFU/mL nel succo asturiano non solfitato e ottenuto con metodi tradizionali di pressatura (Cabranes, et al., 1990). Uno studio condotto sul succo utilizzato per la produzione di sidro francese (Coton, et al., 2006) ha dimostrato la presenza di lieviti in concentrazioni comprese tra $2 \cdot 10^5$ CFU/mL e $2 \cdot 10^7$ CFU/mL. Si può dunque

dedurre come le fasi di macinazione, pressatura e solfitazione influenzino le concentrazioni: la solfitazione riduce la quantità di lieviti e anche la diversità; macinazione e pressatura, invece, comportano l'introduzione di contaminazioni e di conseguenza l'aumento sia della conta totale, che della diversità.

Durante la produzione di sidri inglesi, le specie più presenti durante la fermentazione sono *K. apiculata*, *S. cerevisiae* e *Saccharomyces ludwigii*. Per i sidri francesi prodotti in Bretagna e Bassa Normandia, invece, le specie maggiormente rappresentate sono *S. cerevisiae*, *H. valbyensis* e *M. pulcherrima*. I sidri delle Asturie e dei Paesi Baschi sono caratterizzati da *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *K. apiculata*. Lieviti comuni ma con concentrazioni inferiori sono *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torula* sp., *Starmerella stellata*, *Candida sake*, *Pichia fermentans*, *Brettanomyces* e *Hansenula* (Calugar, et al., 2021; Johansen, 2000; Suàrez Valles, et al., 2007). Uno studio sul sidro tradizionale irlandese ha individuato *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima*, *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *Schwanniomyces polymorphus*, *H. uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *P. fermentans*, *P. guillermondii*, *Saccharomyces ludwigii* come principali specie responsabili della fermentazione (Morrissey, et al., 2004). Uno studio condotto sul succo prodotto da mele coltivate in Russia (Tyakht, et al., 2021) ha confermato la presenza di *Brettanomyces / Dekkera*, *P. terricola*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *Metschnikowia*, oltre a *C. ethanolica* e *P. kudriavzevii*. Uno studio sul succo appena processato presso un impianto nelle Asturie (Cabranes, et al., 1990) ha isolato *S. cerevisiae*, *C. vartiovaarae*, *B. naardenensis* e *P. membranifaciens*. Un altro studio, sempre condotto in una cantina asturiana, questa volta su succhi processati in due annate diverse, ha mostrato la presenza predominante di non-*Saccharomyces*, su tutti *H. valbyensis*, *H. uvarum* e *M. pulcherrima*, nel primo anno; nel secondo anno, invece, sono stati identificati *C. parapsilosis*, *H. valbyensis* e *P. guillermondii* come principali colonizzatori del succo (Pando Bedriñana, et al., 2010). I lieviti isolati nello studio sul sidro francese (Coton, et al., 2006) sono stati *D. anomala*, *C. sake*, *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *M. pulcherrima*, *Kregervanrija delftensis*, *S. bayanus* e *S. cerevisiae*, oltre ad alcuni ceppi di *C. oleophila*, *S. stellata*, *C. tropicalis*, *Cyberlindnera misumaiensis*, *P. nakasei* e *Lachancea cidri*.

In generale, dunque, i generi di lieviti isolati a partire dal succo di mela processato e destinato a fermentazione spontanea sono appartenenti ai seguenti generi: *Saccharomyces*, lieviti con alto metabolismo fermentativo non presenti sulle mele fresche, ma introdotti attraverso le attrezzature di cantina; *Hanseniaspora*, lieviti apiculati con bassa attività fermentativa e poco alcol-tolleranti; *Metschnikowia* e *Pichia*, lieviti apiculati con metabolismo ossidativo (Al Daccache, et al., 2020); lieviti dei generi *Brettanomyces*, *Candida* e *Starmerella*, spesso presenti, che possono avere una influenza negativa dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche, rispettivamente durante la fase di maturazione e di conservazione (Cabranes, et al., 1990).

Le differenze tra le composizioni microbiche dei diversi succhi si possono ricondurre a vari fattori, tra cui l'area geografica dei meleti e delle cantine, le condizioni climatiche dell'annata e della raccolta, le varietà di mele utilizzate, la carica microbica delle acque di irrigazione, il periodo e le condizioni di conservazione e le

attrezzature utilizzate (Calugar, et al., 2021). Un esempio di ciò viene mostrato nello studio condotto sul sidro naturale spagnolo prodotto in una cantina delle Asturie (Suàrez Valles, et al., 2007), in cui vengono analizzate le specie di lievito presenti. *S. cerevisiae*, in questo caso, non è la specie dominante durante tutta la fermentazione, bensì solamente nelle fasi finali. I ceppi dominanti appartengono alla specie *S. bayanus*: questo lievito è spesso associato a ceppi criotolleranti e trova le condizioni climatiche ideali per lo sviluppo, grazie alle temperature fresche del nord della Spagna; la sua presenza durante le fermentazioni tardive permette di completare la fermentazione alcolica del sidro anche con temperature inferiori ai 15 °C. Di conseguenza, viene dimostrata l'influenza del fattore dell'area geografica.

Succhi con bassa acidità titolabile, alto pH e alto contenuto zuccherino sono degli ambienti maggiormente favorevoli per i lieviti attivi durante la fermentazione alcolica e per questo i succhi con tali caratteristiche presentano solitamente maggiori diversità e concentrazioni microbiche. Inoltre, la diversità dipende anche dalle capacità di adattamento e di resistenza a condizioni che si presentano durante il processo, come l'aggiunta di solfiti, la produzione di etanolo e anidride carbonica, il calo della disponibilità di nutrienti, oltre ai tassi di crescita, alla velocità di assimilazione degli zuccheri e la capacità di competere con altre specie (Cousin, et al., 2017).

5.3 Dinamica delle fermentazioni alcoliche spontanee

Le dinamiche delle fermentazioni spontanee sono molto varie e dipendenti dalla diversità microbica del succo processato, ma mostrano andamenti simili. In generale, presentano un iniziale sviluppo di specie di lieviti non-*Saccharomyces*, dominanti nelle prime fasi successive alla pressatura; questa fase è definita *fruit yeast phase* (Morrissey, et al., 2004) e prevede la presenza predominante dei lieviti dei generi *Hanseniaspora / Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Torulaspora* e *Pichia*, i quali contribuiscono positivamente alla formazione di composti attivi sul profilo aromatico del sidro (Han & Du, 2023; Valles, et al., 2007). Con l'aumento della concentrazione di etanolo oltre il 4%, i lieviti non-*Saccharomyces* presentano un arresto dei tassi di crescita e vengono rimpiazzati da *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, i quali conducono la fase di fermentazione alcolica essendo forti fermentatori e maggiormente alcol-tolleranti (Morrissey, et al., 2004). La fermentazione malolattica può avvenire contemporaneamente alla fermentazione alcolica oppure successivamente, ad opera dei batteri lattici (del Campo, et al., 2008; Johansen, 2000). Dopo il raggiungimento dell'attenuazione, ossia il completamento del consumo degli zuccheri, ha luogo la fase di maturazione, durante la quale i lieviti dominanti appartengono al genere *Brettanomyces / Dekkera* (Morrissey, et al., 2004).

Si possono presentare dinamiche diverse sia a seconda del periodo in cui si svolge il processo, se avvengono dunque fermentazioni precoci o tardive, che in base alle tecnologie utilizzate durante il processo, cioè se si

applica il metodo tradizionale oppure il metodo alternativo e se avviene una chiarifica spontanea o enzimatica.

Le fermentazioni precoci iniziano attorno alla metà di settembre, quando la temperatura è di circa 20 °C. Le fermentazioni precoci sono fermentazioni più rapide: grazie alle alte temperature, gli zuccheri vengono consumati in 12 – 15 giorni. Un esempio di fermentazione precoce è riportato in figura 5.1. In questo caso la conta iniziale dei lieviti è di $6 \cdot 10^6$ CFU/mL; il 90% degli isolati sono ceppi appartenenti al genere *Hanseniaspora / Kloeckera*. Le prime 24 ore corrispondono alla fase di latenza; a questa segue la fase esponenziale di crescita sia di *Hanseniaspora / Kloeckera* che di *Saccharomyces*, in particolare *S. cerevisiae*, durante la quale la temperatura del succo passa da 16 °C a 20 – 24 °C. Le concentrazioni raggiunte sono rispettivamente 10^8 CFU/mL e $5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Al terzo giorno, come conseguenza dell'aumento del contenuto di etanolo a concentrazioni superiori al 4%, le specie del genere *Hanseniaspora / Kloeckera* incontrano una fase di decrescita; di conseguenza, *S. cerevisiae* diventa il lievito dominante. Questo raggiunge un picco di concentrazione di $8,3 \cdot 10^8$ CFU/mL al quinto giorno, in corrispondenza della temperatura massima misurata, che si attesta sui 35 °C. Dal quinto giorno, *S. cerevisiae* subisce una fase di decrescita nelle concentrazioni fino a raggiungere $1,3 \cdot 10^7$ CFU/mL in corrispondenza dell'attenuazione, che avviene al quindicesimo giorno dall'inizio della fermentazione. Attorno al diciottesimo giorno, la popolazione di *S. cerevisiae* è ridotta a $5 \cdot 10^6$ CFU/mL, mentre i lieviti del genere *Brettanomyces / Dekkera* contemporaneamente presentano un picco di crescita, fino a 10^6 CFU/mL, per diventare il lievito dominante dopo il ventiduesimo giorno, quando gli isolati appartenenti a questo genere rappresentano il 90% del totale dei lieviti presenti. Dal venticinquesimo giorno inizia la fase di maturazione, che dura circa 18 mesi; al nono mese di maturazione, la concentrazione di *Brettanomyces / Dekkera* è ancora maggiore di $3 \cdot 10^3$ CFU/mL. Analizzando i livelli di etanolo prodotti durante la fermentazione, si può notare una crescita costante dal primo giorno fino all'ottavo, dove presenta concentrazioni del 9% v/v, con un rallentamento tra l'ottavo e il sedicesimo (Figura 5.3.); dal sedicesimo giorno in poi, in corrispondenza del consumo completo degli zuccheri presenti, il contenuto di etanolo si stabilizza attorno a 10,5% v/v (Morrissey, et al., 2004).

Le fermentazioni tardive, invece, sono condotte nel mese di dicembre quando la temperatura della cantina è di 10 – 12 °C; poiché avvengono a temperature inferiori, le fermentazioni tardive presentano un consumo degli zuccheri più lento, oltre che minor diversità nella composizione microbica della popolazione dominante. Un esempio di fermentazione tardiva è riportato in figura 5.2. in questo caso, la conta totale iniziale dei lieviti è inferiore rispetto alle fermentazioni precoci, con concentrazioni di $2,5 \cdot 10^6$ CFU/mL. La popolazione dei lieviti non-*Saccharomyces*, sempre rappresentata da *Hanseniaspora / Kloeckera*, rimane dominante fino al secondo giorno e raggiunge una concentrazione massima di $6 \cdot 10^6$ CFU/mL alla fine del primo giorno di fermentazione. *S. cerevisiae*, dominante dal secondo giorno, a causa delle temperature inferiori non arriva alle concentrazioni massime riscontrate nella fermentazione precoce, fermandosi al sesto giorno a $2,5 \cdot 10^7$

CFU/mL. Diversamente rispetto alla precedente fermentazione, gli zuccheri vengono consumati completamente dopo 35 giorni dall'inizio (Figura 5.4.). Dal dodicesimo giorno *Hanseniaspora / Kloeckera* non vengono più isolati, mentre la popolazione di *S. cerevisiae* rimane costante tra il quindicesimo e il trentacinquesimo giorno, con una concentrazione di $1,5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Durante lo stesso periodo di tempo, anche l'andamento della temperatura mostra un nuovo picco, al ventitreesimo giorno, di 22 °C, per poi calare. Il consumo giornaliero di zuccheri non supera mai i 20 g/L durante il processo. I lieviti del genere *Brettanomyces / Dekkera* non sono isolati fino al centesimo giorno di maturazione. Analizzando i livelli di etanolo durante la fermentazione, si nota una crescita rapida del contenuto nel sidro fino al sesto giorno e al raggiungimento del 7% v/v; successivamente, il contenuto di etanolo continua ad aumentare più lentamente, fino al 10% v/v dopo 35 giorni (Morrissey, et al., 2004).

Si può notare come il contenuto alcolico finale del sidro sia molto simile tra le due fermentazioni. Ciò suggerisce che in entrambi i casi gli zuccheri presenti inizialmente nel succo di mela sono stati completamente fermentati. Le differenze tra le due fermentazioni sono relative a:

- (a) Ai tempi necessari per raggiungere l'attenuazione e il contenuto alcolico del 10% v/v, misurati in 15 giorni per la precoce e 35 giorni per la tardiva;
- (b) Alle dinamiche delle popolazioni dei lieviti durante il processo di maturazione associato alla presenza di *Brettanomyces / Dekkera* (che inizia al giorno 25 nella precoce, mentre attorno al giorno 100 nella tardiva);
- (c) Alle concentrazioni massime alla fine delle rispettive fasi esponenziali di *Hanseniaspora / Kloeckera* (10^8 CFU/mL in precoce, $6 \cdot 10^6$ CFU/mL in tardiva) e *S. cerevisiae* ($8,3 \cdot 10^8$ CFU/mL in precoce, $2,5 \cdot 10^7$ CFU/mL nella tardiva);
- (d) Alle temperature massime raggiunte durante la fermentazione, misurate in 47 °C nella precoce e in 40 °C nella tardiva;
- (e) Ai picchi di consumo giornaliero degli zuccheri, più alti nella precoce rispetto alla tardiva, rispettivamente 33 g/L e 20 g/L (Morrissey, et al., 2004).

Dal punto di vista delle tecnologie di produzione, è stata rilevata una differenza nella composizione microbica iniziale tra il metodo tradizionale, che prevede l'utilizzo di presse meccaniche con cicli di pressatura di 3 giorni e fermentazione in botti di legno di quercia, e il metodo alternativo, pressatura più rapida conclusa in 8 ore con una pressa pneumatica e fermentazione in tank di acciaio inossidabile. Il metodo tradizionale è adottato nelle Asturie per la produzione del *sidra natural*, che prevede fermentazione e chiarifica spontanee e pressatura meccanica con cicli di 3 giorni. Il metodo alternativo viene proposto come tecnologia innovativa per velocizzare il processo di pressatura dai produttori moderni. In entrambi i casi, viene adottata la chiarifica spontanea del succo prima della fermentazione.

Uno studio specifico riporta che la conta totale iniziale dei lieviti ha mostrato concentrazioni di $4,45 \cdot 10^6$ CFU/mL nei succhi processati con il metodo tradizionale, presentando principalmente lieviti non-*Saccharomyces*, in particolare *H. uvarum*, *K. apiculata* e *Kodamaea ohmeri*. Durante la fase esponenziale, in corrispondenza della fermentazione tumultuosa, la concentrazione dei lieviti raggiunge il picco massimo, quantificato in $1,90 \cdot 10^7$ CFU/mL; le specie dominanti a questo punto appartengono al genere *Saccharomyces*, con *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, *Lachancea kluyveri*, oltre a *K. apiculata*. Con l'inizio della fase stazionaria, la conta passa da $1,23 \cdot 10^7$ CFU/mL a $3,38 \cdot 10^6$ CFU/mL, che corrisponde al raggiungimento dell'attenuazione. Durante la fermentazione malolattica, la concentrazione dei lieviti scende a $7,07 \cdot 10^3$ CFU/mL ed è formata solamente da ceppi di *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, mentre all'inizio della maturazione, in corrispondenza dell'imbottigliamento, la concentrazione decresce ancora, arrivando a $8,31 \cdot 10^2$ CFU/mL e presentando ceppi di *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *C. pelliculosa* (che si ritiene essere un contaminante introdotto durante l'imbottigliamento) (Cabranes, et al., 1990).

Invece, attraverso il metodo alternativo di pressatura, la conta iniziale dei lieviti è quantificata in $1,31 \cdot 10^6$ CFU/mL e le analisi genetiche mostrano la presenza predominante di *L. kluyveri*. Durante la fermentazione tumultuosa, la concentrazione dei lieviti arriva ad un massimo di $4,70 \cdot 10^7$ CFU/mL; la composizione in questo caso trova *S. cerevisiae* e *S. bayanus* come specie dominanti e presenza di *K. apiculata*. A questa fase, seguono quelle stazionaria e di decrescita, con valori rispettivamente di $4,0 \cdot 10^7$ CFU/mL e $3,4 \cdot 10^6$ CFU/mL. In corrispondenza della fermentazione malolattica, la concentrazione dei lieviti è di $3,3 \cdot 10^6$ CFU/mL, con dominanza dei ceppi di *S. cerevisiae*. All'imbottigliamento, la conta misura $7,25 \cdot 10^3$ CFU/mL; anche in questo caso tutti i ceppi isolati appartengono alla specie *S. cerevisiae* (Cabranes, et al., 1990).

Si possono notare alcune differenze tra le due dinamiche: tramite il metodo alternativo, si raggiunge una concentrazione massima superiore ($4,70 \cdot 10^7$ CFU/mL, rispetto a $1,90 \cdot 10^7$ CFU/mL) e in generale le concentrazioni in tutte le fasi della fermentazione risultano superiori rispetto a quelle misurate nel sidro prodotto con metodo tradizionale. Dal punto di vista della composizione delle specie di lieviti, nel succo processato con metodo tradizionale e nelle prime fasi della fermentazione, sono isolati lieviti non-*Saccharomyces* (*K. ohmeri*, *K. apiculata* e *H. uvarum*) responsabili della *fruit yeast phase*, fase in cui questi lieviti producono composti attivi sul profilo aromatico del sidro.

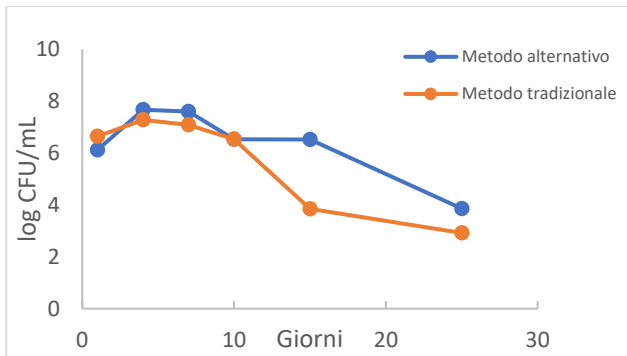


Figura 5.5. Dinamica delle fermentazioni con metodo tradizionale e alternativo (dati di Cabranes e collaboratori, 1990).

Uno studio condotto nel 2007 in una cantina delle Asturie (Valles, et al., 2007) ha identificato delle specie di lieviti differenti rispetto a quelle riportate nello studio sul sidro tradizionale asturiano condotto da Cabranes e collaboratori (1990). Secondo i dati raccolti dai campioni di succo ottenuto con il metodo tradizionale nel corso dell'annata 2002, al primo giorno, corrispondente all'ottenimento del succo dopo la pressatura, il 50% degli isolati appartiene al genere *Saccharomyces*, con 46% *S. bayanus* e 4% *S. cerevisiae*, il 40% *Hanseniaspora*, con 34% *H. uvarum*, 4% *H. valbyensis* e 2% *H. osmophila*, e 10% *M. pulcherrima*. Al quarto giorno, che corrisponde con la fase di inizio della fermentazione, *Saccharomyces* è predominante con il 90%, 48% *S. bayanus* e 42% *S. cerevisiae*, seguito da *H. valbyensis* 8% e *M. pulcherrima* 2%. Durante la fase tumultuosa, ossia al settimo giorno, il 100% degli isolati appartiene a *Saccharomyces*, 64% *S. cerevisiae* e 36% *S. bayanus*. L'attenuazione viene raggiunta dopo 28 giorni e a questo punto gli isolati identificati nel sidro sono 72% *S. cerevisiae* e 28% *S. bayanus*. Il pH finale del sidro misura 3,77 e la concentrazione di etanolo 6,3% v/v.

Il succo ottenuto con le mele della stessa annata, ma con metodo alternativo di pressatura, ha fornito dati differenti. Nel succo appena processato, il 66% degli isolati appartiene al genere *Hanseniaspora*, con 64% *H. uvarum* e 2% *H. osmophila*, oltre al 32% *M. pulcherrima* e 2% *P. guillermondii*. All'inizio della fermentazione, il genere *Saccharomyces* è dominante con il 92% degli isolati (60% *S. cerevisiae* e 32% *S. bayanus*), seguito da 6% *H. uvarum* e 2% *M. pulcherrima*; durante la fermentazione tumultuosa, corrispondente al settimo giorno, l'80% degli isolati è una specie di *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* 10% o *S. bayanus* 70%, mentre il 16% è *Hanseniaspora*, con 12% *H. uvarum* e 4% *H. valbyensis*, e 4% *M. pulcherrima*. L'attenuazione viene raggiunta dopo 20 giorni e a questo punto gli isolati identificati sono al 74% *S. cerevisiae* e al 26% *S. bayanus*; il pH del sidro risulta 3,67 e la concentrazione di etanolo 6,6% v/v.

Lo studio condotto sul sidro naturale delle Asturie (Valles, et al., 2007) dimostra dunque come i due metodi di pressatura influenzino in modo diverso la composizione dei lieviti e di conseguenza la fermentazione. Il metodo tradizionale, come già descritto in precedenza, introduce nel succo specie di *Saccharomyces*, mentre tramite il metodo alternativo, gli isolati di questo genere appaiono solo ad inizio fermentazione. Ciò

suggerisce che sulle mele non siano presenti *S. cerevisiae* o *S. bayanus*. In entrambi i casi, *Saccharomyces* è il genere dominante durante la fermentazione, con *S. cerevisiae* che diventa la specie più isolata nelle fasi finali, quando la concentrazione di etanolo è alta. Il pH risulta leggermente più alto con il metodo tradizionale, mentre il contenuto di etanolo leggermente inferiore rispetto al metodo alternativo.

Considerando la chiarifica come fattore per valutare la dinamica di una fermentazione, si possono notare delle differenze nella conta dei lieviti tra un sidro ottenuto da succo sottoposto a chiarifica spontanea e uno sottoposto a chiarifica enzimatica. Lo studio condotto su campioni di sidro asturiano (Cabranes, et al., 1990) ha dimostrato che la concentrazione iniziale dei lieviti nel succo appena ottenuto è identica e pari a $4,45 \cdot 10^6$ CFU/mL, con il 70% degli isolati appartenenti alla specie *K. apiculata*, 20% *K. ohmeri* e 10% *H. uvarum*. Durante la fermentazione tumultuosa, la conta dei lieviti è maggiore nei campioni sottoposti a chiarifica spontanea, con $1,90 \cdot 10^7$ CFU/mL rispetto a $1,54 \cdot 10^7$ CFU/mL di quella enzimatica; anche la composizione varia: con chiarifica spontanea l'80% degli isolati sono ceppi di *S. cerevisiae*, 10% *L. kluyveri* e 10% *K. apiculata*, mentre con chiarifica enzimatica 50% ceppi di *S. cerevisiae* e 50% *K. apiculata*. Durante la fase stazionaria si notano piccole differenze tra i due campioni, con concentrazioni simili. Dall'inizio della fermentazione malolattica, però, la concentrazione di lieviti nei campioni sottoposti a chiarifica enzimatica si presenta molto superiore rispetto a quella spontanea, rispettivamente $8,91 \cdot 10^5$ CFU/mL e $7,07 \cdot 10^3$ CFU/mL, così come varia la composizione, rispettivamente 90% ceppi di *S. cerevisiae* e 10% *K. apiculata* rispetto al 100% di ceppi di *S. cerevisiae*. Allo stesso modo anche dopo l'imbottigliamento la concentrazione dei campioni con chiarifica enzimatica rimane superiore, $1,12 \cdot 10^4$ CFU/mL contro $8,31 \cdot 10^2$ CFU/mL. Si può quindi dedurre che tramite la chiarificazione enzimatica le concentrazioni dei lieviti nelle fasi finali della fermentazione risultano generalmente superiori rispetto a quelle ottenute tramite chiarifica spontanea; al contrario, durante la fermentazione tumultuosa, la conta dei lieviti risulta leggermente superiore con la chiarifica spontanea.

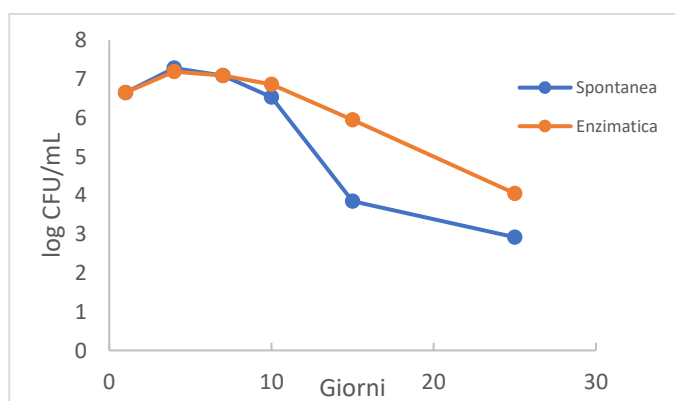


Figura 5.6. Dinamica delle fermentazioni con chiarifica spontanea e enzimatica (dati di Cabranes e collaboratori, 1990).

5.4 Prodotti metabolici durante la fermentazione alcolica spontanea del sidro

5.4.1 Consumo degli zuccheri e produzione di etanolo

Durante la fermentazione alcolica del sidro, i lieviti coinvolti utilizzano gli zuccheri presenti nel succo di mela per la produzione di energia. Le reazioni coinvolte durante questo processo portano all'espulsione dalla cellula di etanolo e anidride carbonica, che sono i prodotti di scarto derivati dalla conversione degli zuccheri. Il contenuto alcolico dei sidri tradizionali delle Asturie è stato quantificato tra 5,3% e 6,5% v/v (Picinelli, et al., 2000). Esistono però anche altri prodotti derivati dal metabolismo della cellula di lievito formati durante la fermentazione; questi sono detti metaboliti secondari e contribuiscono, in associazione ai composti già presenti naturalmente nel succo di mela, alla formazione del profilo aromatico del sidro. All'aroma primario determinato dalla composizione chimica iniziale del succo, dunque, si aggiungono durante la fermentazione, sia alcolica che malolattica, gli aromi secondari e durante la maturazione gli aromi terziari. Non tutti i metaboliti volatili che compongono gli aromi hanno un impatto positivo sulle caratteristiche organolettiche del sidro: alcuni lieviti possono, durante la fermentazione, produrre aromi indesiderati che influenzano negativamente il profilo aromatico (Al Daccache, et al., 2020). Inoltre, i lieviti presentano consumi diversi degli zuccheri del succo, con differenti dinamiche di fermentazione e livelli di tolleranza all'etanolo.

I lieviti presenti nel succo producono etanolo a partire dagli zuccheri, utilizzando glucosio, fruttosio e saccarosio come fonti di carbonio (Cousin, et al., 2017). Questo processo di conversione degli zuccheri avviene in due fasi:

- Glicolisi o via di Embden-Meyerhof-Parnas, consiste in una serie di passaggi e reazione chimiche mediate da vari enzimi che hanno come obiettivo la formazione di molecole di ATP, adenosintrifosfato, che è una molecola utilizzata dalle cellule per conservare l'energia sotto forma di legami con i gruppi fosforici. La molecola ottenuta come risultato di queste reazioni è il piruvato.
- Fermentazione alcolica: durante la fermentazione alcolica, il piruvato prodotto tramite le reazioni di glicolisi viene trasformato in acetaldeide dall'enzima piruvato decarbossilasi, che rilascia una molecola di anidride carbonica. L'acetaldeide viene successivamente ridotta a etanolo grazie all'enzima alcol deidrogenasi, che permette l'ossidazione del NADH che era stato precedentemente ridotto a NAD⁺ durante la glicolisi.

La produzione di etanolo è influenzata dalla quantità di zuccheri presenti nel succo e dalla composizione dei lieviti; l'assenza di *Saccharomyces* potrebbe essere un problema per la produzione di sidro, in quanto i lieviti non-*Saccharomyces* mostrano una bassa tolleranza alle alte concentrazioni di etanolo e questo potrebbe portare a fermentazioni non complete con possibile sviluppo di microrganismi deterioranti che sfruttano gli zuccheri residui come fonte per il loro metabolismo. Durante la fermentazione alcolica del sidro, circa il 95%

degli zuccheri viene trasformato in etanolo e anidride carbonica, l'1% in materiale cellulare e il 4% in altri composti chimici (Calugar, et al., 2021). L'etanolo è il composto volatile maggiormente presente nel sidro; dona corpo alla bevanda, riduce l'acidità apparente aumentandone la dolcezza e dona una sensazione di morbidezza e rotondità al palato, contribuendo all'aroma finale (Picinelli, et al., 2000). Svolge inoltre un'azione antimicrobica verso molti batteri deterioranti e patogeni. La presenza di lieviti non-*Saccharomyces* durante la fermentazione permette di ridurre il contenuto alcolico finale dell'1 – 2%, in quanto minori produttori di etanolo; ciò è in sintonia con le preferenze dei consumatori, che negli ultimi anni prediligono bevande con basso grado alcolico (Al Daccache, et al., 2020).

L'etanolo e l'anidride carbonica prodotti con la fermentazione alcolica vengono rilasciati dal lievito nel sidro durante il processo, determinando il livello alcolico del prodotto finale. Durante la fermentazione spontanea, i tempi necessari per il consumo degli zuccheri e la conseguente produzione di etanolo sono mediamente più lunghi rispetto alla fermentazione guidata (Figura 4.1. e 4.2.). Gli zuccheri vengono fermentati quasi completamente durante il processo di produzione del sidro, ma rimangono alcuni zuccheri residui, responsabili della dolcezza più o meno marcata dei sidri. Nel sidro prodotto nelle Asturie, ad esempio, uno studio condotto su quattro annate produttive (Picinelli, et al., 2000) ha dimostrato la presenza di fruttosio in concentrazioni comprese tra 0,15 g/L e 0,94 g/L.

5.4.2 Produzione di acidi organici, acidi grassi e cambiamenti del pH

La formazione di acidi organici e acidi grassi non avviene esclusivamente durante la fermentazione malolattica ad opera dei batteri lattici, ma anche durante la fermentazione alcolica, come metaboliti secondari delle cellule di lievito. Gli acidi grassi, durante la crescita della cellula, vengono prodotti per favorire la liberazione del Coenzima A e possono essere esterificati per la biosintesi di fosfolipidi di membrana. La concentrazione degli acidi grassi nel sidro dipende non solo dal metabolismo dei lieviti, ma anche dalla varietà delle mele utilizzate e dal loro grado di maturazione. Le concentrazioni maggiori di acidi grassi sono state riscontrate nelle fermentazioni con grande quantità di ceppi di *S. cerevisiae* (Lorenzini, et al., 2019), mentre nei sidri in cui le specie di *Hanseniaspora* sono molto presenti, il contenuto di acidi grassi è risultato inferiore (Han & Du, 2023). Gli acidi grassi a corta catena possono conferire al sidro un gusto acetico spiacevole anche con un contenuto di acido acetico inferiore a 0,80 g/L, come analizzato in uno studio condotto sul sidro delle Asturie (Picinelli, et al., 2000).

Alcuni acidi organici sono già presenti nel succo di mela, come ad esempio acido malico, mentre altri vengono rilasciati dai lieviti durante la fermentazione, come nel caso dell'acido citrico, intermedio del ciclo di Krebs, che viene sintetizzato dal lievito e poi in parte assimilato e catabolizzato dai batteri nelle fasi successive (Gomis, et al., 1991). Una bassa produzione di acido citrico può avvenire ad opera di *T. delbrueckii* a partire

dall'acido malico presente nel succo (Han & Du, 2023). Il contenuto di acido malico può calare anche per l'azione di alcuni enzimi, come analizzato nello studio di Mangas e collaboratori (1994), che ha dimostrato come questa diminuzione non sia legata alla produzione di acido lattico e quindi non dipendente dalla fermentazione malolattica. Inoltre, l'acido malico può essere utilizzato dai lieviti per la produzione di acido succinico da parte di *T. delbrueckii* (Han & Du, 2023). L'acido succinico è uno degli acidi organici più presenti nel sidro e la sua produzione è correlata anche alla metabolizzazione degli zuccheri e degli amminoacidi (Mangas, et al., 1994), soprattutto alle concentrazioni di glutammato e prolina (Gomis, et al., 1991). L'acido succinico, se presente ad alte concentrazioni nel sidro, può conferire un sapore salato-amaro (Picinelli, et al., 2000).

Un ulteriore acido prodotto in bassa quantità da *Saccharomyces* e in quantità superiori da *H. uvarum* e *H. osmophila* è l'acido tartarico (Han & Du, 2023).

L'acido acetico è un acido volatile presente nel sidro durante tutte le fasi del processo di produzione, ma soprattutto durante le fasi iniziali della fermentazione alcolica, per via della presenza di lieviti apiculati (Picinelli, et al., 2000). I lieviti produttori di acido acetico, infatti, sono principalmente *Schizosaccharomyces pombe*, *Starmerella bacillaris*, *Zygosaccharomyces* e *Hanseniaspora* (Lorenzini, Simonato, Slaghenaufi, Ugliano, & Zapparoli, 2019; Al Daccache, et al., 2020), mentre altri lieviti, considerati bassi produttori di acido acetico, come *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *Z. bailii*, non superano gli 0,5 g/L (Lorenzini, et al., 2019). La formazione di acido acetico durante la fermentazione alcolica è maggiore se a monte avviene una pressatura di tipo tradizionale (Mangas, et al., 1994).

In generale, i ceppi di *Saccharomyces* non hanno un'influenza significativa sulla formazione di acidi organici e sull'acidità del prodotto finale (Al Daccache, et al., 2020); il pH iniziale, solitamente compreso tra 3,3 e 3,8 (Calugar, et al., 2021), viene dunque modificato principalmente durante la fermentazione malolattica piuttosto che durante la fermentazione alcolica, attraverso la conversione della maggior parte dell'acido malico in acido lattico (Mangas, et al., 1994). Gli acidi organici e gli acidi grassi presenti nel succo oppure formati durante il processo possono essere esterificati, formando composti che contribuiscono al profilo aromatico del sidro (Zhao, et al., 2014).

5.4.3 Esteri di fermentazione

Gli esteri sono dei composti volatili formati durante la fermentazione e prodotti tramite l'esterificazione di un alcol, etanolo o alcol superiori, con acido acetico o un acido grasso, mediata dagli enzimi alcol acetiltransferasi o alcol aciltransferasi e esterasi (Lorenzini, et al., 2019). Gli esteri di fermentazioni vengono prodotti dal lievito in modo da poter ottenere un turnover del Coenzima A, legato agli acidi grassi e all'acido acetico durante le rispettive sintesi (Zhao, et al., 2014).

Questi composti sono i più importanti composti volatili prodotti durante la fermentazione alcolica, poiché contribuiscono in modo positivo alla formazione del profilo aromatico del sidro, donando note fruttate e floreali (Johansen, 2000; Cousin, et al., 2017). La produzione di esteri dipende dalla varietà e dal grado di maturazione delle mele, ma anche dal profilo zuccherino, dai lieviti coinvolti e dalle condizioni di fermentazione (Lorenzini, et al., 2019); sono maggiormente presenti nei sidri a fermentazione spontanea, grazie alla grande diversità e alla presenza di lieviti non-*Saccharomyces*, soprattutto *Hanseniaspora* e *Torulaspota*. La temperatura ottimale per ottenere alte concentrazioni di esteri si aggira attorno i 20 °C (Cousin, et al., 2017; Calugar, et al., 2021). L'estere maggiormente presente nel sidro è etil acetato, estere formato da acido acetico ed etanolo, che rappresenta il 90% degli esteri totali ed è prodotto in grande quantità da *H. valbyensis* e *H. uvarum* (Cousin, et al., 2017; Lorenzini, et al., 2019). Questo composto volatile è presente in concentrazioni comprese tra 55 mg/L e 114 mg/L nei sidri prodotti nelle Asturie (Picinelli, et al., 2000), mentre tra 11 e 14 in quello prodotto in Bretagna (Leguerinel, et al., 1988); se in quantità di 50 – 80 mg/L, dona aromi piacevoli, freschi e fruttati e contribuisce al carattere ruvido dei sidri tradizionali spagnoli (Han & Du, 2023; Picinelli, et al., 2000). Tuttavia, a concentrazioni superiori, etil acetato causa odori di solvente (Cousin, et al., 2017) oppure ricorda l'aceto se presente in quantità maggiori di 150 mg/L (Han & Du, 2023).

La presenza di esteri acetici derivati dall'esterificazione degli alcol superiori è correlata al metabolismo dei *Saccharomyces* (Cousin, et al., 2017); in particolare isoamil acetato e esil acetato sono correlati a ceppi di *S. cerevisiae* (Lorenzini, et al., 2019), mentre 2-feniletil acetato è correlato alla predominanza di *S. bayanus* durante la fase tumultuosa della fermentazione alcolica (Valles, et al., 2007). Il 2-feniletil acetato dona un aroma fruttato e floreale al sidro (Le Quéré, et al., 2006) e la sua formazione è risultata maggiore in presenza di *T. delbrueckii*, *H. vineae* e *H. valbyensis* (Cousin, et al., 2017; Han & Du, 2023) rispetto alle fermentazioni condotte solo con *S. cerevisiae*. *H. uvarum* si è rivelato un alto produttore di esteri acetici, come esil acetato e isoamil acetato (Al Daccache, et al., 2020). Ulteriori esteri che hanno un impatto positivo sull'aroma del sidro sono etil caproato, etil miristato (Han & Du, 2023), etil caprilato (Le Quéré, et al., 2006), etil esanoato, etil ottanoato, etil laureato, etil decilato, 3-metil butil pentadecanoato, isopentil esanoato (Calugar, et al., 2021).

5.4.4 Alcol superiori

Gli alcoli superiori sono degli alcol a lunga catena prodotti a partire da amminoacidi ramificati e aromatici attraverso la via di Ehrlich oppure dal catabolismo degli zuccheri (Lorenzini, et al., 2019). La loro produzione è influenzata da alcuni fattori, quali (a) la composizione del mezzo, in quanto la carenza di fonti azotate nel succo porta a un aumento degli alcoli superiori (Johansen, 2000), così come i pH elevati; (b) le tecniche di produzione, come ad esempio la chiarifica e la solfitazione; (c) il processo di fermentazione, che comprende le temperature, la presenza di ossigeno e la diversità dei lieviti che concorrono alla produzione di alcoli

superiori (Picinelli, et al., 2000). Gli alcol superiori hanno soglie di percezione attorno a 300 mg/L; sopra i 400 mg/L donano al sidro aromi spiacevoli e un sapore forte e indesiderato di solvente (Cousin, et al., 2017).

I lieviti del genere *Saccharomyces* sono definiti alti produttori di alcoli superiori, in particolare di 2-metilbutanolo, isobutanolo, propanolo e feniletanolo, formati a partire dagli amminoacidi isoleucina, leucina e L-fenilalanina (Han & Du, 2023). Le temperature che favoriscono la formazione di questi composti vanno dai 15 °C ai 25 °C (Beech, 1972). La solfitazione e la chiarifica causano una riduzione delle concentrazioni e della diversità dei lieviti e di conseguenza portano a una riduzione delle concentrazioni di alcoli superiori (Johansen, 2000; Picinelli, et al., 2000). Inoltre, *S. cerevisiae* favorisce la forma non esterificata di isobutanolo e alcol isoamilico (Cousin, et al., 2017).

Al contrario, i non-*Saccharomyces*, in particolare *Hanseniaspora* / *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, sono dei bassi produttori di alcoli superiori (Han & Du, 2023; Al Daccache, et al., 2020).

Nel succo di mela non fermentato, si trovano metanolo, 1-butanolo e 1-esanolo (Beech, 1972; Cousin, et al., 2017; Picinelli, et al., 2000; Valles, et al., 2007), che concorrono alla formazione dell'aroma.

Nel sidro, uno degli alcoli superiori maggiormente presenti è 2-feniletanolo, in concentrazioni di 68 – 131 mg/L (Picinelli, et al., 2000). Questo composto contribuisce al profilo sensoriale del sidro con aromi fragranti, di rosa e di miele (Lorenzini, et al., 2019). L'alcol superiore 1,2-propandiolo è molto presente nei sidri a fermentazione spontanea (Han & Du, 2023). Gli alcol amilici, in particolare alcol isoamilico e alcol amilico attivo, contribuiscono all'aroma del sidro, definendone la complessità e la rotondità, se presenti in concentrazioni inferiori a 300 mg/L; solitamente la loro concentrazione è di 120 – 180 mg/L. I livelli medi di 1-propanolo, composto che ha un'influenza positiva sulla formazione della schiuma, ma che è prodotto in basse quantità se sono presenti dei ceppi produttori di solfiti, risultano compresi tra 12 e 30 mg/L. Isobutanolo è molto presente, con 26 – 40 mg/L (Picinelli, et al., 2000). Altri alcol superiori, presenti in concentrazioni inferiori, ma che comunque contribuiscono positivamente all'aroma del sidro, sono 1-esanolo (erbaceo), 2-butanolo, 3-metilbutanolo (maltato), 2-metilbutanolo, 1-butanolo e 2,3-butandiolo (Cousin, et al., 2017; Leguerinel, et al., 1989; Lorenzini, et al., 2019; Picinelli, et al., 2000).

I valori medi degli alcol superiori sono simili nei sidri prodotti in Spagna, Regno Unito e Repubblica d'Irlanda, mentre sono inferiori nei sidri tradizionali prodotti in Bretagna e Bassa Normandia, per le tecniche di chiarifica adottate durante il processo e per le conseguenti fermentazioni incomplete (Picinelli, et al., 2000).

5.4.5 Glicerolo

Il glicerolo è un composto formato durante la fermentazione, a partire dal metabolismo dell'acido piruvico attraverso la fermentazione gliceropiruvica (Valles, et al., 2007). È considerato un metabolita secondario della

fermentazione alcolica (Picinelli, et al., 2000) ed è correlato alla presenza di acido succinico (Gomis, et al., 1991). Viene prodotto dai lieviti perché è un soluto compatibile, cioè non sequestra l'acqua libera all'interno della cellula; risulta quindi utile al lievito per bilanciare la pressione osmotica a cui è sottoposto e per la riossidazione del NADH nelle prime fasi della fermentazione.

La sua produzione impiega circa il 9% degli zuccheri presenti inizialmente nel succo (Gomis, et al., 1991), è maggiormente prodotto con temperature basse ed è sintetizzato da ceppi di *S. cerevisiae*, ma anche da *Pichia* sp. e *H. uvarum*, con concentrazioni nel sidro di 3,6 – 4,8 g/L (Al Dacchache, et al, 2020; Valles, et al., 2007).

Dal punto di vista sensoriale è fondamentale per la pienezza del gusto, la rotondità, la morbidezza al palato di vino e sidro e ne migliora il carattere fruttato, pur non influenzando l'aroma (Calugar, et al., 2021; Picinelli, et al., 2000; Zhao, et al., 2014). L'assenza di glicerolo nel sidro è considerata un difetto ed è causata in parte dalla presenza di alcuni batteri lattici che lo convertono a acido 3-idrossipropionico (3-HPA) e acroleina (Johansen, 2000; Sánchez, et al., 2010).

5.4.6 Composti solforati

La formazione di composti solforati nel sidro ha un effetto negativo sulle caratteristiche sensoriali ed è influenzata dalle basse concentrazioni di azoto assimilabile, dalla presenza di residui di pesticidi a base di zolfo (Calugar, et al., 2021) e dalle alte temperature di fermentazione. Sono prodotti da *Candida* sp., *Hanseniaspora* sp., *T. delbrueckii* e *Kazachstania gamospora* (Al Daccache, et al., 2020); sono stati isolati nel sidro alcuni ceppi di *S. cerevisiae* che si sono rivelati alti produttori di acido solfidrico (Pando Bedriñana, et al., 2010).

Questi composti hanno una bassa soglia di percezione, al di sopra della quale conferiscono al prodotto odori spiacevoli e indesiderati (Beech, 1972). I composti solforati più presenti nel sidro, sono infatti acido solfidrico H₂S, che ha una soglia di percezione di 8 mg/L e causa odori di uova marce, e dimetil solfuro (CH₃)₂S (Johansen, 2000), con soglia di percezione di 30 µg/L al di sopra della quale conferisce odore di cavolo cotto al sidro.

6. LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA SPONTANEA

La fermentazione malolattica spontanea è un processo che consiste nella conversione dell'acido malico in acido L(+)-lattico e anidride carbonica tramite decarbossilazione (Calugar, et al., 2021), mediato dai batteri lattici presenti nel succo di mela e dunque non inoculati (Johansen, 2000). Questa fermentazione è ricercata durante la produzione del sidro, in quanto porta a miglioramenti delle caratteristiche organolettiche del prodotto, in particolare alla diminuzione dell'acidità dovuta alla conversione dell'acido malico, che risulta in un gusto più morbido e meno pungente al palato (del Campo, et al., 2008) e nella diminuzione del pH (Calugar, et al., 2021). Può avvenire contemporaneamente alla fermentazione alcolica, come nel caso del sidro tradizionale delle Asturie, non solfitato e con chiarifica spontanea, oppure successivamente; la fermentazione malolattica inizia dopo la fermentazione alcolica quando il succo viene solfitato, come nel caso dei sidri a fermentazione spontanea prodotti in Regno Unito e Repubblica d'Irlanda, oppure se viene sottoposto alla chiarifica enzimatica, come nel caso del sidro tradizionale della Bretagna. Ciò succede perché, attraverso queste tecnologie prefermentative, la carica dei batteri lattici si riduce, prolungando i tempi di inizio e di durata della fermentazione malolattica spontanea. La solfitazione, infatti, aumenta il tempo necessario per il completamento della decarbossilazione dell'acido malico: se un succo non solfitato impiega 11 giorni per il completamento della fermentazione malolattica spontanea, il succo che viene addizionato con 60 ppm di solfiti, può impiegare fino a 21 giorni (Johansen, 2000).

La fermentazione malolattica, comune anche alla produzione del vino, è condotta da batteri lattici dei generi *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Le specie che presentano vantaggi selettivi diventano dominanti durante la fermentazione; alcune condizioni del sidro in fermentazione, infatti, sono sfavorevoli allo sviluppo di vari microrganismi e per questo i batteri lattici attivi in questa fase devono adattarsi e resistere all'alta acidità, agli alti livelli di etanolo e alla bassa quantità di nutrienti presenti nel sidro (Sánchez, et al., 2010).

L'acido malico viene convertito completamente in acido lattico durante la fermentazione malolattica spontanea sia a 15 °C, anche se più lentamente, che a 20 – 25 °C; tuttavia, alla temperatura di cantina di 15 °C, i lieviti coinvolti nella contemporanea o precedente fermentazione alcolica non producono composti volatili indesiderati per l'aroma del sidro (Sánchez, et al., 2010). Poiché questo processo si può sovrapporre alla fermentazione alcolica, inoltre, le botti entro cui viene completata la fermentazione malolattica sono le medesime, in legno di quercia, e devono proteggere il sidro dal contatto con l'ossigeno (Cousin, et al., 2017).

6.1 Batteri lattici e diversità

I batteri lattici coinvolti nella fermentazione malolattica spontanea del sidro sono riconducibili ai generi *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Queste specie sopravvivono nel sidro durante la fermentazione alcolica, in quanto resistenti a bassi valori di pH, alto contenuto di etanolo e alle scarse fonti nutritive presenti. Alcune specie di *Lactobacillus* e *Pediococcus* sono state isolate sulle mele prodotte nelle Asturie, mentre nel sidro naturale i batteri lattici più isolati sono stati *Oenococcus oeni* e *Levilactobacillus brevis* (Cousin, et al., 2017). Nel sidro tradizionale francese, le specie più frequentemente isolate afferiscono alla famiglia delle Lactobacillaceae, in particolare a *O. oeni*, mentre nelle produzioni inglesi e irlandesi, la specie predominante è *Lactiplantibacillus plantarum* (Johansen, 2000; Tyakht, et al., 2021).

In generale, i batteri lattici omofermentanti come *Liquorilactobacillus mali*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. acidophilus*, che fermentano il glucosio producendo esclusivamente acido lattico, vengono raramente isolati nel sidro a fermentazione spontanea (Al Daccache, et al., 2020). Molto più comuni sono i batteri lattici eterofermentanti, che fermentano il glucosio producendo acido lattico, etanolo o acido acetico e anidride carbonica; a questa categoria appartengono *Secundilactobacillus collinoides*, *S. paracollinoides*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Weissella viridescens*, *Lentilactobacillus buchneri*, *L. hilgardii*, *L. diolivorans*, *L. plantarum* e *Paucilactobacillus suebicus*, spesso presenti nei sidri naturali prodotti nelle cantine asturiane (Puertas, et al., 2014).

In uno studio sulla fermentazione malolattica spontanea (Sánchez, et al., 2010) sono stati isolati dei batteri lattici durante la fermentazione malolattica spontanea di sidro. La specie più rappresentata è stata *S. collinoides* con il 42,8% degli isolati, seguita da *O. oeni* con il 28,6%, *P. parvulus* (21,4%) e altre come *Lacticaseibacillus casei* e *P. ethanolidurans*. Analizzando queste specie, si è notato come *O. oeni* mostri una grande resistenza alle condizioni di alta acidità e agli alti livelli di etanolo del sidro e come sia in grado di decarbossilare rapidamente l'acido malico ad acido lattico (Tyakht, et al., 2021; Sánchez, et al., 2010). *S. collinoides* è descritto come un possibile contaminante del sidro, in quanto può causare la cosiddetta *piqûre acroléique*, alterazione frequente durante la quale *S. collinoides*, ma anche *L. hilgardii* e *L. diolivorans*, degradano il glicerolo prodotto durante la fermentazione alcolica da parte dei lieviti producendo 3-idrossipropionaldeide (3-HPA); questa aldeide è molto instabile e viene disidratata a acroleina, composto negativo per le qualità organolettiche del sidro, perché conferisce un aroma pepato e un gusto amaro. Anche *P. parvulus* è descritto come contaminante nel sidro, in quanto può causare viscosità tramite la formazione di esopolisaccaridi. La capacità di causare alterazioni al sidro è ceppo-specifica in *S. collinoides* e *P. parvulus* e la loro eventuale influenza sul profilo aromatico del prodotto non è conosciuta (Cousin, et al., 2017; Sánchez, et al., 2010).

Lo studio condotto su campioni di sidro naturale prodotto nei Paesi Baschi (Duenas, et al., 1994) ha identificato concentrazioni di $2,3 \cdot 10^6$ CFU/mL di batteri lattici nel mosto appena ottenuto, che arriva a circa 10^8 CFU/mL durante la fermentazione malolattica. I ceppi di batteri lattici più frequentemente isolati in questi campioni sono *L. brevis*, *L. mali*, *L. plantarum*, *O. oeni* e *Leuconostoc mesenteroides*, mentre non sono state isolate specie di *Pediococcus*. Durante la fermentazione malolattica, la produzione di acido lattico arriva a 2,79 g/L, mentre l'acido malico, presente in 3 g/L nel succo, è completamente fermentato dopo circa 40 giorni. Analizzando il sidro basco, (Puertas, et al., 2014) ha isolato ceppi del batterio lattico *Liquorilactobacillus sicerae*, una specie che ha mostrato similarità con *L. vini*.

Lo studio (Picinelli, et al., 2000), condotto su sidro prodotto nelle Asturie, ha riscontrato concentrazioni di acido lattico nel prodotto finito comprese tra 3,19 e 4,41 g/L, mentre l'acido malico residuo è presente a basse quantità comprese tra 0,02 e 0,11 g/L. Di conseguenza, i valori di pH si attestano tra 3,75 e 3,85 e sono maggiori rispetto a quelli del succo di mela non fermentato, che risultano di 3,3 – 3,8 (Calugar, et al., 2021).

Un ulteriore studio sul sidro prodotto con i metodi alternativo e tradizionale (Mangas, et al., 1994) ha mostrato valori iniziali di batteri lattici compresi tra 2,1 e $2,6 \cdot 10^4$ CFU/mL nel succo. Durante la fermentazione malolattica, le popolazioni dei batteri lattici crescono fino a concentrazioni di $2,7 \cdot 10^6$ CFU/mL. Per questo motivo, il contenuto di acido malico passa da valori di 4,42 – 5,81 g/L nel succo, a valori inferiori a 0,1 g/L alla fine della maturazione. Come risultato della fermentazione malolattica, il contenuto di acido lattico nel sidro raggiunge valori compresi tra 2,85 g/L e 4,98 g/L, in base al metodo di pressatura adottato.

6.2 Dinamica delle fermentazioni malolattiche spontanee

Così come per le fermentazioni alcoliche spontanee, anche la dinamica delle fermentazioni malolattiche spontanee è influenzata dal metodo di pressatura e dalla tecnica di chiarifica adottati: i sidri prodotti con pressatura rapida delle mele e sottoposti a chiarifica enzimatica presentano una conta dei batteri lattici inferiore rispetto ai sidri tradizionali, caratterizzati da cicli di pressatura lenti e chiarifica spontanea.

Lo studio condotto da Mangas e collaboratori (1994) su dodici diversi sidri tradizionali ha analizzato, tra le altre, le dinamiche della popolazione dei batteri lattici all'interno del sidro, prendendo in considerazione: il tipo di pressatura utilizzato, ossia rapido, con un ciclo di pressatura di 30 minuti associato a 15 ore di macerazione, oppure lento, con ciclo di pressatura discontinuo di 4 giorni in pressa meccanica; il metodo di chiarificazione prefermentativa impiegato, cioè chiarifica spontanea, in cui si sfruttano gli enzimi e le pectine presenti nel succo, oppure enzimatica, per la quale si aggiungono enzimi pectici e ioni calcio al succo.

Nella fase iniziale della fermentazione alcolica, ossia nei primi giorni dopo la pressatura, la conta dei batteri lattici è molto simile nei mosti, a prescindere dal metodo di pressatura e dalla tecnica di chiarifica, e misura

$2,19 - 2,57 \cdot 10^4$ CFU/mL. In questa fase del processo, la quantità di acido lattico è molto bassa e inferiore a 0,01 g/L, mentre l'acido malico è presente in concentrazioni maggiori nel succo ottenuto con la pressatura rapida che con il metodo tradizionale, rispettivamente 5,81 g/L e 4,42 g/L (Tabella 6.2.). Nelle fasi iniziali della fermentazione alcolica, l'effetto della chiarifica non è influente, in quanto questa tecnica prefermentativa impiega alcuni giorni per formare il gel pectato e successivamente intrappolare batteri, lieviti e composti organici eliminandoli dal succo.

Durante la fermentazione alcolica tumultuosa, corrispondente con la crescita esponenziale dei lieviti, i batteri lattici attraversano una fase di latenza, con valori di $3,39 - 5,37 \cdot 10^4$ CFU/mL molto simili ai valori rilevati nella fase precedente. Contemporaneamente, il contenuto di acido malico inizia a diminuire: nei succhi ottenuti con pressatura rapida cala fino a 4,14 g/L e 4,36 g/L rispettivamente con chiarifica enzimatica e spontanea; nei succhi da pressatura lenta arriva rispettivamente a 3,40 g/L e 3,17 g/L. Tuttavia, i livelli di acido L(+) lattico, indice della decarbossilazione dell'acido malico da parte dei batteri lattici, non crescono proporzionalmente al consumo di malico: avviene un aumento del contenuto dell'acido lattico, principalmente nei succhi a pressatura rapida (0,27 – 0,48 g/L), ma al tempo stesso aumenta anche la quantità di acido succinico nel mosto; questo potrebbe essere dovuto alla fermentazione malosuccinica.

Nella fase successiva, corrispondente alla fase stazionaria dei lieviti e al rallentamento della fermentazione alcolica, i batteri lattici entrano nella fase di crescita esponenziale e raggiungono concentrazioni superiori, diventando predominanti nel mezzo. Nei campioni analizzati, si notano delle differenze riconducibili ai fattori descritti. Nel succo a pressatura rapida, infatti, si può notare una differenza tra i campioni con chiarifica enzimatica, che presentano una concentrazione di $1,12 \cdot 10^5$ CFU/mL, e spontanea, con $1,86 \cdot 10^6$ CFU/mL. Nel succo ottenuto con il metodo tradizionale, i valori sono simili e misurano rispettivamente $2,69 \cdot 10^6$ CFU/mL e $2,29 \cdot 10^6$ CFU/mL. L'acido malico, in questa fase, è quasi completamente decarbossilato a acido L (+) lattico; il calo della concentrazione dell'acido malico è proporzionale all'aumento di quella dell'acido lattico. In particolare, tramite il metodo tradizionale con entrambe le chiarifiche, la concentrazione di acido malico residuo non supera 0,16 g/L, con l'acido L (+) lattico che cresce fino a 2,44 – 2,48 g/L; tramite il metodo alternativo, invece, si possono individuare due diverse dinamiche: con la chiarifica spontanea, grazie alle concentrazioni superiori di batteri lattici, il contenuto di acido malico diminuisce fino a 0,45 g/L, convertito in 4,09 g/L di acido L (+) lattico, mentre attraverso la chiarifica enzimatica, corrispondente a cariche batteriche inferiori, l'acido malico si attesta a 4,58 g/L e l'acido lattico a 0,49 g/L. Questi valori possono indicare che la fermentazione malolattica è avvenuta ed è quasi completa nei sidri ottenuti attraverso la pressatura lenta e nel campione ottenuto con pressatura rapida e chiarifica spontanea. Utilizzando pressatura rapida e chiarifica enzimatica, la popolazione dei batteri lattici presenta valori inferiori e di conseguenza il consumo dell'acido malico avviene solo in piccola parte. Questo suggerisce che, attraverso queste due tecnologie, è possibile ritardare la fermentazione malolattica.

Ulteriori analisi svolte durante il periodo di maturazione del sidro hanno mostrato che in questa fase la concentrazione dei batteri lattici decresce, pur rimanendo superiore a quella dei lieviti. Le popolazioni dei batteri lattici sono più sviluppate nei sidri ottenuti con la pressatura tradizionale, con valori di $2,51 \cdot 10^5$ CFU/mL e $7,59 \cdot 10^5$ CFU/mL, rispettivamente con chiarifica spontanea e enzimatica. Con il metodo rapido, invece, le concentrazioni sono leggermente inferiori, rispettivamente $1,91 \cdot 10^5$ CFU/mL e $1,51 \cdot 10^5$ CFU/mL. Anche in questo caso la conta dei batteri lattici risulta inferiore nel sidro con pressatura rapida e chiarifica enzimatica. Dal punto di vista degli acidi organici, l'acido malico in questa fase è completamente fermentato con il metodo tradizionale e con il metodo rapido e chiarifica spontanea. Tuttavia, il campione di sidro con pressatura rapida e chiarifica enzimatica presenta un contenuto residuo di acido malico di 1,58 g/L; anche l'acido L (+) lattico, di conseguenza, ha un valore basso, quantificato in 2,23 g/L, molto inferiore rispetto alla concentrazione iniziale di acido malico (5,81 g/L). La quantità di acido L (+) lattico presente nel sidro ottenuto con la pressatura lenta presenta valori di 2,12 – 2,26 g/L, ossia circa la metà dell'acido malico inizialmente presente nel succo (4,42 g/L). Il contenuto di acido L (+) lattico del sidro ottenuto con metodo rapido e chiarifica spontanea, invece, presenta un valore di 4,61 g/L, riconducibile alla concentrazione iniziale di acido malico del succo, misurata in 5,81 g/L (Tabella 6.2.).

Durante l'ultima fase analizzata, con il sidro imbottigliato, le concentrazioni dei batteri lattici decrescono, arrivando, nei campioni ottenuti da pressatura rapida, a valori di $3,89 \cdot 10^3$ CFU/mL e $2,09 \cdot 10^4$ CFU/mL, mentre con pressatura lenta $9,12 \cdot 10^2$ CFU/mL e $4,27 \cdot 10^4$ CFU/mL, rispettivamente con chiarifica spontanea ed enzimatica. L'acido malico residuo nel sidro con pressatura rapida e chiarifica enzimatica alla fine del processo misura 1,76 g/L, mentre con l'utilizzo delle altre tecnologie è completamente metabolizzato. Il contenuto finale di acido L (+) lattico dei sidri, invece, presenta un calo in entrambi i campioni ottenuti con chiarifica spontanea: da 4,61 g/L a 2,21 g/L in quello a pressatura rapida; da 2,12 g/L a 1,43 g/L in quello a pressatura lenta. Anche i due sidri ottenuti dopo chiarifica enzimatica mostrano una decrescita, ma meno importante rispetto al caso precedente. Questo fenomeno potrebbe essere associato ai processi di esterificazione: durante la maturazione del sidro non decresce solo la concentrazione dell'acido L (+) lattico, ma anche il contenuto di etanolo. L'esterificazione di etanolo e acido lattico, infatti, potrebbe portare alla formazione di etil lattato, molto presente nel sidro, o altri esteri.

Fermentation stages	Technologies Pressing-clarification	Malic	L(+) Lactic	D(-) Lactic	Succinic	Acetic	Shiquimic
Initial	Fast - Spontaneous	5.81	0.01	0.00	0.02	0.00	0.02
	Fast - Enzymatic	5.81	0.01	0.00	0.02	0.00	0.02
	Confidence level	$P_p = 0.0001$	$P_p > 0.1$	$P_p > 0.1$	$P_p > 0.1$	$P_p = 0.0001$	$P_p > 0.01$
	Slow - Spontaneous	4.42	0.00	0.00	0.02	0.09	0.02
	Slow - Enzymatic	4.42	0.00	0.00	0.02	0.09	0.02
Tumultuous	Fast - Spontaneous	4.36	0.48	0.07	0.63	0.01	0.02
	Fast - Enzymatic	4.14	0.27	0.06	0.58	0.10	0.02
	Confidence level	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0268$ $P_c = 0.0020$	$P_{p,c} > 0.1$	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0018$	$P_{p,c} > 0.1$
	Slow - Spontaneous	3.17	0.09	0.06	0.54	0.42	0.02
	Slow - Enzymatic	3.40	0.00	0.04	0.59	0.41	0.02
Slow	Fast - Spontaneous	0.45	4.09	0.15	0.91	0.10	0.03
	Fast - Enzymatic	4.58	0.49	0.07	0.75	0.18	0.02
	Confidence level	$P_p = 0.0058$ $P_c = 0.0142$	$P_c = 0.0445$	$P_p = 0.0113$	$P_p = 0.0049$	$P_p = 0.0351$	$P_{p,c} > 0.1$
	Slow - Spontaneous	0.00	2.44	0.35	0.74	0.57	0.02
	Slow - Enzymatic	0.16	2.48	0.39	0.76	0.73	0.02
Maturation and storage	Fast - Spontaneous	0.00	4.61	0.32	0.75	0.44	0.03
	Fast - Enzymatic	1.58	2.23	0.17	0.79	0.31	0.02
	Confidence level	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0001$ $P_c = 0.0331$	$P_p = 0.0039$	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0001$	$P_p = 0.019$
	Slow - Spontaneous	0.02	2.12	1.42	0.61	1.35	0.01
	Slow - Enzymatic	0.00	2.26	1.14	0.48	1.23	0.02
Bottled	Fast - Spontaneous	0.00	2.21	2.67	0.66	0.78	0.00
	Fast - Enzymatic	1.76	1.68	1.91	0.48	1.00	0.00
	Confidence level	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0079$ $P_c = 0.004$	$P_p = 0.0002$	$P_{p,c} > 0.1$	$P_{p,c} > 0.1$	$P_p = 0.0001$
	Slow - Spontaneous	0.00	1.43	1.42	0.48	1.44	0.00
	Slow - Enzymatic	0.00	2.08	1.82	0.53	1.14	0.01

Tabella 6.2. Evoluzione delle concentrazioni degli acidi organici nel sidro a fermentazione spontanea, con metodi di pressatura a ciclo lento e a ciclo rapido e con chiarifica enzimatica e spontanea del succo. (Mangas, et al., 1994)

6.3 Prodotti metabolici durante la fermentazione malolattica spontanea del sidro

6.3.1 Acido lattico e acido malico

La formazione dell'acido L (+) lattico avviene per decarbossilazione dell'acido malico, mediata dall'enzima malato decarbossilasi, detto anche enzima malolattico. Questa reazione è finalizzata alla riossidazione del NADH a NAD⁺ e porta anche alla produzione di anidride carbonica (Swiegers, et al., 2005). La produzione di acido lattico e la degradazione dell'acido malico contribuiscono all'incremento del pH di 0,3 – 0,5 unità.

Inoltre, come emerge da uno studio del 1994 (Mangas, et al., 1994), gli zuccheri residui presenti nel sidro alla fine della fermentazione alcolica, in particolare il fruttosio, possono contribuire alla produzione dell'acido D (-) lattico tramite la fermentazione lattica. Nel sidro si possono riscontrare valori di acido D (-) lattico compresi

tra 1,42 g/L e 2,67 g/L, che dipendono anche dal metodo di pressatura utilizzato e dalla tecnica di chiarifica che si adotta.

L'effetto di queste reazioni sulle caratteristiche organolettiche del sidro è positivo, in quanto contribuiscono alla sensazione di morbidezza al palato, riducendo l'acidità pungente dovuta alle alte concentrazioni di acido malico (Cousin, et al., 2017; Swiegers, et al., 2005).

6.3.2 Acido citrico

L'acido citrico è presente nel sidro in concentrazioni comprese tra 0,1 g/L e 0,7 g/L. Durante la fermentazione malolattica, viene metabolizzato dai batteri lattici, trasformato in acido piruvico, che può essere poi convertito in acido lattico, acido acetico o diacetile (Swiegers, et al., 2005).

6.3.3 Esteri

Sebbene la maggior parte degli esteri vengano prodotti dai lieviti durante la fermentazione alcolica, alcuni di questi possono essere formati per esterificazione di alcol e acidi durante la maturazione, da parte di alcuni ceppi di *O. oeni* e *P. parvulus*. Dopo il completamento della fermentazione malolattica, infatti, è stato notato l'aumento di alcuni esteri etilici, tra cui etil acetato, etil lattato, etil esanoato ed etil ottanoato (Swiegers, et al., 2005).

Questi composti hanno un'influenza positiva sulle caratteristiche organolettiche del sidro e contribuiscono a fornire note fruttate, floreali e di frutta secca alla fine della maturazione (Cousin, et al., 2017).

6.3.4 Glicerolo

Il glicerolo prodotto nel sidro durante la fermentazione alcolica può essere metabolizzato da alcuni batteri lattici, quali *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. diolivorans* e *P. pentosaceus*, che grazie all'enzima glicerolo deidrogenasi lo convertono a 3-idrossipropionaldeide (3-HPA). Successivamente, l'ulteriore disidratazione spontanea di 3-idrossipropionaldeide in ambiente acido causa la formazione di acroleina (Swiegers, et al., 2005).

L'acroleina, che reagisce con alcuni composti fenolici, causa un aroma pepato e un sapore amaro ed è indesiderata nel sidro e considerata un difetto (Cousin, et al., 2017).

6.3.5 Consumo di acetaldeide

L'acetaldeide, generata dal metabolismo dei lieviti, può essere metabolizzata dai batteri lattici nella produzione di acido acetico o etanolo, rispettivamente tramite la sua ossidazione e riduzione. Questi composti, però, sono prodotti in basse quantità dai batteri lattici (Swiegers, et al., 2005).

Questo metabolismo contribuisce a ridurre la sensazione erbacea che caratterizza alcuni sidri (Cousin, et al., 2017).

6.3.6 Diacetile, 2,3-butandiolo e acetoino

Il diacetile è un composto prodotto dai batteri lattici, principalmente *O. oeni*, durante il loro metabolismo e può essere formato a partire da acido citrico o zuccheri. In particolare, deriva dalla decarbossilazione dell'acido piruvico, intermedio dei metabolismi dello zucchero e dell'acido citrico, e la sua produzione è dovuta alla necessità di bilanciare il potere riducente. Acetoino e 2,3-butandiolo possono essere prodotti a partire dal diacetile, per ottenere la riossidazione del NADH (Swiegers, et al., 2005).

La formazione di diacetile nel sidro è considerata un difetto, in quanto contribuisce all'aroma del prodotto con un odore di burro rancido (Calugar, et al., 2021).

6.3.7 Esopolisaccaridi

Gli esopolisaccaridi sono dei composti polimerici prodotti dai batteri lattici a partire dal saccarosio (Puertas, et al., 2014). La presenza di EPS nel sidro causa viscosità: i sidri con questo problema risultano viscosi, oleosi e viene modificata la reologia e la texture del prodotto (Cousin, et al., 2017). Questa alterazione è riconducibile a ceppi di *P. parvulus* (Sánchez, et al., 2010).

CONCLUSIONE

Il sidro può essere prodotto con metodo tradizionale oppure industriale. I risultati che si ottengono sono profondamente differenti, per via delle tecnologie utilizzate durante il processo e dei lieviti e batteri che concorrono alla fermentazione.

Nelle produzioni industriali, in cui viene impiegato uno starter microbico, infatti, vi è la necessità di controllare il processo dal punto di vista microbiologico, con pratiche di pulizia e sanificazione degli impianti e delle attrezzature molto più rigorose, con l'obiettivo di evitare contaminazioni di microrganismi indesiderati prima e dopo l'inoculo degli starter.

La solfitazione del succo e del sidro, ad esempio, viene attuata per poter ridurre il rischio di sviluppo di batteri e lieviti sia prima della fermentazione, perché potrebbero competere con i ceppi di *S. cerevisiae* inoculati, sia dopo il suo completamento, in quanto si potrebbero sviluppare microrganismi deterioranti nel prodotto finito. In questo caso, i batteri e lieviti presenti sulle mele e sulle attrezzature di cantina sono considerati un fattore di rischio per il controllo del processo.

Altre fasi molto importanti da questo punto di vista sono le eventuali microfiltrazione e pastorizzazione: entrambe offrono grandi vantaggi nella lotta alle contaminazioni e sono molto efficaci per prevenire problemi causati da microrganismi indesiderati; dall'altro lato, però, l'utilizzo di queste tecnologie comporta la parziale perdita di aromi caratteristici del sidro.

Durante l'estrazione del succo dalle mele, risulta particolarmente importante, nella produzione di sidro industriale, la sanificazione delle attrezzature e degli impianti. A questo proposito, vengono utilizzati mulini a grattugia e presse orizzontali a pistone oppure a nastro, costruiti con materiali che favoriscono la pulizia e l'eliminazione di batteri e lieviti (ad esempio acciaio inossidabile). Questi sono molto rapidi ed efficaci in termini di resa, ma presentano costi superiori rispetto a quelli che si utilizzano nelle produzioni tradizionali. Allo stesso modo, le botti utilizzate nell'industria non sono costruite in legno di quercia, bensì in acciaio inossidabile o poliestere e hanno volumi maggiori rispetto a quelle tradizionali.

Durante la produzione del sidro tradizionale, ottenuto tramite la fermentazione spontanea del succo di mela, non avviene un inoculo e dunque non viene attuata la solfitazione, la quale potrebbe diminuire la concentrazione e la diversità dei microrganismi autoctoni. Inoltre, i mulini, le presse e le botti utilizzati tradizionalmente sono costruiti, completamente o solo in alcune parti, in legno. Il legno è un materiale poroso, che non permette una pulizia e una sanificazione efficaci; di conseguenza, i lieviti e i batteri presenti nel succo di mela, oppure già presenti in cantina dalle precedenti produzioni, trovano delle nicchie in cui sono riparati dall'azione dei prodotti utilizzati per la sanificazione. Questo, in particolare nella pressa e

nelle botti, provoca un inoculo involontario del succo di mela, che viene contaminato con batteri e lieviti di cantina, i quali concorrono alle fermentazioni alcolica e malolattica spontanee assieme a quelli delle mele.

Questo fenomeno è detto *effetto cantina* e consiste nella ritenzione di ceppi tra un'annata e l'altra. Poiché il controllo delle fermentazioni spontanee è molto complicato, l'effetto cantina permette di sfruttare alcuni ceppi di lieviti che nelle annate precedenti avevano contribuito alla produzione del sidro e utilizzarli in parte come inoculo del succo, anche se normalmente non se ne conosce la composizione e le concentrazioni.

Inoltre, le botti utilizzate contengono volumi di sidro inferiori rispetto a quelle dell'industria di larga scala e mulini e presse sono più economici, ma garantiscono rese inferiori in termini di succo estratto.

I sidri tradizionali non vengono né microfiltrati né pastorizzati alla fine del processo di fermentazione e maturazione.

La varietà dei batteri lattici e dei lieviti che concorrono alle fermentazioni malolattica e alcolica è in parte responsabile della varietà dei composti aromatici del sidro. In particolare, poiché non avviene l'inoculo di *S. cerevisiae*, i lieviti autoctoni non-*Saccharomyces* contribuiscono all'aroma del sidro con prodotti metabolici diversi.

I sidri a fermentazione spontanea, in generale, presentano caratteristiche organolettiche differenti rispetto ai sidri industriali. La minore acidità, dovuta a pH maggiore, lo rendono più apprezzato dai consumatori: il contenuto di acido acetico è 6 volte superiore nel sidro a fermentazione spontanea, 300 mg/L contro 48 mg/L, e quello di acido lattico è molto superiore, con 4787 mg/L contro 122 mg/L, l'acidità percepita dal consumatore è maggiore nei sidri inoculati, a causa delle concentrazioni maggiori di acido malico (1753 mg/L nel sidro industriale, contro i 38 mg/L del sidro tradizionale) e di acido citrico (2419 mg/L contro 248 mg/L) (Han & Du, 2023).

Tra gli altri composti aromatici, il sidro a fermentazione spontanea presenta concentrazioni maggiori di esteri totali, responsabili dell'aroma fruttato, e di alcuni alcol superiori; concentrazioni inferiori invece di acetaldeide e alcol totali. I livelli di etanolo prodotti durante le due fermentazioni sono simili.

Queste differenze nella composizione chimica, si riflettono sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finale. Direttamente dipendente dalle tecnologie di produzione è il colore del sidro, valutato come migliore nelle produzioni industriali da un panel di consumatori.

Per via della solfitazione iniziale, la concentrazione di acetaldeide è maggiore nel sidro industriale e concorre al sapore erbaceo del sidro. Inoltre, i solfiti inibiscono lo sviluppo dei batteri lattici che concorrono alla fermentazione malolattica e quindi l'acido malico contenuto nel succo non viene convertito ad acido lattico, ma rimane presente ad alte concentrazioni, aumentando l'acidità e contribuendo, in associazione con i composti fenolici, all'astringenza. Questo fenomeno non avviene durante le produzioni tradizionali, nelle quali

l'acido malico è completamente fermentato ad acido lattico, che dona un'acidità meno pungente e può essere esterificato ad etil lattato.

Gli esteri, responsabili degli aromi fruttati del sidro, sono prodotti in grandi quantità durante le fermentazioni spontanee, in particolare nella *fruit yeast phase* e in maturazione, ad opera soprattutto di lieviti non-*Saccharomyces*, mentre alla fine della fermentazione guidata questi sono presenti in concentrazioni inferiori e sono rappresentati principalmente da etil acetato.

Tra gli alcol superiori, le fermentazioni spontanee mostrano valori superiori di alcol amilici e 2-feniletanolo; nelle produzioni industriali, i ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati producono valori complessivi di alcol superiori rispetto alle produzioni tradizionali e contribuiscono maggiormente alle note fruttate.

In generale, i sidri industriali prediligono fasce di prezzo inferiori per ambire a un maggior numero di clienti: per questo esiste la necessità di avere un prodotto con caratteristiche organolettiche costanti nel tempo, che permetta al consumatore di ritrovare gli stessi aromi tra annate diverse. Le tecnologie utilizzate, però, comportano una perdita di qualità dal punto di vista sensoriale. Questi fattori implicano la produzione di sidri poco complessi, che possono rispecchiare i gusti e le preferenze del consumatore che ricerca un prodotto semplice e leggero.

Al contrario, i sidri tradizionali a fermentazione spontanea hanno grande carattere, dovuto alla grande varietà di lieviti e batteri e di composti aromatici presenti e sono molto complessi e meno acidi al palato. Inoltre, presentano aromi di mela più spiccati rispetto ai sidri industriali: questa è una caratteristica ricercata dai consumatori, in quanto permette di ricondurre il prodotto finale alla materia prima e ne fa aumentare il valore percepito. La maggior intensità aromatica, associata alla minor acidità e astringenza e ad aromi di mela più evidenti, contribuisce all'equilibrio e al bilanciamento del gusto dei sidri a fermentazione spontanea.

La maggiore qualità dei sidri tradizionali, ottenuta tramite pratiche rischiose dal punto di vista economico perché implicano bassa possibilità di controllo del processo, comporta prezzi maggiori al consumatore finale; anche per questo motivo, oltre ai volumi inferiori che possono essere prodotti dagli impianti tradizionali, il sidro a fermentazione spontanea non è un prodotto molto conosciuto sul mercato e di conseguenza viene consumato principalmente da nicchie che ne apprezzano le qualità organolettiche.

In conclusione, ad oggi esistono pochi studi, e spesso ormai datati, che analizzano gli aspetti microbiologici e la produzione di composti aromatici delle diverse specie e ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* nel sidro. La loro presenza, infatti, può dipendere dalle varietà di mela utilizzate, ma anche dalle tecnologie di estrazione.

Potrebbe essere interessante condurre degli studi per conoscere specificamente le produzioni dei singoli ceppi e specie a determinate condizioni, in modo da poter evidenziare il contributo di ognuna alla formazione del profilo aromatico del sidro. Questi studi, se condotti in cantine riconosciute per la produzione di sidri a

fermentazione spontanea con determinate caratteristiche ricercate e apprezzate, permetterebbero di analizzare batteri e lieviti che concorrono alla realizzazione di prodotti di alta qualità.

Di conseguenza, si potrebbero potenzialmente sviluppare delle colture miste formate da una moltitudine di ceppi di lieviti e batteri lattici, che permettano di avere maggior controllo sulla fermentazione, pur ottenendo risultati simili a quelli delle fermentazioni spontanee. In questo modo potrebbe essere ottenuto un controllo delle fermentazioni tipico delle produzioni industriali, con una qualità organolettica elevata presente ad oggi principalmente nelle produzioni artigianali.

BIBLIOGRAFIA

- AICV - European Cider and Fruit Wine Association. (2021). *The richness of the European cider market*. Tratto il giorno Dicembre 12, 2023 da https://aicv.org/files/attachments/.408/Richness_of_European_Ciders.pdf
- AICV - European Cider and Fruit Wine Association. (2022). *European Cider Trends 2022*. Tratto da aicv.org: https://aicv.org/files/attachments/.504/AICV_Cider_Trends_2022.pdf
- Al Daccache, M., Koubaa, M., Maroun, R. G., Salamel, D., Louka, N., & Vorobiev, E. (2020). Impact of the physicochemical composition and microbial diversity in apple juice fermentation process. *Molecules*, *25*(16), 3698.
- Alonso, S., Laca, A., Rendueles, M., Mayo, B., & Díaz, M. (2015). Cider Apple Native Microbiota Characterization by PCR-DGGE. *Journal of the Institute of Brewing*, *121*(2), 287-289.
- Beech, F. W. (1972). Cider making and cider research: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, *78*(6), 477-491.
- Cabranes, C., Moreno, J., & Mangas, J. J. (1990). Dynamics of yeast populations during cider fermentation in the Asturian region of Spain. *Applied Environmental Microbiology*, *56*(12), 3881-3884.
- Calugar, P. C., Coldea, T. E., Salantă, L. C., Pop, C. R., Pasqualone, A., Burja-Udrea, C., . . . Mudura, E. (2021). An overview of the factors influencing apple cider sensory and microbial quality from raw materials to emerging processing technologies. *Processes*, *9*(3), 502.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International journal of Food Microbiology*, *108*(1), 130-135.
- Cousin, F. J., Le Guellec, R., Schlüsselhuber, M., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., & Cretenet, M. (2017). Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. *Microorganisms*, *5*(3), 39.
- del Campo, G., Berregi, I., Santos, J. I., Dueñas, M., & Irastorza, A. (2008). Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresource technology*, *99*(8), 2857-2863.
- Duenas, M., Irastorza, A., Fernandez, K., Bilbao, A., & Huerta, A. (1994). Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*, *59*(5), 1060-1064.
- Gomis, D. B., Gutiérrez, M. D., Moran, M. J., Moreno, J., Dapena, E., Cabranes, C., & Alonso, J. M. (1991). Analytical control of cider production by two technological methods. *Journal of the Institute of Brewing*, *97*(6), 453-456.
- Graça, A., Santo, D., Esteves, E., Nunes, C., Abadias, M., & Quintas, C. (2015). Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology*, *51*, 179-185.
- Han, Y., & Du, J. (2023). A comparative study of the effect of bacteria and yeasts communities on inoculated and spontaneously fermented apple cider. *Food Microbiology*, *111*, 104195.
- Johansen, K. (2000). Cider Production in England and France-and Denmark. *Brygmesteren*, *6*, 2-15.

- Jones, A. (2018, luglio 12). *Cider-Pressing Equipment: A History*. Tratto da Cider Culture: <https://www.ciderculture.com/juicing-systems-cider-pressing-equipment-history/>
- Keller, S. E., Chirtel, S. J., Merker, R. I., Taylor, K. T., Tan, H. L., & Miller, A. J. (2004). Influence of Fruit Variety, Harvest Technique, Quality Sorting, and Storage on the Native Microflora of Unpasteurized Apple Cider. *Journal of Food Protection*, *67*(10), 2240-2247.
- Le Quéré, J.-M., Husson, F., Renard, C. M., & Primault, J. (2006). French cider Characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT-Food Science and Technology*, *39*(9), 1033-1044.
- Leguerinel, I., Cleret, J. J., Bourgeois, C., & Mafart, P. (1988). Yeast strain and the formation of flavour components in cider. *Journal of the Institute of Brewing*, *94*(6), 391-395.
- Leguerinel, I., Mafart, P., Cleret, J. J., & Bourgeois, C. (1989). Yeast strain and kinetic aspects of the formation of flavour components in cider. *Journal of the Institute of Brewing*, *95*(6), 405-409.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Zapparoli, G. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT*, *99*, 224-230.
- Mangas, J., Cabranes, C., Moreno, J., & Blanco, D. (1994). Influence of cider-making technology on cider taste. *LWT-Food Science and Technology*, *27*(6), 583-586.
- Merwin, I. A., Valois, S., & Padilla-Zakour, O. I. (2008, Aprile). Cider Apples and Cider-Making Techniques in Europe and North America. *HORTICULTURAL REVIEWS - WESTPORT THEN NEW YORK* -, *34*, p. 365.
- Morrissey, W. F., Davenport, B., Querol, A., & Dobson, A. D. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(3), 647-655.
- Navarrete-Bolaños, J. L. (2012). Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Engineering in Life Sciences*, *12*(4), 410-418.
- Pando Bedriñana, R., Querol Simón, A., & Suárez Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, *27*(4), 503-508.
- Picinelli, A., Suàrez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L. M., & Mangas, J. J. (2000). Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(9), 3997-4002.
- Puertas, A. I., Arahál, D. R., Ibarburu, I., Elizaquível, P., Aznar, R., & Dueñas, M. T. (2014). *Lactobacillus sicerae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *64*(9), 2949-2955.
- Sánchez, A., Rodríguez, R., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L. A., & Díaz, M. (2010). Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Research International*, *43*(8), 2101-2107.
- Shi, F., Kojovic, T., Esterle, J. S., & David, D. (2003). An energy-based model for swing hammer mills. *International Journal of Mineral Processing*, *71*(1-4), 147-166.
- Soomro, T., Watts, S., Migicovsky, Z., & Myles, S. (2022). Cider and dessert apples: What is the difference? *Plants, People, Planet*, *4*(6), 593-598.
- Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., González García, A., & Querol Simón, A. (2007). A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 778-786.

- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, *11*(2), 139-173.
- Tyakht, A., Kopeliovich, A., Klimenko, N., Efimova, D., Dovidchenko, N., Odintsova, V., . . . Merker, A. (2021). Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. *Food Microbiology*, *94*, 103658.
- United States Department of Agriculture. (2022). *Fresh Apple Domestic Consumption by Country in MT; U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, USA, 2022*. Tratto il giorno Dicembre 12, 2022 da <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=apples&graph=domestic-consumption>
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascòn, N. F., Simòn, A. Q., & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, *24*(1), 25-31.
- Watson, B. (2013). In B. Watson, *Cider, hard and sweet: history, traditions, and making your own* (p. 18-20). The Countryman Press.
- Wilczynski, K., Kobus, Z., & Dziki, D. (2019). Effect of Press Construction on Yield and Quality of Apple Juice. *Sustainability*, *11*(13), 3630.
- Zhao, H., Zhou, F., Dziugan, P., Yao, Y., Zhang, J., LV, Z., & Zhang, B. (2014). Development of organic acids and volatile compounds in cider during malolactic fermentation. *Czech Journal of Food Sciences*, *32*(1), 69-76.