



Università degli Studi di Padova

Laurea triennale in Scienze e Tecnologie Alimentari

EFFETTI DI ALCUNI TRATTAMENTI TECNOLOGICI (ACIDIFICAZIONE E INOCULO DI LIEVITI SELEZIONATI) SULLA MICROFLORA DELLA VINACCIA DURANTE LA FASE DI STOCCAGGIO E IMPLICAZIONI SULLA QUALITÀ DEL DISTILLATO

Relatore:
Corich Viviana
Correlatore:
Bovo Barbara

Laureanda:
Perin Jenny
Matricola nr.
578166

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

1. Introduzione	5
1.1. LA GRAPPA	5
1.1.1. Legislazione	6
1.1.2. Il ciclo produttivo	6
1.1.3. Produzione e consumi	9
1.1.4. La grappa di Prosecco	10
1.2. LA VINACCIA	10
1.2.1. Composizione della vinaccia	12
1.2.2. Conservazione delle vinacce	16
1.3. I LIEVITI PRESENTI SUL GRAPPOLO	18
1.4. I LIEVITI PROTAGONISTI DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA	20
1.4.1. <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	20
1.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.5. BATTERI	23
1.5.1. I batteri acetici	23
1.5.2. I batteri lattici: il loro possibile ruolo in vinaccia	24
1.6. MUFFE	24
1.7. SCOPI DELLA TESI	27
2. Materiali e metodi	29
2.1. IL PIANO SPERIMENTALE	29
2.1.1. Prova di acidificazione	29
2.1.2. Prova di inoculo	29
2.2. CEPPI DI LIEVITO	30
2.2.1. Ceppi isolati da vinaccia	30
2.2.2. Ceppo commerciale	30
2.3. MEZZI CULTURALI E SOLUZIONI	30
2.3.1. Mezzi di isolamento	30
2.3.2. Mezzi di propagazione ordinaria	31
2.3.3. Soluzioni	32
2.4. CONTA MICROBICA	33
2.5. AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI	34
2.5.1. Preparazione dei campioni per l'amplificazione	34
2.5.2. Monitoraggio dei ceppi isolati da vinaccia	34
2.6. RESTRIZIONE E PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE	36
2.7. ESTRAZIONE DNA TOTALE	36
2.8. RESTRIZIONE DNA MITOCONDRIALE	37
2.9. ELETTROFORESI DEI CAMPIONI IN GEL D'AGAROSIO	37
2.7. SEQUENZIAMENTO DI DNA	38

2.8.	PROGRAMMI PER L'ANALISI DI DNA	38
2.9.	DISTILLAZIONE DEI CAMPIONI DI VINACCIA	38
2.10.	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ZUCCHERI	38
2.11.	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE ALCOLICA	39
2.12.	ESTRAZIONE DEI COMPOSTI VOLATILI PRESENTI NEL DISTILLATO	39
2.13.	ANALISI GAS-CROMATOGRAFICHE	39
	3. Risultati	41
3.1.	ALLESTIMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE	41
	3.1.1. Considerazioni preliminari	41
	3.1.2. Piano sperimentale	42
3.2.	PROVA DI ACIDIFICAZIONE	44
	3.2.1. Evoluzione della popolazione microbica	44
	3.2.2. Valutazione dei composti aromatici a fine stoccaggio	50
3.3.	PROVA DI INOCULO	58
	3.3.1. Evoluzione della popolazione microbica	58
	3.3.2. Valutazione dei composti aromatici al termine dello stoccaggio	63
3.4.	CONCLUSIONI	66
	4. Bibliografia	68

RIASSUNTO

In questo lavoro di tesi è stato preso in considerazione l'effetto di due trattamenti tecnologici applicati alla vinaccia destinata alla produzione di Grappa. Il primo è un trattamento di acidificazione, frequentemente impiegato dalle distillerie per contenere la proliferazione della popolazione batterica, mentre il secondo ha previsto l'inoculo di un ceppo di lievito selezionato, scelto tra un pool più ampio di ceppi collezionati durante sperimentazioni precedenti. Nel primo caso sono state confrontate una vinaccia non trattata e una acidificata fino a pH 2,9 al momento dello stoccaggio, fase cruciale per l'ottenimento di un buon distillato. A tre tempi di campionamento (al tempo T0, dopo 15 giorni e al termine dello stoccaggio) è stata isolata la microflora presente evidenziando come nel caso del trattamento di acidificazione si verifichi un effettivo contenimento della popolazione batterica. L'analisi gas-cromatografica dei distillati ottenuti in laboratorio al termine dell'insilamento evidenzia come nel caso della vinaccia non trattata la concentrazione di composti aromatici sia più elevata rispetto a quella acidificata.

Per quanto riguarda l'inoculo di un lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la dinamiche di popolazione monitorate a tre tempi di campionamento hanno evidenziato che non vi sono differenze sostanziali tra controllo e inoculato. Mediante analisi molecolari è stato possibile verificare la presenza del ceppo introdotto al momento dello stoccaggio e fino a 15 giorni.

ABSTRACT

The present work was aimed at focusing the effects of two acidification treatments of grape pomace destined to the production of Grappa, during the storage period. The first is an acidification treatment, commonly adopted by the distilleries to limit bacterial proliferation, whereas the second is the inoculation with a selected yeast, chosen from a wide pool of isolates collected during previous experimentations. In the first case, non-treated grape marcs were compared with acidified grape marcs up to pH 2,9. In order to evaluate the dynamics of the indigenous microorganisms, three different samplings were made during the storage period (T0, after 15 days and at the end). Quantification of yeasts and bacteria, evidenced that low pH limits bacterial growth throughout the ensilage period. Gas-chromatographic analysis of the distillates obtained from marcs at the end of the storage period, show that the concentration of aromatic compounds is higher in non-acidified than in acidified grape marc.

As regards the inoculation of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast, population dynamics monitored at three sampling times showed no differences between control and inoculated pomace. By means of molecular methods, the presence of the inoculated yeast during the first 15 days of storage was assessed.

Introduzione

1.1 LA GRAPPA

La denominazione "grappa" è riservata esclusivamente all'acquavite di vinaccia ottenuta dalle materie prime per distillazione mediante vapore acqueo, oppure dopo l'aggiunta di acqua nell'alambicco di vinacce fermentate o semifermentate ricavate da uve prodotte, vinificate e distillate in impianti ubicati nel territorio italiano o in alcune zone ben definite della Svizzera.

Nella produzione della grappa è consentito l'impiego di fecce liquide naturali di vino, materia semiliquida residuale all'atto della svinatura, ricca di frammenti vegetali del grappolo, di lieviti e batteri, sali tartarici. Il contenuto di feccia consentito non deve superare i 25 Kg per 100 Kg di vinacce utilizzate, mentre la quantità di alcole proveniente dalle fecce non può superare il 35% della quantità totale di alcole nel prodotto finito (Regolamento CEE N. 1576/89).

La distillazione delle vinacce fermentate o semifermentate, in impianto continuo o discontinuo, deve essere effettuata a meno di 86% in volume; entro tale limite è consentita la ridistillazione del prodotto ottenuto. Per poter essere immessa al consumo la grappa deve avere un titolo alcolometrico non inferiore a 37,5 % in volume.

Nella preparazione della grappa è consentita l'aggiunta di:

- a) sostanze aromatizzanti naturali e preparazioni aromatiche;
- b) piante aromatiche o loro parti, nonché frutta o loro parti;
- c) zuccheri, nel limite massimo di 20 grammi per litro, espresso in zucchero invertito;
- d) caramello, solo per la grappa sottoposta ad invecchiamento almeno dodici mesi,.

E' ammessa la miscelazione fra grappe che differiscano tra loro, purché il prodotto finito venga posto in vendita con la sola denominazione "grappa"; la miscelazione può essere effettuata anche fra grappe aventi diverso periodo di invecchiamento. Nella presentazione e nella promozione del prodotto ottenuto l'eventuale indicazione dell'invecchiamento deve essere riferita alla componente che ha maturato la durata minore.

La classificazione delle grappe avviene essenzialmente in relazione alla durata dell'invecchiamento e alla vinaccia utilizzata (Odello L., 1999).

- Grappa giovane o bianca, viene imbottigliata al termine della distillazione o dopo aver riposato per un periodo variabile in contenitori di materiale impermeabile e inerte. E' incolore, dal profumo delicato e dal gusto secco.
- Grappa affinata: è mantenuta in botti di legno per un periodo di 3-8 mesi, inferiore a quello prescritto dalla legge per essere denominata "invecchiata".
- Grappa invecchiata, rimane in recipienti di legno per un periodo minimo di 12 mesi, quella denominata stravecchia o "riserva" almeno 18 mesi, in botti di legno non verniciato (rovere, frassino, ciliegio, gelso). Tramite l'invecchiamento, la grappa assume dal legno una tonalità che va dal giallo paglierino al giallo carico, dorato o ambrato.
- Grappa aromatica: ottenuta da varietà di uve quali Moscato, Malvasia, il cui aroma varietale viene trasmesso al distillato.
- Grappa aromatizzata, imbottigliata con erbe, infusi, diversi tipi di frutti come ribes o bacche di sambuco, o altre sostanze naturali.

1.1.1 Legislazione

La legislazione attribuisce ad un numero limitato di grappe la possibilità di fregiarsi di determinati titoli, garantiti dalla legislazione italiana a giustificare una migliore qualità del prodotto quando concorrono le seguenti condizioni :

- a) le grappe sono ottenute da materie prime ricavate da uve prodotte e vinificate nelle aree geografiche cui fa riferimento l'indicazione;
- b) le grappe hanno un titolo alcolometrico non inferiore al 40 per cento in volume;
- c) tutte le operazioni sono effettuate nelle aree geografiche di cui alla lettera a), esclusi l'imbottigliamento e le attività strettamente connesse;
- d) le grappe non sono miscelate con altre grappe prodotte al di fuori della zona geografica.

1.1.2 Il ciclo produttivo

La filiera produttiva della grappa parte dalla vigna, essendo le vinacce solo i residui finali delle operazioni di vinificazione. Prima di arrivare ad essere materia prima per la grappa, l'uva è sottoposta infatti alle procedure enologiche secondo modalità variabili in base al vino che si vuole ottenere. I punti chiave possono essere così riassunti:

- Raccolta: effettuata a seconda del grado di maturazione dell'uva raccolto e dipendente da fattori climatici, geografici e di coltivazione;
- Pigiatura: durante questa fase gli acini vengono rotti liberando il succo (da questo momento definito mosto), che verrà destinato alla fermentazione e alla produzione del vino. Spesso a questa operazione si affianca la diraspatura;
- Fermentazione: operata dai lieviti che sviluppano l'etanolo a partire dagli zuccheri contenuti nell'uva. Un'importante differenziazione che si riflette sulla tipologia di vinaccia e di conseguenza sulla produzione della grappa è il tipo di vinificazione. Nella vinificazione in bianco, in seguito all'operazione di pigiatura, vi è immediatamente separazione tra mosto e parti solide mentre nella vinificazione cosiddetta in rosso, in seguito alla rottura degli acini le parti solide e il mosto vengono lasciate a contatto, nella maggioranza dei casi fino al termine della fermentazione.
- Torchiatura o svinatura: indica un'operazione di pressatura delle parti solide per raccogliere il liquido, nella vinificazione in rosso separa i resti dal vino a fine fermentazione, nella vinificazione in bianco è contemporanea alla pigiatura. Oltre alle parti solide si ottiene anche un sottoprodotto semisolido rimanente nei fondi dei tini di fermentazione che è detto vinello.

Da queste operazioni deriva la materia prima, la vinaccia, destinata alla distillazione. Per tale operazione vengono impiegati due sistemi: l'impianto discontinuo, quando si dispone di vinacce di elevato pregio e di un ottimo sistema di conservazione delle stesse, e l'impianto continuo nel caso di vinacce di qualità media, che quasi sempre completano la fermentazione nei silos delle distillerie e vengono insilate per tempi medio – lunghi, allo scopo di ridurre i tempi di permanenza. La scelta dell'impianto da utilizzare dipende da fattori quali la quantità ed il tipo di vinacce, il sistema d'insilamento, il livello qualitativo ricercato, il tipo di grappa, la produzione giornaliera ed i relativi costi.

I sistemi tradizionali per la distillazione discontinua prevedono l'impiego di tre tipi di alambicchi, nei quali la vinaccia viene caricata, lavorata e poi scaricata:

- Alambicchi a fuoco diretto, quasi in disuso in quanto l'uso del fuoco diretto comporta spesso gusti di cotto e di bruciato nella grappa.

- Alambicchi a bagnomaria, basati sul lento e delicato riscaldamento della vinaccia, che in questo caso non viene a contatto con il metallo, poiché sono dotati di una doppia caldaia nella cui intercapedine viene immessa acqua in ebollizione o vapore. La qualità della distillazione è di alto livello e capace di donare aromi delicati e note morbide al prodotto finale.
- Alambicchi a vapore diretto, costituiti da due o più caldaiette collegate in serie, la colonna di distillazione ed un condensatore. Il vapore passa attraverso le vinacce e produce una “flemma” contenente il 20-25% in alcol (Da Porto C., 2006).

La flemma passa attraverso una colonna di distillazione che permette di eliminare le impurità concentrando la frazione alcolica, generando tre frazioni: testa, corpo e coda. La prima è per lo più formata da sostanze che possiedono un punto di ebollizione inferiore a quello dell'alcol etilico (le prime ad uscire dall'alambicco) come l'acetato di etile, acetaldeide, acetato di metile, che sono spesso negative per la qualità del distillato. Il corpo contiene i costituenti più apprezzati per l'aroma che evaporano tra i 78,4°C e i 100°C. Le code sono composte dalle sostanze con punti di ebollizione superiore ai 100 °C, in particolare alcoli superiori e furfurolo; questa componente contiene solo il 10 % di etanolo. Per ottenere un prodotto più pulito e più ricco in alcol è necessario effettuare alcune operazioni fondamentali quali la deflammazione e la rettifica, che permettono di eliminare le impurità concentrando la frazione alcolica e, la successiva demetilazione che consente di ridurre la concentrazione di alcol metilico (fino al valore di 1g% a.a. consentito dalla legge). Questi passaggi sono realizzati mediante apposite colonne di distillazione, pur se con parziale perdita di sostanze pregiate, quali esteri e acetali. Alla fine del processo il distillato, caratterizzato da un contenuto alcolico pari al 70-80 %, viene immagazzinato all'interno di recipienti in acciaio e vetroresina, dotati di agitatori termici che favoriscono l'ossigenazione e mantengono la temperatura a valori costanti. Il tutto è posto sotto sigillo dagli ufficiali del Ministero della Finanza per circa 5-6 mesi.

Prima dell'imbottigliamento vengono eseguite delle analisi per accertare le caratteristiche stabilite dalla legislazione. Il titolo alcolometrico volumico per il consumo, compreso tra i 40°-60°, è ottenuto mediante diluizione con acqua demineralizzata (D.P.R n. 236/1988). Segue un periodo di refrigerazione, che comporta un intorbidimento della grappa dovuto all'insolubilizzazione della

frazione aromatica rancido-oleosa, a temperature variabili da $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in relazione al tipo di distillato (grasso, delicato, aromatico, semi-aromatico o neutro). Per eliminare l'intorbidamento sono necessarie le operazioni di filtrazione e chiarifica, trattamenti che possono però asportare quote significative di profumi e di impurità essenziali al bouquet, ma non eliminano difetti derivanti da uno scorretto insilamento delle vinacce. Una volta resa brillante e cristallina, la grappa è sottoposta ad imbottigliamento; il prodotto finito va stoccato per un periodo di riposo e di recupero organolettico non inferiore ai sessanta giorni e solo dopo può essere immesso nel mercato.

Durante l'invecchiamento hanno luogo dei fenomeni chimico-fisici: il distillato è in grado di estrarre dal legno sostanze polifenoliche e avviare reazioni di etanolisi a carico della lignina, un polimero fenolico simile alla plastica (potere solvente dell'alcol). Si possono verificare inoltre reazioni ossidative favorite dalla permeabilità del legno all'ossigeno e processi di evaporazione di piccole molecole.

1.1.3 Produzione e consumi

Esistono essenzialmente tre categorie di imprese produttrici di grappa:

- le distillerie vere e proprie, circa 130;
- gli imbottiglieri (circa 500), che acquistano grappa da diverse distillerie e le miscelano secondo le loro ricette; rendono inoltre il prodotto idoneo ad essere immesso sul mercato e consumato;
- i commercianti con marchio proprio, che si fanno confezionare il prodotto da una distilleria o da un imbottigliatore (circa 1000).

La produzione di grappa è strettamente legata alla produzione italiana di uve. Di fatto meno di un terzo della vinaccia è utilizzata per produrre grappa, ma si tratta della vinaccia migliore, la più selezionata. Sulla grappa lo Stato impone un'imposta elevata sulla produzione e sul consumo di tale distillato, così come avviene per oli minerali e tabacchi lavorati, generata dal recepimento della normativa comunitaria e finalizzate a contrastare il consumo e la fabbricazione clandestini della grappa; tutte le bottiglie la cui produzione è stata autorizzata sono provviste di un contrassegno di Stato.

1.1.4 La grappa di Prosecco

La notevole produzione di uva Prosecco nella provincia di Treviso comporta, inevitabilmente, una consistente produzione di vinaccia di questa varietà, fino ad arrivare ad esserne un prodotto rappresentativo. Nell'ultimo decennio si è poi arrivati alla completa valorizzazione delle grappe monovitigno, ed è in questo panorama che si inserisce la grappa di Prosecco (Boatto et al., 2003).

La grappa di Prosecco è caratterizzata dai contenuti considerevoli di composti volatili varietali della classe dei terpenoli (linalolo, geraniolo, ossidi del furan linalolo, nerolo e citronellolo) e da contenuti rilevanti di esteri salicilici, di farnesolo, di vitispirani (Flamini et al., 2002a).

1.2 LA VINACCIA

La vinaccia è definita dalla legislazione italiana come il complesso delle parti solide che rimane dopo la pigiatura e la pressatura dell'uva, costituito da bucce, vinaccioli ed eventualmente dai raspi (Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998). La presenza o meno del raspo dipende dalle tecniche di vinificazione adottate in cantina, Per lungo tempo è stata considerata un sottoprodotto della vinificazione ma oggi in realtà rappresenta la materia prima necessaria alla produzione della grappa. Le parti del grappolo che si possono ritrovare nelle vinacce sono:

- **Raspi:** sono formati per 80% (in peso) di acqua, il 3% in tannini, 2 – 3% sostanze minerali specialmente sotto forma di sali di potassio. La loro presenza è poco gradita nel processo di vinificazione poiché il contatto del liquido con i raspi provoca la perdita per di zuccheri dal mosto, portando ad una diminuzione del grado alcolico. Inoltre i tannini contenuti hanno un gusto amaro e astringente e il loro passaggio nel mosto ne peggiora la qualità. Lo scarto dei raspi durante la vinificazione fa sì che essi siano raramente presenti nelle vinacce conferite.
- **Buccia:** è la parte che rimane maggiormente al termine della vinificazione e si ritroverà con la più alta percentuale nella composizione delle vinacce. E' composta da tessuti molto "densi", sia a causa dell'elevata concentrazione delle cellule, sia per la presenza, al loro interno, di grossi vacuoli ricchi di sostanze importanti per l'aroma e l'aspetto dell'uva. L'epidermide è ricoperta dalla pruina, una polvere che da un lato protegge e rende impermeabile l'acino, dall'altro permette l'adesione al grappolo di batteri e lieviti portati dal vento. La presenza di questa flora microbica naturale è essenziale per il decorso della fermentazione

alcolica. L'ipodermide è il tessuto più interno della buccia, composto da sostanze coloranti, tannini e aromi dell'uva. Nei vitigni non aromatici (la maggioranza) è una zona di fondamentale importanza, è infatti l'unica a contenere aromi e colori.

- Polpa: è divisibile in tre zone: esterna, intermedia e interna. Dal punto di vista vinicolo la zona più importante è quella intermedia, più voluminosa e con cellule ricche di sostanze metabolizzate e pareti disorganizzate a maturazione, aspetto che facilita la rottura della parete e l'uscita del succo. La zona esterna invece è poco spessa e riveste la faccia interna della buccia, infine la parte interna contiene i vinaccioli.

Semi o vinaccioli: si ritrovano nella vinaccia in un buon quantitativo, solitamente il 25% della massa. Contengono dal 5 – 8% di tannini, grossolani ed eccessivamente astringenti e oli che possono nuocere alla qualità del mosto.

Sulla qualità della vinaccia incidono sia fattori tipici della produzione enologica sia fattori introdotti dalla filiera della grappa, tra cui:

- il tipo (monovitigno) o i tipi del vitigno di partenza (particolare uva di partenza, aromi, odori, ecc.);
- il clima: è un fattore molto importante nell'uva e di conseguenza nella grappa, in quanto una buona escursione termica tra giorno e notte favorisce un alto contenuto in terpeni (classe di composti chimici molto eterogenea che si accumulano nell'uva durante la fase di maturazione);
- la tecnica di coltivazione usata;
- tipo di lavorazione, ammostamento e fermentazione;
- modalità e durata della fermentazione/conservazione prima della distillazione delle vinacce.

Analizzando il loro potenziale alcolico, le vinacce possono essere differenziate in tre diverse tipologie: vergini, fermentate e parzialmente fermentate.

- Le vinacce vergini: provengono da vinificazioni nelle quali le parti solide vengono allontanate dal mosto appena completata la pigiatura dell'uva (vinificazione in bianco), per cui non contengono alcol ma solo zuccheri. Esse sono caratterizzate da un odore erbaceo o addirittura piatto, un colore vivo e una buona consistenza al tatto. Queste vinacce vengono fatte fermentare cercando di controllare l'andamento e la velocità del processo fermentativo, responsabile in buona misura della qualità finale del distillato (Chinnici F. et al., 2001).

- Le vinacce fermentate: iniziano e completano la fermentazione alcolica insieme con il mosto durante la vinificazione “in rosso”, pur conservando qualche residuo zuccherino. Quindi, esse partecipano alla caratterizzazione del futuro vino e acquisiscono, d’altro canto, vinosità e sapori non riscontrabili nelle vinacce vergini. La grappa che deriva da questo tipo di vinificazione si presenterà più pulita nel corpo, con sapori più netti e più delicati. Infatti in questo tipo di vinacce, che fermentano nel proprio mosto-vino, la trasformazione degli zuccheri avviene a valori di pH compresi tra 3,0-3,2, ottimali per una buona selezione dei lieviti a scapito dei batteri, ad una buona acidità e ad una temperatura che varia tra i 20-30°C, consentendo quindi un decorso regolare di tutta la fermentazione alcolica e favorendo il formarsi dei vari prodotti secondari in un contesto organolettico equilibrato.

1.2.1 Composizione della vinaccia

La composizione chimica della vinaccia subisce variazioni con l’andamento stagionale, la varietà del vitigno, il luogo di provenienza, l’epoca della vendemmia e le tecniche di vinificazione utilizzate (De Rosa e Castagner, 1994).

I contenuti medi delle sostanze che si trovano nella vinaccia sono riportati in tabella 1.1.

<i>Sostanza</i>	<i>% in peso</i>
Acqua	50-70%
Cellulosa	10-20%
Zuccheri	6-8%
Grassi	2-4%
Acidi organici	1-2%
Tannini	1-2%
Sostanze minerali	1-2%

Tabella 1.1 Composizione media della vinaccia (De Rosa e Castagner, 1994).

Acqua

E' la componente più abbondante, come del resto in qualsiasi tessuto vegetale. Il suo contenuto è legato allo stadio di maturità al momento della vendemmia e alle condizioni vegetative della pianta. La quantità d'acqua della vinaccia è un parametro diverso dal valore dell'umidità di queste, il quale risente della presenza di mosto. Le vinacce migliori sono quelle non completamente pressate, ricche in liquido vinoso, con un grado di umidità che varia dal 55 al 70%, che consente di sfruttare meglio il materiale vegetale estraendo le caratteristiche organolettiche dal vitigno.

Cellulosa

Le caratteristiche peculiari di questo polimero lineare del D-glucosio, presente in percentuale del 10-20% nelle bucce, sono l'insolubilità in acqua e la scarsa conducibilità termica.

Zuccheri

Nell'acino è la polpa a contenere gli zuccheri che si ritroveranno poi in parte nella vinaccia. I principali sono glucosio e fruttosio il cui rapporto, al momento della maturazione fisiologica dell'uva, è di circa 0,9:1. In quantità inferiore sono presenti anche zuccheri non fermentescibili a 5 atomi di carbonio (pentosi): arabinosio (0,5 – 1,7 g/l), xilosio e derivati, esosi come metile pentosio (ramnosio), galattosio e derivati. Dal punto di vista energetico i lieviti prediligono il glucosio al fruttosio, facendo sì che mentre nelle vinacce vergini gli zuccheri siano ancora presenti nelle stesse proporzioni della raccolta, nelle vinacce fermentate il glucosio sia molto meno presente e il fruttosio rappresenti fino al 75% dello zucchero residuo. Oltre a zuccheri fermentescibili e non, un'altra categoria di zuccheri, meno importanti per l'apporto energetico ma in grado di influenzare molto l'aroma della vinaccia, sono gli zuccheri eterosidi. Questi zuccheri detti agliconi sono contenuti prevalentemente nelle parti solide dell'uva che costituiscono la maggioranza della vinaccia. In queste molecole lo zucchero è legato con una parte non glucidica, rappresentata solitamente da sostanze coloranti, tannini, sostanze pectiche e aromatiche. L'importanza degli agliconi è dipendente dal tipo di molecola legata allo zucchero e si esprime solo all'atto

della rottura di questo legame funzionando come una sorta di riserva di molecole odorose.

Acidi organici

I principali acidi organici presenti nella vinaccia sono: acido tartarico, acido malico, acido citrico e acido succinico.

L'acidità è dovuta principalmente all'acido tartarico, gli altri acidi sono salificati da potassio, calcio e magnesio. L'acidità delle vinacce comunque varia in funzione di vari aspetti, tra cui i più importanti sono la quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce, la varietà dell'uva e l'andamento stagionale; per esempio annate piovose o aride corrispondono ad una bassa acidità (De Rosa e Castagner, 1994). Buoni valori di acidità determinano una fermentazione più regolare, questo sia grazie ad un'azione selettiva operata sui lieviti che interessano la fermentazione alcolica, sia per un'azione inibente sui batteri che demoliscono l'acido tartarico ed altri acidi organici come l'acido malico.

L'acido L(-)malico è presente naturalmente nelle uve ed è il substrato sia di lieviti che di batteri malolattici, quindi la sua concentrazione può variare durante la lavorazione dell'uva e delle vinacce. L'acido lattico si può formare da due fonti: come sottoprodotto della fermentazione dei lieviti o come prodotto principale della fermentazione malolattica. Gli acidi fino ad ora menzionati costituiscono l'acidità fissa delle vinacce; l'acidità volatile è data dall'acido acetico, che viene formato durante la fermentazione dei lieviti ed è il risultato di una reazione secondaria dell'ossidazione dell'acetaldeide.

Sostanze pectiche

Le sostanze pectiche presenti nella buccia, sono costituite da lunghe catene lineari di acido galatturonico, le cui funzioni acide sono in parte libere ed in parte esterificate con gruppi metilici.

L'azione enzimatica della pectin-metil-esterasi di origine vegetale durante il periodo di stoccaggio, favorita dalle temperature di fermentazione e di distillazione, può contribuire a liberare una frazione elevata di alcol metilico (De Rosa T. e Castagner R., 1994). La presenza di alcol metilico nelle vinacce è influenzata pertanto dalle modalità d'insilamento (si forma più rapidamente nelle uve bianche che nelle rosse), dal metodo di lavorazione in cantina e dal tipo di vitigno.

Sostanze aromatiche

Gli strati più interni della buccia sono sede della maggior parte degli aromi varietali o primari, molecole odorose come linalolo (responsabile dell'aroma del vino Moscato), nerolo, citronellolo e geraniolo appartenenti per lo più alla famiglia dei terpeni. Questi, pur avendo un punto di ebollizione elevato (dai 150°C ai 198°C), sono in grado di passare dalla vinaccia all'acquavite rendendola riconoscibile organoletticamente (Odello L. et al., 1997). Non tutti i vitigni posseggono molecole aromatiche e questo consente la distinzione tra varietà a frutto neutro e varietà a frutto aromatico come Moscato, Malvasia, Müller Thurgau, Riesling, Silvaner, Sauvignon e Traminer.

I terpeni, sostanze aromatiche primarie localizzate negli strati più interni dell'epicarpo, si ritrovano, per il loro elevato punto di ebollizione, nelle code del distillato. Reazioni di ossidazione, che possono intervenire durante la fermentazione alcolica, possono modificare queste molecole aromatiche, producendo composti completamente privi di interesse organolettico ed un prodotto alquanto scadente.

Gli aromi secondari che evaporano soprattutto nelle prime fasi della distillazione e in quelle finali, sono costituiti da alcuni alcoli, esteri, acidi, aldeidi e chetoni, prodotti durante la fermentazione alcolica o dai lieviti. Tra questi, i maggiori responsabili di ciò che viene definito aroma secondario dei distillati sono sicuramente gli alcoli superiori e gli esteri etilici di alcuni acidi grassi a corta e media catena, saturi e insaturi (Ruberto G. et al., 2008). I composti volatili vengono valutati tramite la definizione di 3 parametri:

- soglia di percezione: la concentrazione che un composto deve avere per essere percepito;
- soglia di riconoscimento: la concentrazione che un composto deve avere per essere percepito e riconosciuto;
- soglia di gradimento: la concentrazione di un composto oltre la quale questo conferisce aromi sgradevoli al prodotto (Vincenzini et al., 2005).

Composti polifenolici

Categoria di composti assai eterogenei e molto importanti, differenziata in polifenoli colorati o incolore (detti anche sostanze tanniche). I primi sono contenuti solitamente nelle bucce e raccolgono pigmenti coloranti di natura polifenolica, come antociani e flavani nelle uve a bacca rossa, solo flavani nelle uve a bacca

bianca. I secondi invece raccolgono sia molecole polifenoliche singole o poco condensate come acidi fenolici, catechine e leucoderivati delle sostanze coloranti, che i tannini veri e propri, formati da svariate unità fenoliche condensate e dotati di un alto peso molecolare; la loro finezza è proprio in relazione a queste caratteristiche, mentre i polifenoli più semplici, contenuti nella buccia, hanno un profilo più fine, le molecole tanniche raccolte nel secondo gruppo, presenti in raspi e vinaccioli, determinano invece un gusto sgradevole e astringente.

1.2.2 Conservazione delle vinacce

Essendo un sottoprodotto della vinificazione, la qualità della vinaccia è legata alla produzione del vino. Ciò complica notevolmente la filiera produttiva della grappa, in quanto è normale per questo tipo di produzione che in un periodo di tempo molto limitato provengano dalla vinificazione un gran quantitativo di vinacce da processare. Tecnicamente la massima resa in distillazione e la massima qualità del distillato ottenibile dipendono dal tempo che intercorre tra l'arrivo della vinaccia fresca e la distillazione: quanto più breve è questo periodo e più fresca è la vinaccia, tanto migliore sarà la qualità finale del prodotto. Purtroppo però le distillerie, non sono in grado di processare tutta la materia prima in un arco di tempo limitato a ridosso della raccolta; si rende, così, necessaria la conservazione di grandi quantità di vinacce avviate a poco a poco alla distillazione. La procedura standard per tale conservazione nell'industria prevede l'insilamento in contenitori di grandi dimensioni come vasche o silos in cemento o ferro (in questo caso rivestiti di resina epossidica) o addirittura in legno per evitare il contatto con l'atmosfera. Durante questa operazione le vinacce vengono disposte in strati e pressate per eliminare l'aria presente, inoltre, sempre per proteggere le vinacce dal contatto con l'ossigeno dell'aria, vengono utilizzate coperture di materiale plastico. La preparazione e l'inserimento della vinaccia in questo tipo di contenitori dovrebbe avvenire nel minor tempo possibile, in quanto già poche ore dopo la svinatura (l'operazione di separazione dal mosto delle vinacce), si sviluppano reazioni negative per la qualità del distillato. L'operazione di insilamento deve essere portata a termine nelle condizioni corrette: i contenitori devono essere puliti e esenti da muffe e sostanza organica residua, in più la massa della vinaccia deve essere inserita evitando contatti con l'aria, altrimenti l'insilato può sviluppare reazioni indesiderate, danneggiando considerevolmente il

materiale di partenza. L'operazione di insilamento è cruciale nella filiera della grappa, in quanto ricordando quanto detto sopra, nel caso di vinacce che hanno già completato la fermentazione (di solito rosse), questa operazione è fatta esclusivamente per conservare e sarebbe eventualmente facoltativa, nel caso in cui la distilleria riesca a organizzare in maniera ottimale la produzione, mentre nel caso delle vinacce vergini l'insilamento delle vinaccia è necessario per consentire la degradazione degli zuccheri e di conseguenza una fermentazione alcolica efficiente. Il pericolo durante questa fase è di ottenere una flemma di bassa qualità e questo può dipendere dallo sviluppo di fermentazioni anomale da parte di batteri o errate condizioni di conservazione, azione ossidativa da parte dell'aria e reazioni enzimatiche inattese. Innanzitutto gli zuccheri residui possono essere attaccati da lieviti scarsi fermentatori ottenendo quindi poco alcol etilico e molti composti solforati. Per opera dei batteri acetici, l'alcol presente può venir degradato ad acido acetico, che essendo un composto volatile provoca grossi problemi abbassando la qualità del distillato e del prodotto. L'acido acetico è infatti in grado di passare nella grappa conferendo un sapore pungente e sgradevole, inoltre legandosi con l'alcol etilico è in grado di formare un estere (acetato di etile) che dà anch'esso odore d'aceto. Se le vinacce sono mal conservate si possono alterare in maniera grave in 12 – 14 ore e anche se conservate in maniera adeguata dopo 24 – 36 ore si sviluppa ugualmente alcol metilico che dovrà essere eliminato durante la distillazione. Tutte queste alterazioni inficiano irreversibilmente l'utilizzo delle vinacce per la distillazione. (De Rosa T. e Castagner R., 1994).

Per evitare questi problemi si utilizzano alcune pratiche comuni in particolare relativamente ai sistemi di stoccaggio:

- teli in polietilene, posti sopra le vinacce e pressati con vari accorgimenti per evitare la presenza e il contatto con l'ossigeno, generalmente prima della copertura si può aggiungere acido solforico per mantenere un valore di pH abbastanza acido;

- sacchi o contenitori di plastica che permettono di riporre meglio la vinaccia, pressata e chiusa e, trasportarla in breve tempo in distilleria; . si possono utilizzare anche in alternativa, bins e casse di plastica per alimenti;

- sacconi di materiale plastico utilizzati per insilare meccanicamente grandi quantità di vinacce.

1.3 I LIEVITI PRESENTI SUL GRAPPOLO

Non vi sono in letteratura studi riguardanti in modo specifico le popolazioni di lieviti che vivono nell'ambiente della vinaccia. Tuttavia, essendo quest'ultima costituita principalmente dalle bucce degli acini, una parte dei lieviti presenti è quella che si può isolare sulla superficie della bacca. La diversità della microflora dell'uva può essere attribuita a diversi parametri, tra cui la varietà dell'uva, il grado di maturazione, l'annata, la posizione geografica, le condizioni climatiche, le pratiche viticole ed enologiche (Pramateftaki P.V. et al., 2000). In generale sono pochi i lieviti riscontrati sugli acini immaturi ($10-10^3$ ufc/g), ma con la maturazione e fino alla vendemmia, quando gli zuccheri diffondono sulla superficie, la popolazione raggiunge le 10^4-10^6 ufc/g. Sui grappoli immaturi predominano i generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*. Questi si ritrovano anche nei grappoli maturi, ma in minor quantità rispetto ai lieviti apiculati a metabolismo ossidativo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, che sembra dominino anche sui frutti danneggiati, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Il principale agente della fermentazione *Saccharomyces cerevisiae* non è presente oppure viene rilevato a bassissime concentrazioni (Fleet G. H., 2003).

Tra le specie più frequenti appartenenti ai generi già citati sono state isolate: *Rhodotorula glutinis*, *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens* e *kluveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Taphrina* spp., una specie ancora non del tutto caratterizzata (Rousseau S. et al, 2001).

La predominanza di alcune specie su altre è influenzata da alcuni fattori quali la loro adesione alla superficie, il metabolismo dei nutrienti disponibili, la tolleranza a inibitori chimici naturali o artificiali e l'interazione con altre specie (lieviti, batteri e funghi).

Hanseniaspora

I lieviti di questo genere, appartenenti alla famiglia delle *Saccharomycoidaceae*, in stretto rapporto con i lieviti del genere *Kloeckera* di cui rappresentano la forma perfetta (sporigena) sono tutti dotati di attività fermentativa.

Il genere comprende sei specie: *H. gulliermondii* (dominante nei mosti delle zone a clima temperato-caldo), *H. occidentalis*, *H. osmophila*, *H. uvarum* (produce tossine killer contro ceppi di *S. cerevisiae*), *H. vineae*, *H. valbyensis*, che si

differenziano per il numero e la forma delle ascospore, per lo sviluppo in saccarosio, maltosio, glicerolo e 2-chetogluconato.

Ad essi è attribuita principalmente l'alta acidità volatile (acido acetico e i suoi esteri) presente in alcuni vini, perciò dal punto di vista enologico sono considerati negativi.

Pichia

Genere appartenente alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*, sono lieviti quasi totalmente privi di attività fermentativa in modo variabile a seconda delle specie, producono basse concentrazioni di alcol (0,2-4,5 %), grandi quantità di acido acetico (1-2 g/l) ed etil-acetato. Possiedono notevoli capacità ossidative per cui sono in grado di sviluppare alla superficie dei liquidi insieme ad alcune specie del genere *Candida*, provocando la fioretta dei vini. La specie più importante è *Pichia membranaefaciens*, priva di attività fermentativa.

Candida

Il genere è molto eterogeneo e comprende alcune specie di interesse enologico. Non tutte sono dotate di attività fermentativa; alcune come *Candida stellata* possono essere dominanti in fermentazioni a basse temperature, 10°C, perché a queste temperature aumenta la resistenza all'alcol. La specie *Candida pulcherrima*, spesso presente nelle prime fasi di fermentazioni spontanee, è di stata recente ricollocata tassonomicamente nel genere *Metschnikowia*.

Zygosaccharomyces

Il genere comprende 9 specie: *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. cidri*, *Z. fermentati*, *Z. florentinus*, *Z. mellis*, *Z. microellipsoides*, *Z. mrakii*, *Z. rouxii*. Questi lieviti sono importanti per la loro fermentazione preferenziale del fruttosio rispetto al glucosio ed in particolare per la loro osmotolleranza: essi sono infatti capaci di sviluppare a concentrazioni zuccherine tra il 50- 60 %. Sono inoltre resistenti ad alti livelli di SO₂, di etanolo (18 %) e ai conservanti (acido ascorbico e benzoico). Possono essere presenti nei mosti in cui è avviata la fermentazione spontanea essendo dotati di buon vigore fermentativo.

Rhodotorula

Attualmente a questo genere appartengono 8 specie, sei delle quali sono in grado di assimilare nitrati, e non sono dotate di attività fermentativa. Sono lieviti

anamorfi assegnati al gruppo dei Basidiomiceti. Su piastra di Malt agar le colonie sono rosa, arancioni, rosse, giallognole, di consistenza dal burroso al mucoide; la colorazione della colonia è determinata dalla produzione di pigmenti carotenoidi.

Cryptococcus

I lieviti appartenenti a questo genere sono Basidiomiceti, non possiedono attività fermentativa e, a differenza delle specie di *Rhodotorula*, sono in grado di assimilare l'inositolo (Esteve-Zarzoso B. et al, 1999).

1.4 I LIEVITI PROTAGONISTI DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

I lieviti che sono in grado di trasformare in modo ottimale i mosti e che, in genere, dominano la microflora naturale quando è avviata la fermentazione alcolica, appartengono principalmente al genere *Saccharomyces*. Di seguito sono riportate le caratteristiche più salienti delle specie appartenenti a questo genere.

1.4.1 Il gruppo *Saccharomyces sensu stricto*

Nel corso degli ultimi anni il genere è stato oggetto di continue revisioni dal punto di vista tassonomico. Per circa trent'anni le specie sono state suddivise, in modo non formale, in due gruppi, i *Saccharomyces sensu lato* e i *Saccharomyces sensu stricto*, il primo costituito da microrganismi con caratteristiche proprie del genere, ma che hanno habitat particolari e scarso vigore fermentativo, il secondo da tutte quelle specie con elevato interesse tecnologico.

Un approccio multigenico che ha preso in considerazione l'analisi del DNA ribosomale, del fattore di elongazione EF-1 α , della subunità piccola dell'rDNA mitocondriale, della COXII (citocromo ossidasi II, mitocondriale) ha determinato l'eliminazione dell'intero gruppo sensu lato. Le 10 specie *S. barnetti*, *S. castelli*, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. rosinii*, *S. servazzii*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis*, *S. unisporus* sono state riclassificate all'interno dei generi *Kazachstania*, *Naumovia* e *Lachancea* (Kurtzman C.P. 2003).

La classificazione odierna del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* è frutto di un lungo lavoro tassonomico che ha previsto grosse revisioni dovute al fatto che le 7 specie sono caratterizzate da elevate affinità genetiche. Recenti acquisizioni nel campo della genomica del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* hanno messo in evidenza considerevoli riarrangiamenti genetici avvenuti tra gli individui appartenenti alle 4 specie principali. Alcune delle specie esistenti, infatti, non

sono altro che individui ibridi. In particolare il ceppo tipo *S. bayanus* NRRL Y-12624 T sembra essere il prodotto di ibridazione ottenuto da *S. cerevisiae* e l'antico *S. uvarum* (Nguyen H. et al., 2000); mentre *S. pastorianus* si è generato dalla fusione di *S. cerevisiae* con *S. bayanus* (Casaregola S. et al., 2001). Questi fatti portano a pensare che il gruppo di *S. sensu stricto* debba essere considerato come un continuo di strutture genomiche piuttosto che un gruppo di specie separate (De Barros L. et al., 2002).

S. cerevisiae e *S. paradoxus* hanno capacità di svilupparsi oltre i 37°C, con temperatura ottimale superiore ai 30°C, e di trasportare attivamente il fruttosio. *S. bayanus* var. *uvarum* è un ceppo dotato di caratteristiche peculiari quali la criotolleranza e la produzione di alti quantitativi di glicerolo (Naumov G. et al., 2001), di acido succinico e malico. *S. pastorianus* è una specie rappresentativa dei lieviti freddo-fermentanti isolata dalle birre Lager.

Le tre specie aggiunte recentemente sono *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* (Naumov G. et al., 2000b), la prima isolata in Brasile e le altre in Giappone. Questi lieviti sono simili agli altri per caratteristiche genotipiche e fenotipiche, in particolare la capacità di fermentazione. Nel 2008 Wang e Bail hanno isolato un'altra specie classificata all'interno di questo gruppo, *S. arboricolus*, proveniente dalla corteccia di alcuni alberi appartenenti alla famiglia delle Fagaceae.

1.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

All'interno dei *S. sensu stricto* è sicuramente il più studiato per le sue caratteristiche di vigore fermentativo, di potere alcoligeno, di resistenza agli antisettici e di adattabilità alle più varie condizioni. E' il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato, grazie alla collaborazione fra numerosi laboratori di ricerca (Mewes H. et al., 1997).

Le cellule vegetative possono essere globose o subglobose, ellittiche o cilindriche. All'atto della sporificazione le cellule si trasformano direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 spore.

Il genoma di *S. cerevisiae* conta circa 14 milioni di coppie di basi (bp), distribuite in 16 cromosomi lineari; ciascun cromosoma è una singola molecola di DNA di lunghezza compresa fra le 200 e le 2000 kilobasi. Il genoma ha un contenuto in guanina e citosina del 39-41%, risulta privo di introni e contiene poche sequenze

ripetute. Il sequenziamento completo di tale genoma ha rivelato la presenza di circa 6000 geni, la maggior parte dei quali è presente in singola copia (nel genoma aploide); i geni per l'RNA ribosomale, invece, sono altamente ripetuti (circa 100 copie). Il DNA nucleare contiene anche trasposoni, noti come elementi Ty (Ribéreau-Gayon P. et al., 2004).

Mentre la maggior parte dei ceppi di laboratorio sono aploidi o diploidi, i ceppi ad uso industriale sono principalmente diploidi o aneuploidi e, occasionalmente, poliploidi. Non è ancora chiaro se la poliploidia conferisca un vantaggio effettivo ai ceppi che ne sono portatori (Pretorius I.S. et al., 2000).

I mitocondri di *S. cerevisiae* possiedono un genoma fra i più grandi rispetto ai mitocondri di tutti gli altri organismi. La sequenza nucleotidica del DNA mitocondriale del ceppo FY1679 è stata determinata (Foury F. et al., 1998); il genoma mitocondriale di questo ceppo è una molecola circolare di 85779 bp, avente un contenuto medio in guanina e citosina del 17,1%. In generale, il DNA mitocondriale di *Saccharomyces cerevisiae*, presente in copie multiple all'interno dell'organello è caratterizzato da una bassa densità genica e da un elevato contenuto in AT%. In realtà la composizione nucleotidica del genoma mitocondriale è piuttosto eterogenea: mentre, infatti, il contenuto in guanina e citosina all'interno dei geni è approssimativamente del 30%, le regioni intergeniche sono composte da sequenze quasi ininterrotte dei nucleotidi adenina e timina. Esso codifica per poche ma essenziali componenti mitocondriali. La sua replicazione avviene durante tutto il ciclo cellulare; la DNA polimerasi mitocondriale manca di attività di proofreading, causando un alto tasso di mutazione che determina un'evoluzione estremamente rapida di tale genoma (Foury F. et al., 1998; Pretorius I.S. et al., 2000; Ribéreau-Gayon P. et al., 2004).

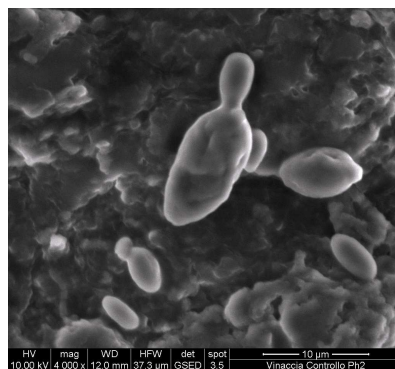


Fig. 1 Immagine al microscopio ESEM di lieviti in un campione di vinaccia.

1.5 I BATTERI

Oltre alla tradizionale microflora di importanza enologica, sono presenti sui frutti varie altre categorie di microrganismi. Per quanto riguarda i batteri vi è un buon grado di diversità che va al di là dei soli lattici ed acetici; non è trascurabile infatti la presenza di microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi molti dei quali Gram negativi, di batteri termotolleranti, di oligotrofi e di coliformi, questi ultimi compatibili con i livelli di una normale contaminazione ambientale.

1.5.1 I batteri acetici

Sono chiamati acetici quei batteri dotati di intenso metabolismo ossidativo che metabolizzano gli zuccheri e l'etanolo per via ossidativa e producono acido acetico. Gli acetobatteri sono batteri Gram negativi, aerobi obbligati e catalasi positivi. Sono diffusi in ambienti contenenti zuccheri, alcool e acidi, come nella birra, nel vino, nell'aceto, nel sidro e nella produzione di cibi fermentati. I batteri acetici appartengono alla famiglia delle *Acetobacteriaceae* che comprende i generi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas* e il recentemente descritto nuovo genere *Asaia* (Bartowsky e Henschke, 2008).

I generi associati all'uva e al vino sono *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*. Le specie più frequenti in ambito enologico appartengono ai generi *Acetobacter* e *Gluconobacter* e in particolare sono: *G.oxydans*, *A. aceti* e *A.pasteurianus* (Bartowsky e Henschke, 2008). Entrambi i generi hanno la capacità di ossidare l'etanolo in acido acetico ma in *Acetobacter* a differenza di quanto avviene in *Gluconobacter* l'ossidazione degli acidi organici acetico e lattico prosegue fino all'ottenimento di anidride carbonica e acqua (Vincenzini *et al.*, 2005).

Nei mosti e nelle uve viene isolato principalmente *Gluconobacter* perché predilige substrati con zuccheri ed è sensibile all'etanolo, mentre nei vini o nei mosti in fermentazione viene prevalentemente isolato *Acetobacter*. Nei vini questi microrganismi sono considerati contaminanti perché la elevata concentrazione di acido acetico che producono comporta gravi alterazioni rendendo sgradevole il vino, difetto noto come acidità volatile. Altre alterazioni dei vini causate da questi microrganismi sono la produzione di acetaldeide e di acetoino (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.5.2 I batteri lattici: il loro possibile ruolo in vinaccia

Come per i lieviti e i batteri acetici, anche i batteri lattici della vinaccia provengono in maggioranza dalla buccia dell'acino e quindi possiamo considerare che la microflora presente sulla bacca (soprattutto *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. casei* e in alcuni casi *O. oeni*) possa essere realisticamente molto simile alla popolazione di batteri lattici delle vinacce. L'unico lavoro a tutt'oggi pubblicato a riguardo di questo argomento è quello di De Pina e Hogg del 1999. E' certamente da prendere in considerazione il ruolo che questi batteri possono avere nell'ambiente vinaccia e la loro importanza per la qualità del distillato che ne deriva.

Se i lieviti sono responsabili della fermentazione alcolica che permette la trasformazione dello zucchero in alcool e i batteri acetici sono responsabili dell'acescenza provocando difetti ben noti, anche l'attività dei batteri lattici è legata ad effetti negativi, perché dal loro metabolismo liberano composti volatili che causano odori sgradevoli, ad esempio i fenoli volatili. Inoltre i batteri lattici con il loro metabolismo dell'azoto possono produrre composti contaminanti dal punto di vista igienico, come le amine biogene. I batteri lattici convertono inoltre gli zuccheri in acido lattico comportando una riduzione del pH e conseguentemente rendono il materiale vegetale meno attaccabile da parte di altri microrganismi potenzialmente contaminanti; alcuni batteri lattici enologici producono infine molecole che inibiscono in modo selettivo lo sviluppo di microrganismi patogeni o contaminanti, ad esempio attraverso il rilascio delle batteriocine: in questo modo questi batteri potrebbero avere un ruolo "protettivo" della vinaccia.

1.6 LE MUFFE

Le muffe sono funghi a portamento filamentoso, più o meno ramificato, i cui filamenti, detti ife, nel loro insieme formano il micelio. La loro riproduzione avviene normalmente per mezzo di spore asessuate liberate, a maturità, nell'aria per originare a loro volta un micelio. Il loro sviluppo è condizionato da diversi fattori:

- Temperatura: quella ottimale è compresa tra i 20 e i 30°C, ma vivono bene anche a temperature prossime agli 0°C.
- pH: preferiscono ambienti acidi, ma possono svilupparsi anche a valori di pH prossimi alla neutralità o superiori (pH 7-8).

- Ossigeno: le muffe sono microrganismi aerobi, necessitano di ossigeno in quantità variabile da specie a specie.
- Esigenze nutrizionali: utilizzano sia molecole semplici sia molecole complesse tra cui zuccheri, acidi, alcoli, sostanze azotate, polifenoli in genere, ecc.
- Resistenza all'alcol: spesso sono sufficienti tre gradi alcolici per inibirne lo sviluppo.

Per quanto riguarda la presenza sull'uva matura di muffe, si tratta in generale di specie dei generi *Mucor*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* (Garoglio P.G., 1980), le quali secondo alcuni studi produrrebbero metaboliti in grado di ritardare la crescita dei lieviti durante la fermentazione. Supportano inoltre la crescita di batteri acetici (Ribéreau-Gayon P., 2000) e sono responsabili della produzione di micotossine sui grappoli, che poi sono trasferite al vino.

La loro diffusione e frequenza sulle uve possono avere riflessi negativi notevoli sulla qualità e composizione chimica dei mosti e della vinaccia destinata alla distillazione.

1.7 SCOPI DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un più ampio progetto, che ha previsto la valutazione dell'effetto di trattamenti tecnologici impiegati all'inizio del periodo di stoccaggio nella vinaccia destinata alla produzione di Grappa.

In particolare sono state condotte due sperimentazioni, utilizzando vinaccia di uva Prosecco raccolta durante la vendemmia 2009 e 2010, presso la Scuola enologica di Conegliano e presso una distilleria della zona, per valutare l'effetto dei trattamenti di (a) acidificazione e (b) inoculo con lieviti opportunamente selezionati del materiale vegetale subito prima della fase di stoccaggio. Lo scopo è stato quello di valutare l'impatto di questi due trattamenti sulla composizione della microflora residente nella vinaccia e sulla componente aromatica del distillato. L'andamento della popolazione di lieviti e batteri è stata monitorata mediante metodi tradizionali (conte su piastra). La caratterizzazione a livello di specie e di ceppo è stata eseguita mediante metodi molecolari. Infine i composti aromatici presenti nel distillato ottenuto in laboratorio dalla vinaccia raccolta al termine del periodo d'insilamento, sono stati determinati mediante analisi gascromatografica.

2. Materiali e metodi

2.1 IL PIANO SPERIMENTALE

2.1.1 Prova di acidificazione

La prima sperimentazione ha previsto l'allestimento di una prova di acidificazione su scala pilota di vinaccia proveniente da uva di Prosecco raccolta durante la vendemmia 2009. L'esperimento ha previsto l'utilizzo di vinaccia di Prosecco pervenuta presso una distilleria situata in località Visnà di Vazzola. La vinaccia è stata suddivisa in 2 cassoni da 3,5-4 ql ciascuno contenenti rispettivamente vinaccia acidificata a pH 2,9 (A) e di controllo tal quale (Nac). L'acidificazione è stata effettuata con acido solforico secondo le modalità normalmente impiegate dalla Distilleria. Per ciascun cassone, sono stati effettuati in triplicato tre campionamenti per le analisi microbiologiche e chimiche, al tempo T0 (all'inizio del periodo di stoccaggio e subito dopo acidificazione), dopo 15 giorni (T15) e al termine dello stoccaggio, dopo 43 giorni (T43) quando la vinaccia è stata distillata in aliquote separate.

2.1.2 Prova di inoculo

La seconda sperimentazione è stata condotta durante la vendemmia 2010 presso la Scuola Enologica di Conegliano (Treviso) ed ha previsto l'inoculo di un ceppo di lievito precedentemente isolato da vinacce di uva Moscato insilata direttamente in cantina, denominato NM12.

Una beuta da 1l contenente 300 ml di mezzo YM è stata inoculata con un'ansata di coltura cresciuta a 30° C per 48 h su una piastra contenente YPD. La beuta è stata sottoposta ad una temperatura di 25°C con agitazione (80-100 oscillazioni al minuto) per 48 h e successivamente il suo contenuto è stato utilizzato per inoculare un fermentatore contenente 2 l di mezzo YM modificato in modo da ottenere una quantità di cellule dopo 48 ore pari a 2×10^8 cell/ml.

La coltura ottenuta è stata diluita in soluzione Ringer (volume finale di 4l) e utilizzata come inoculo. La quantità di lievito è stata calcolata in modo da introdurre nella vinaccia circa 10^6 cell/g.

Come nel caso precedente la vinaccia appena pressata è stata suddivisa in 2 cassoni da 3,5-4 ql ciascuno, uno di controllo tal quale (NI) e l'altro inoculato con

il ceppo scelto (I). Per garantire che la sospensione di lievito fosse distribuita omogeneamente su tutta la massa, il riempimento del cassone è stato graduale. Mentre la vinaccia scendeva dalla tramoggia, l'inoculo precedentemente cresciuto è stato vaporizzato con una spruzzetta di capacità 2 l la massa è stata rimescolata man mano in modo da favorire l'omogeneizzazione della vinaccia.

Per ciascun cassone, sono stati effettuati in triplicato tre campionamenti per le analisi microbiologiche e chimiche, al tempo T0 (all'inizio del periodo di stoccaggio e subito dopo l'inoculo), dopo 15 giorni (T15) e al termine dello stoccaggio, dopo 40 giorni (T40) quando la vinaccia è stata distillata in aliquote separate.

2.2 CEPPI DI LIEVITO

2.2.1 Ceppi isolati da vinaccia

Per i due diversi trattamenti (acidificazione e inoculo), e a ciascun tempo di campionamento sono stati analizzati mediante metodi molecolari un numero di isolati riportato in tabella:

ACIDIFICAZIONE			INOCULO		
Tempo di campionamento	Nac	A	Tempo di campionamento	NI	I
T0	10	10	T0	17	15
T15	10	10	T15	20	18
T43	10	10	T40	20	18

Il ceppo di lievito utilizzato come inoculo, denominato NM12, appartiene alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, ed è stato isolato da vinaccia in precedenti sperimentazioni.

2.2.2 Ceppo commerciale

Ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* FR95 "Blastosel FR95" (Perdomini Spa).

2.3 MEZZI COLTURALI E SOLUZIONI

2.3.1 Mezzi di isolamento

Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar (Green e Gray, 1950)

Sospendere 75 g di WL nutrient medium (Oxoid) in 1 litro di acqua distillata.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

2.3.2 Mezzi di propagazione ordinaria

YPD 20 g (Yeast extract Peptone Dextrose)

Dosi per 1 litro:

10 g	Estratto di lievito (Oxoid)
20 g	Peptone (Difco)
20 g	Glucosio (Prolabo)

YPD agar

Stessa composizione del mezzo precedente con l'aggiunta di 20 g/l di Bacto Agar (Difco).

YM - Yeast and Mould (Wickerham L.J. , 1951)

Dosi per 1 litro:

3 g	Estratto di lievito (Oxoid)
3 g	Estratto di malto (Difco)
5 g	Peptone (Difco)
10 g	Glucosio (Prolabo)

MRS

Sospendere 52 g di MRS Broth (Difco) in 1 litro di acqua distillata e si aggiungono 15 g/l di Bacto Agar.

PCA (Plate Count Agar)

5.0 g	Tryptone (OXOID)
2.5 g	Estratto di lievito (OXOID)
1.0 g	Glucosio (PROLABO)
15.0 g	Bacto Agar (DIFCO)

Si porta a volume con acqua distillata.

Ogni mezzo di coltura è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti.

2.3.3 Soluzioni

PBS (Phosphate buffered saline)

8 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄
0,24 g/l	KH ₂ PO ₄

Aggiustare il pH fino a 7,4 e sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Reattivo di Fehling A

69.278 g/l	CuSO ₄ *5H ₂ O
------------	--------------------------------------

Reattivo di Fehling B

346 g/l	Tartrato sodico potassico (sale di Seignette)
100 g/l	NaOH

Carrez A

15%	K ₄ [Fe(CN) ₆] · 3H ₂ O
-----	---

Carrez B

30%	ZnSO ₄ · H ₂ O
-----	--------------------------------------

SOLUZIONI STANDARD PER GAS-CROMATOGRAFIA (Sigma-Aldrich)

Soluzione A

1 g/l	Metanolo
2 g/l	1-propanolo
2 g/l	1-butanolo
1 g/l	2-metil-2-butanolo
1 g/l	2-butanolo
1 g/l	alcol isoamilico
2 g/l	2-feniletanolo

10 g/l Etil lattato

Portare a volume con acqua distillata.

Soluzione B

10 g/l Etil acetato

2 g/l Isopentil acetato

2 g/l Fenil acetato

2 g/l Etil caproato

2 g/l Etil caprilato

0,2 g/l Linalolo

1 g/l Geraniolo

0,2 g/l β -damascone

0,2 g/l Nerolo

Portare a volume con etanolo assoluto.

Soluzione C

12% Etanolo

Portare a pH 3,3 con NaOH.

2.4 CONTA MICROBICA

Per ciascun tempo di campionamento effettuato presso la Distilleria e presso Scuola Enologica sono stati pesati venti grammi di vinaccia per ciascuna replica, ai quali sono stati aggiunti 200 ml di soluzione PBS. Dopo le opportune diluizioni decimali, per l'isolamento dei lieviti 100 μ l di sospensione sono stati piastrati su terreno WL agar (Oxoid, Milano, Italia) addizionato con 100 μ g/ml di cloramfenicolo (SIGMA) per inibire lo sviluppo di batteri e le piastre incubate a 30°C per 2 giorni. Per l'isolamento dei batteri 100 μ l di sospensione sono stati piastrati sia su mezzo PCA in condizioni aerobiosi, sia su piastre di mezzo MRS utilizzando le apposite giare con ricreate le condizioni di microaerofilia tramite i generatori di CO₂ (Anaerocult, Merck) e incubate a 30°C per 5-7 giorni. I terreni PCA ed MRS sono stati addizionati con cicloesimide alla concentrazione di 300

$\mu\text{g/ml}$ di (SIGMA) per inibire lo sviluppo di lieviti e muffe. Per ciascun campione sono state eseguite tre conte indipendenti.

Per l'isolamento dei lieviti sono state prelevate un numero variabile di colonie, da 10 a 30 per ogni tempo di campionamento, sia per la prova di acidificazione sia per quella di inoculo e ristriciate su terreno di mantenimento YPD. Gli isolati sono stati stoccati in attesa delle analisi molecolari in stab contenuti 1,5 ml di terreno YPD agarizzato e conservati a 4°C.

2.5 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

2.5.1 Preparazione dei campioni per l'amplificazione

Una colonia prelevata da piastra di terreno WL è stata risospesa in 10 μl di acqua sterile e brevemente vortexata. I primer, forniti in forma liofilizzata dalla ditta Eurofins MWG Operon, sono stati sciolti in acqua sterile alla concentrazione di 100 μM , ponendo particolare attenzione alle operazioni di risospensione e centrifugando 5 minuti a 14000 rpm in una microcentrifuga ogni qualvolta sono state prelevate aliquote destinate alle amplificazioni. Le prove di PCR sono state eseguite in volumi di reazione di 25 μl .

2.5.2 Monitoraggio dei ceppi isolati da vinaccia

I vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni:

Primer fw	2 μM
Primer rv	2 μM
dNTPs	0,05 mM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,02 U/ μl
Buffer 10X	1X
Sospensione cellulare	3 μl

I primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

Primer	Lunghezza	Sequenza (5'-3')	Fonte
ITS1	19 bp	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White T.J. <i>et al.</i> , 1990
ITS4	20 bp	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White T.J. <i>et al.</i> , 1990
NL- 1	24 bp	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Kurtzman C.P.e Robnett C.J., 1998
NL- 4	19 bp	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Kurtzman C.P.e Robnett C.J., 1998

La prima coppia è stata utilizzata per amplificare la regione ITS, la seconda per amplificare la regione D1/D2.

Il protocollo termico utilizzato per amplificare la regione ITS è riportato in tabella:

<i>Programma di amplificazione</i>		
Ciclo1 (1X)	95°C	5.30'
Ciclo2 (45X)	95°C	30''
	55,5°C	1'
	72°C	2'
Ciclo3 (1X)	72°C	5'
Ciclo4 (1X)	4°C	∞

Il protocollo termico utilizzato per amplificare la regione D1/D2 è riportato in tabella:

<i>Programma di amplificazione</i>		
Ciclo1 (1X)	95°C	5.30'
Ciclo2 (45X)	94°C	15''
	52°C	30''
	72°C	1'
Ciclo3 (1X)	72°C	5'
Ciclo4 (1X)	4°C	∞

In entrambi i protocolli il primo ciclo a 95°C per 5.30' consente la lisi delle cellule di lievito e quindi il rilascio degli acidi nucleici in soluzione.

2.6 RESTRIZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

Le digestioni sono state eseguite in volumi di reazione di 20 µl contenenti 10 unità di enzima *HinfI* (Amersham Bioscience) e 1,5-2 µg di DNA amplificato. L'incubazione è stata condotta a 37° C per 3 h.

2.7 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE

Per l'estrazione del DNA totale di lievito è stato utilizzato il seguente protocollo.

Il pellet cellulare utilizzato per l'estrazione del DNA totale è stato ottenuto mediante la seguente procedura: la patina ottenuta da una coltura cresciuta in piastra contenente terreno YM solido per 48 ore a 30°, è stata recuperata in una provetta tipo Eppendorf da 2 ml contenente 1 ml di acqua sterile e successivamente centrifugata a 14000 rpm per 3 minuti in una microcentrifuga Eppendorf. Una volta drenato il liquido, le cellule sono state risospese nuovamente in 500 µl di TE (50mM Tris-HCl, 20mM EDTA a pH 7.4) e trasferite in una provetta da 2 ml contenente 0,3 g di palline di vetro (Glass Beads, diametro 425-600 micron, Sigma G-9268). La sospensione è stata agitata con vortex per 3 minuti. Successivamente sono stati aggiunti ai campioni 50 µl di SDS 10%, incubati in bagnetto caldo a 65°C per 30 minuti. Al termine sono stati aggiunti

200 µl di acetato di potassio 5M e si è lasciato in ghiaccio per 30 minuti. Le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 5 minuti e il surnatante trasferito in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 ml. Dopo aver aggiunto 600 µl di isopropanolo freddo i campioni sono stati tenuti a temperatura ambiente per 5 minuti agitando per inversione, e quindi centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti. E' stato eliminato il surnatante e aggiunti 500 µl di etanolo 70%. Dopo centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti, il pellet è stato asciugato per 1 ora a 37°C. I campioni sono stati risospesi in 50 µl di acqua sterile, sono stati aggiunti di 1,5 µl (10 mg/ml) di RNasi (Amersham Bioscience E70194Z) e lasciati a temperatura ambiente per 15-20 minuti. Infine, i campioni sono stati conservati a -20°C.

2.8 RESTRIZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE

Le digestioni sono state eseguite in un volume di reazione di 15 µl contenenti 20 unità dell'enzima *HinfI* (Amersham Bioscience) e 250-300 ng di DNA totale. L'incubazione è stata condotta a 37°C per 16 ore. Successivamente i campioni sono stati conservati a -20°C.

2.9 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO

La separazione di frammenti lineari di DNA è avvenuta mediante elettroforesi su gel di agarosio. La corsa è stata effettuata in un apparato per elettroforesi orizzontale usando TBE (0,5X, 44,5 mM Tris, 44,5 mM acido borico, 1 mM EDTA) come tampone di corsa e applicando una differenza di potenziale variabile tra 90 e 120 V. Le bande sono state visualizzate con colorazione successiva alla corsa utilizzando una soluzione di colorante Gel Red (Biotium, Hayward-USA) allo 0,3% a partire dallo stock 100x.

Sono state utilizzate le seguenti concentrazioni di agarosio:

- 1,5% per visualizzare i frammenti amplificati ottenuti con la coppia di primer ITS1/ITS4, e NL1/NL4,
- 1,8% per separare frammenti di DNA amplificato digeriti con *HinfI*,
- 1% per visualizzare i frammenti ottenuti dalla digestione del DNA totale

Dopo la corsa i gel sono stati osservati al transilluminatore UV e fotografati con il sistema EDAS (Kodak).

2.10 SEQUENZIAMENTO DI DNA

Dopo la quantificazione su gel d'agarosio i prodotti di PCR sono stati opportunamente diluiti e per ciascuno, un'aliquota contenente 20ng di DNA (2X) è stata mescolata con un'aliquota di primer NL-4 contenente 6,4 pmoli (2X) in una microprovetta da 0,2 µl. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad essiccazione e consegnati al Servizio Sequenziamento del CRIBI (Università di Padova).

2.11 PROGRAMMI PER L'ANALISI DEL DNA

Le dimensioni degli amplificati e dei frammenti ottenuti dalla digestione enzimatica sono state determinate con il software EDAS (Kodak).

Per l'analisi delle sequenze nucleotidiche sono stati utilizzati software commerciali della ditta Chromas 2 (Technelysium Pty Ltd) ed utility per l'analisi di similarità di sequenza (BLAST e CLUSTALW), disponibili in rete presso i principali server di biologia molecolare.

2.12 DISTILLAZIONE DEL CAMPIONE DI VINACCIA

La distillazione della vinaccia fermentata è stata effettuata utilizzando un distillatore per vinaccia modello Cazenave-Miconi. Da 100 grammi di vinaccia sono stati ottenuti 40-50 ml di distillato, trasferiti in vials di vetro sigillate e conservate a -20°C per le successive analisi.

2.13 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ZUCCHERI

La determinazione degli zuccheri nei campioni di vinaccia è stata effettuata con il metodo della titolazione di Fehling (De Rosa, Castagner 1994) utilizzando 100 g di vinaccia esausta dopo la distillazione.

2.14 DETERMINAZIONE DELLA GRADAZIONE ALCOLICA

Per la determinazione della gradazione alcolica del distillato è stato utilizzato il kit enzimatico per etanolo (Boehringer Mannheim) secondo le indicazioni del produttore.

2.15 ESTRAZIONE DEI COMPOSTI VOLATILI PRESENTI NEL DISTILLATO

Il metodo utilizzato si basa sull'estrazione liquido-liquido in diclorometano. Venti ml di distillato per ciascun campione sono stati trasferiti in tubi pyrex conici, a cui sono stati aggiunti 8 g di solfato d'ammonio (Prolabo) e 200 µl di tre soluzioni di standard interno: 64 mg/l di 2-octanolo (Sigma-Aldrich). Dopo aver agitato per inversione fino a completa dissoluzione del solfato d'ammonio, sono stati aggiunti 2,5 ml di diclorometano (Prolabo). I tubi sono stati agitati per 30 min a 40 rpm a temperatura ambiente con un agitatore rotante. Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 5 min, la frazione organica, concentrata nella parte inferiore del tubo, è stata raccolta e trasferita in tubi a tenuta da 10 ml. La procedura di estrazione è stata ripetuta per altre due volte agitando il campione per 15 minuti e centrifugando ad ogni passaggio per recuperare la fase organica. Dopo aver raccolto circa 7,5 ml di fase organica di diclorometano la soluzione è stata centrifugata a 2500 rpm per 5 minuti a 4°C per eliminare la fase acquosa. La soluzione è stata anidrificata con 1 g di solfato di sodio anidro (Prolabo). L'estratto è stato trasferito in vials da 2 ml con tappo forabile e conservato a -20°C.

2.16 ANALISI GAS-CROMATOGRAFICHE

Per l'analisi dei composti volatili è stato utilizzato un apparato gas cromatografico del tipo Trace GC2000 Thermo Finnigan equipaggiato con iniettore split-splitless (temperatura 220°C) e rivelatore a ionizzazione di fiamma FID (240°C). La colonna analitica è capillare in silice fusa modello Varian CP WAX 57 CB (lunghezza 50 m x 0,32 mm diametro interno, spessore del film 1,2µm). Il volume iniettato è 2 µl, il gas di trasporto elio con flusso 1,8 ml/min. Il profilo termico è di seguito riportato: 5 min a 35°C, aumento della temperatura fino a 65°C con incremento di 2°C/min, isoterma a 68°C per 2min, da 68°C a 100°C con incremento di 5°C/min, isoterma di 2 min, incremento a 100°C e isoterma di 2 min, aumento della temperatura fino a 200°C a 5°C/min e isoterma di 5 minuti. Da 200 a 250°C con un incremento di 8°C/min e isoterma di 1 minuto. Per la determinazione del picco dell'etilacetato è stato utilizzato il seguente protocollo termico: 1 min a 35°C, aumento della temperatura fino a 75 °C con incrementi di 5-3-2°C/min e isoterma di 2 min, aumento fino a 100°C con un'incremento di 3°C/min . L'identificazione dei composti è stata effettuata sulla base dei tempi di ritenzione di standard esterni. Per il calcolo delle aree dei picchi è stata costruita

una curva di taratura utilizzando diverse concentrazioni (1 a 100, 1 a 200, 1 a 400, 1 a 800, 1 a 1000) delle soluzioni A e B degli standard interni.

3. Risultati

3.1. ALLESTIMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE

3.1.1 Considerazioni preliminari

Il ciclo di produzione della Grappa, uno dei più famosi distillati della tradizione italiana, prevede una prima fase di stoccaggio della vinaccia in distilleria durante la quale vi è lo sviluppo della microflora autoctona che porta alla trasformazione in alcol del residuo zuccherino. Durante questo periodo vengono prodotti inoltre una serie di altri composti di fermentazione che contribuiscono positivamente alla determinazione dell'aroma del distillato, ma anche una serie di sostanze sgradevoli dovute soprattutto ad uno sviluppo incontrollato di microrganismi. Si tratta pertanto di una fase critica, che dev'essere gestita correttamente per garantire una buona qualità del prodotto finito.

Le distillerie dotate di impianti più moderni hanno sviluppato alcuni procedimenti tecnologici con lo scopo di evitare la comparsa di caratteristiche negative del prodotto finale, causati da condizioni di stoccaggio inappropriate. L'acidificazione della vinaccia con aggiunta di solfiti (acido solforico, SO₂) all'inizio dello stoccaggio, rappresenta una pratica comune nelle distillerie, in cui solitamente si osserva un impatto positivo sulla qualità del distillato. La diminuzione del pH a valori prossimi a 3, generalmente sembra determinare le migliori condizioni di stoccaggio in quanto si osserva un rallentamento dello sviluppo batterico, anche dei batteri lattici che sono i più adattati ad ambienti acidi (Zambonelli C., 2001). Si suppone che quest'ultimi, insieme ai batteri acetici, siano i responsabili della produzione di sostanze particolarmente sgradevoli che possono essere concentrate nel prodotto finale tramite la distillazione.

Nonostante questo, sono disponibili pochi dati in letteratura relativi al miglioramento qualitativo dei distillati, che suggeriscono un effetto positivo dovuto alla riduzione di molti odori sgradevoli come etil-lattato, 2-butanolo, n-propanolo che derivano soprattutto da fermentazioni secondarie indesiderate e di composti tossici come il metanolo (Da Porto, 2002; Versini, 1995). Attualmente non sono presenti studi scientifici che spieghino il rapporto tra evoluzione microbica e cambiamenti del profilo aromatico. Lo scopo della prima parte di questa tesi è stato quello di verificare l'eventuale effetto dell'acidificazione sulla popolazione di lieviti, principali responsabili della fermentazione alcolica e dei

batteri, solitamente ritenuti causa della produzione di composti indesiderati e tossici. E' stato inoltre considerato inoltre l'effetto delle dinamiche di popolazione sul profilo dei composti aromatici prodotti al termine dello stoccaggio.

Un'altra pratica altamente diffusa in ambito enologico, ma poco studiata nel settore dei distillati, consiste nell'impiego di lieviti selezionati in grado di riprodursi a scapito delle specie meno alcoligene e di avviare immediatamente la fermentazione. I lieviti secchi attivi, introdotti ad elevate concentrazioni all'inizio del periodo di stoccaggio, possono limitare lo sviluppo di batteri, ad esempio se produttori di SO₂ a concentrazioni inibitorie. I risultati ottenuti in precedenti lavori (Corich et al. 2007), evidenziano come l'impiego di lieviti selezionati nelle vinacce sia giustificato solo qualora lo sviluppo della microflora indigena venga il più possibile limitato, attraverso un contenimento delle operazioni di stoccaggio. In caso contrario le dosi di lievito normalmente impiegate risultano insufficienti per determinare qualsiasi effetto. Nella seconda parte del lavoro è stato valutato l'effetto dell'inoculo di un lievito selezionato nella vinaccia in termini di dominanza del ceppo sulla popolazione di lieviti. L'analisi del profilo aromatico ha consentito una valutazione preliminare di eventuali differenze di concentrazione dei principali prodotti di fermentazione rispetto al distillato ottenuto da vinaccia non trattata.

3.1.2 Piano sperimentale

Per la valutazione del trattamento di acidificazione della vinaccia sull'evoluzione della popolazione microbica e sulla produzione di composti aromatici sono state prese in considerazione vinacce di uva Prosecco raccolta durante la vendemmia 2009 presso una cantina situata nella zona di Conegliano Veneto. Dopo pressatura le vinacce sono state conferite presso una conosciuta Distilleria limitrofa. Utilizzando i metodi solitamente impiegati nell'azienda una parte della vinaccia (4 ql) è stata acidificata con acido solforico fino al raggiungimento del valore 2,9 (A) mentre l'altra è stata conservata come controllo senza subire trattamenti di acidificazione (Nac) con un valore di pH di 3,9.

Le due masse, trattata e non, sono state stoccate in due cassoni contenenti le medesime quantità di vinaccia, sigillati in modo da evitare la presenza di sacche

d'aria e conservati a temperatura ambiente fino al termine del periodo di stoccaggio, pari a 43 giorni.

La seconda sperimentazione, riguardante l'inoculo di un ceppo di lievito selezionato, è stata condotta durante la vendemmia 2010 presso la Scuola Enologica di Conegliano (Treviso). Per la preparazione della coltura del ceppo NM12 (appartenente alla specie *S. cerevisiae*), da utilizzare come inoculo, è stato utilizzato il mezzo YM opportunamente modificato (alta concentrazione di zuccheri), in modo tale da preadattare i microrganismi alle condizioni di crescita della vinaccia in cui la frazione più liquida è ricca di zuccheri. Inoltre i lieviti sono stati cresciuti in fermentatori in modo da favorire l'ossigenazione del mezzo e perciò la sintesi di componenti essenziali quali steroli e grassi insaturi. L'inoculo è stato calcolato in modo da introdurre nella vinaccia circa 10^6 cell/g, garantendo in questo modo che la quantità di lievito aggiunto sia superiore alla popolazione di lieviti indigeni presenti nella vinaccia non ancora fermentata. L'operazione di inoculo, avvenuta direttamente nei locali della cantina della Scuola Enologica (Fig. 3.1.), è stata effettuata mediante vaporizzazione sulle vinacce delle sospensioni acquose contenenti il lievito. Le vinacce provenienti dalla fase di pressatura sono state prelevate e immediatamente inoculate con il lievito selezionato in assenza di anidride solforosa aggiunta. In questo modo è stato possibile controllare lo sviluppo di lieviti indigeni che se presenti a valori elevati possono entrare in competizione numerica con l'inoculo limitandone la dominanza. E' stata inoltre stoccata della vinaccia non inoculata (NI), utilizzata come controllo. Le operazioni di conservazione hanno previsto la suddivisione della matrice vegetale in cassoni da 3,5-4 ql in cui la vinaccia è stata pressata, in modo tale da evitare la formazione di sacche d'aria all'interno che favoriscono lo sviluppo di muffe.



Fig 3.1. Vaporizzazione della sospensione di lieviti sulle vinacce

Il ceppo di lievito inoculato è stato scelto all'interno di un pool più ampio di ceppi, collezionati dal gruppo di Microbiologia del dipartimento di Biotecnologie Agrarie, nel corso di sperimentazioni effettuate durante precedenti vendemmie. I lieviti sono stati isolati durante la fase di stoccaggio da vinacce provenienti da diverse matrici vegetali (uva Moscato o uva Prosecco) o sottoposte a diversi trattamenti tecnologici. Mediante opportune analisi genetiche è stata confermata l'appartenenza di questi ceppi al gruppo *Saccharomyces*. Successivamente ne sono stati presi in considerazione un centinaio in totale, e fatti crescere in mosto sintetico per valutarne le principali caratteristiche tecnologiche, con lo scopo di individuare un possibile candidato da utilizzare come inoculo in vinaccia fresca su scala pilota. Per questo motivo, è stato messo a punto innanzitutto un sistema di screening su scala di laboratorio, per la valutazione delle performance di fermentazione dei lieviti nella vinaccia. Sono state condotte una serie di prove preliminari che hanno previsto l'introduzione, nella vinaccia non fermentata, di una rosa limitata di lieviti, scelti per alcune caratteristiche tecnologiche interessanti, tra i 102 precedentemente analizzati. L'analisi del profilo aromatico del distillato ottenuto al termine della fermentazione di ciascuna vinaccia inoculata, ha rilevato come rispetto alla vinaccia non trattata si verifichi un notevole effetto dei lieviti introdotti, confermato dalla dominanza dei ceppi che si sono mostrati in grado di colonizzare la matrice vegetale. Tra questi è stato possibile individuare un ceppo, identificato come NM12 e proveniente da vinaccia di Moscato insilata direttamente in cantina senza alcun tipo di trattamento, in grado di produrre buone quantità di sostanze apportatrici di aromi (esteri) e basse quantità di composti sgradevoli o indesiderati nel distillato.

3.2. PROVA DI ACIDIFICAZIONE

3.2.1 Evoluzione della popolazione microbica

Con lo scopo di monitorare l'andamento del pH e per la determinazione quantitativa della popolazione di lieviti e batteri, sono stati effettuati tre prelievi della vinaccia, all'inizio dello stoccaggio (T0), dopo 15 giorni (T15), e al termine del periodo di conservazione (T43).

Considerando l'andamento dei valori di pH della vinaccia, come si può osservare nella Fig. 3.2., una volta aggiunto l'acido solforico (T0), il valore del pH

diminuisce fino a 2,9. Dopo 15 (T15) e 43 (T43) giorni, il pH rimane stabile con valori compresi tra 2,75 e 2,89 per l'acidificato, e tra 3,87 a 3,92 per le vinacce non trattate. Pertanto la differenza di pH dovuta all'acidificazione si è mantenuta costante per l'intero periodo di stoccaggio. Si può concludere pertanto che il trattamento di acidificazione è stato condotto in maniera efficiente.

Gli zuccheri, aventi una concentrazione iniziale pari a 4,7g/100g di vinaccia, vengono completamente consumati in 15 giorni sia nella vinaccia acidificata, che in quella non trattata.

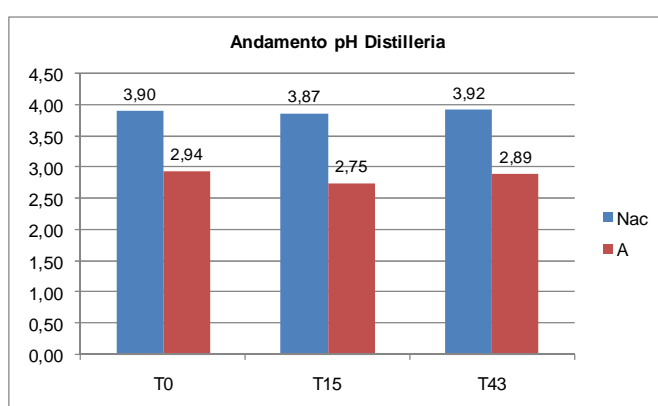


Fig. 3.2. Andamento dei valori di pH nelle vinacce provenienti dalla Distilleria (b), misurati ai diversi tempi di stoccaggio.

Nac: vinaccia non acidificata; A: vinaccia acidificata a pH 2,9.

L'evoluzione della popolazione di microrganismi che si è sviluppata durante il periodo di conservazione della vinaccia è stata analizzata con il metodo tradizionale dell'isolamento su piastra. Ad ogni prelievo, effettuato separatamente da ciascun cassone ai tempi T0, T15 e al termine dello stoccaggio, si è proceduto all'isolamento dei lieviti su terreno WL addizionato di cloramfenicolo. La popolazione batterica è stata isolata su due tipologie di mezzi e a due condizioni di crescita. Il terreno Plate Count Agar (PCA), che generalmente viene utilizzato per la determinazione della microflora totale, è stato impiegato per consentire lo sviluppo della maggior parte dei batteri della vinaccia in presenza di ossigeno. E' stato inoltre utilizzato terreno MRS (in condizioni di microaerofilia) selettivo per i batteri lattici, in quanto da sperimentazioni precedenti su vinaccia si è visto che

nei primi giorni di fermentazione la popolazione batterica è quasi completamente dominata da batteri lattici.

La Fig. 3.3, mostra separatamente le dinamiche della popolazione di lieviti e batteri durante lo stoccaggio della vinaccia. Le popolazioni dei lieviti nelle vinacce acidificate e di controllo non mostrano differenze significative al T0, con un numero di cellule pari a circa 1.7×10^6 ufc/g.

Questo risultato si discosta leggermente da quanto riscontrato in altri lavori sulla microflora della vinaccia (Bovo et al., 2009) dove la popolazione di lieviti si aggira intorno a 10^5 ufc/g all'inizio dell'insilamento. Una possibile spiegazione di questa differenza, potrebbe derivare dal fatto che la vinaccia conferita alla Distilleria ha trascorso almeno un'ora nei cassoni del camion durante il trasporto. In questa fase la microflora presente nella vinaccia appena pressata ha sicuramente iniziato a svilupparsi consumando gli zuccheri fermentescibili. Infatti, la determinazione degli zuccheri residui al T0, rivela che gli zuccheri ancora disponibili sono presenti in quantità minori rispetto a quanto riscontrato in letteratura. Al termine del periodo di stoccaggio la popolazione di lieviti aumenta fino a $5,1 \times 10^7$ ufc/g nelle vinacce acidificate, mentre nei campioni non trattati raggiunge circa $3,3 \times 10^6$ ufc/g (T43), dopo un primo decremento al T15, mostrando una differenza significativa di almeno 1 log tra le vinacce non trattate e le acidificate. Considerando le conte batteriche (Fig. 3.3b), al T0 non si osservano differenze significative tra i campioni di vinacce sia su terreno PCA sia su MRS, con un valore simile a quello trovato per la popolazione dei lieviti. Dopo 15 giorni la popolazione batterica mostra differenze significative tra i due campioni dal momento che la concentrazione (in entrambe le condizioni di crescita) è più elevata di 1 log nella vinaccia non trattata.

Al termine dello stoccaggio (T43) i batteri si stabilizzano a valori di $3,5 \times 10^7$ ufc/g in entrambe le condizioni, mostrando differenze non significative.

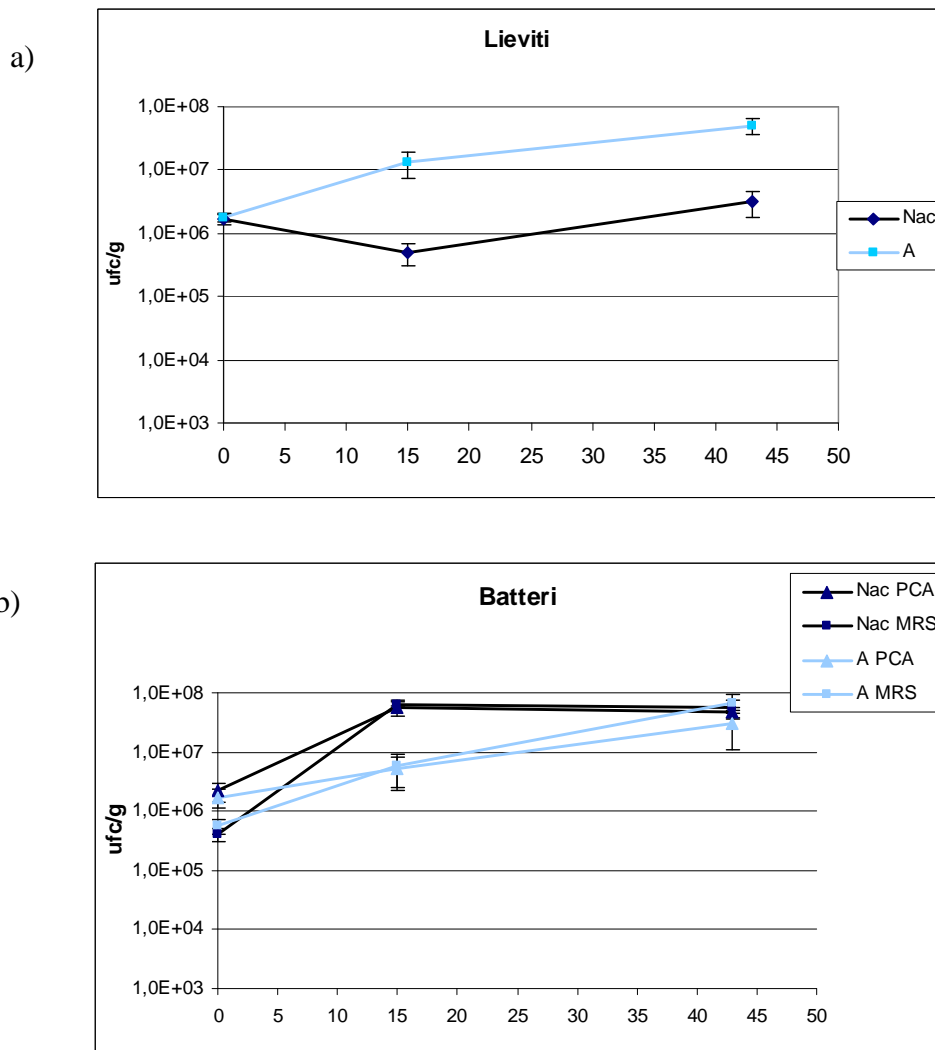


Fig 3.3. Evoluzione della popolazione di lieviti (a) e batteri (b) nella vinaccia proveniente dalla Distilleria durante il periodo di stoccaggio.

Nac: vinaccia non acidificata. A: vinaccia acidificata a pH 2,9. PCA: isolamento in condizioni di aerobiosi. MRS: isolamento in condizioni di microaerofilia.

Oltre ad un'analisi di tipo quantitativo sulla microflora di lieviti e batteri presenti nella vinaccia, su una parte dei lieviti isolati sono state effettuate delle analisi di tipo qualitativo con lo scopo di identificare le specie. Tra i sistemi di identificazione proposti in letteratura particolarmente interessante risulta una metodica che prende in considerazione le informazioni ricavate analizzando la regione di DNA codificante l'RNA ribosomale (Fig. 3.4).

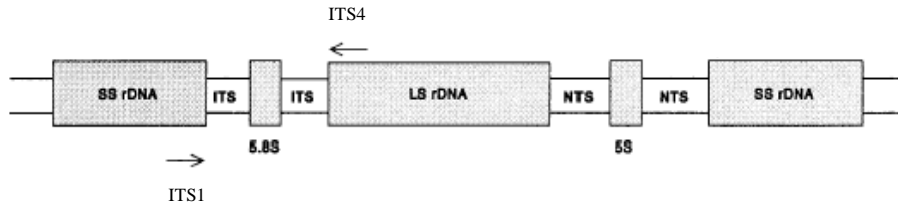


Fig 3.4 Regione di DNA codificante l'RNA ribosomiale, modificata da Baleiras Couto M. M. *et al* (1996).

In *S.cerevisiae* questa zona è presente nel cromosoma XII, ripetuta in un centinaio di copie poste in tandem, (Johnston M. et al., 1997), e viene trascritta in un unico tratto di dimensioni 35S. E' suddivisa in 3 unità principali codificanti le molecole di RNA che vanno a costituire le seguenti subunità del ribosoma: 25S (subunità grande, LS), 18S (subunità piccola, SS), e 5,8S. Compreso tra le regioni SS rDNA e LS rDNA si trova un tratto, codificante l'rRNA della subunità 5,8S e contenente le due zone fiancheggianti denominate ITS (Internal Transcribed Spacer), particolarmente interessante perché mostra un polimorfismo di sequenza molto più elevato di quello associato ai geni codificanti l'rRNA delle subunità 18 e 25S (Cai J. et al., 1996; Kurtzman C.P., 1993). Questa variabilità è estremamente alta, se si considerano organismi appartenenti a specie diverse, mentre scende drasticamente quando si considerano ceppi della stessa specie. Questo polimorfismo intra-specifico può essere messo in evidenza mediante amplificazione della regione ITS e successiva analisi del profilo di restrizione utilizzando enzimi opportuni (Esteve-Zarzoso B. et al., 1999). In particolare per questa determinazione è stato scelto l'enzima *HinfI*, una tra le endonucleasi di restrizione più utilizzate per l'identificazione di specie di lievito in ambito enologico.

Un totale di 60 colonie di lieviti, equamente distribuite per tipo di vinaccia e per tempo di campionamento sono state prelevate casualmente dalla piastra di WL, ed esaminate mediante analisi RFLP della regione ITS. Sono stati ottenuti una serie di profili di restrizione che hanno consentito di suddividere gli isolati identificati in gruppi. Per definire la specie microbica si è proceduto al sequenziamento del DNA di un campione per ciascun gruppo ITS. E' stato sequenziato il tratto iniziale (regione D1/D2) della zona codificante la subunità 25S dell'RNA ribosomiale. Studi approfonditi di allineamento genico (Kurtzman C.P. e Robnett C.J., 1998) hanno permesso di stabilire che questa regione è caratterizzata da

un'elevata variabilità inter-specifica che la rende un ottimo strumento per l'identificazione di specie microbiche. Le sequenze ottenute dai rappresentanti di ciascun gruppo ITS (6 in totale) sono state sottoposte ad analisi BLAST considerando tutte le sequenze presenti nella GenBank e i risultati sono riportati in Tab. 3.1. Il gruppo microbico è stato identificato con il nome della specie la cui sequenza D1/D2 ha ottenuto il punteggio di similarità più elevato (98%). In questo modo è stato sempre possibile attribuire al gruppo ITS la corrispondente specie microbica.

Hanseniaspora uvarum, che si trova comunemente nel vigneto (Ribereau-Gayon et al., 2007), risulta la più rappresentata delle specie di lieviti, nelle vinacce trattate e non trattate, all'inizio dello stoccaggio. Dopo 15 giorni, 4 specie sono presenti nella vinaccia non acidificata (*Torulasporea delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Issatchenkia occidentalis*), con una dominanza del 60% di *S. cerevisiae*. Allo stesso tempo di campionamento, nella vinaccia acidificata è presente anche *Pichia galeiformis*, mentre *Issatchenkia occidentalis* (il cui genere è filogeneticamente correlato a *Pichia*) è la specie dominante al 50%. Questi risultati concordano con dati di letteratura, nei quali *I. occidentalis* è stata isolata nelle fasi finali di fermentazione di succhi a basso contenuto alcolico (uva e ananas, Chanprasartsuk et al., 2010) e si è scoperto essere presente nelle anche in vigneto (Sabate et al., 2002).

Alla fine dello stoccaggio al T43 *Pichia galeiformis* è il lievito più presente sia nella vinaccia non trattata, che in quella trattata, con un range compreso tra 50 e 70%.

Specie	T0		T15		T43	
	Nac	A	Nac	A	Nac	A
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	90%	80%	—	—	—	—
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	10%	20%	10%	10%	10%	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	60%	10%	—	10%
<i>Candida humilis</i>	—	—	20%	20%	—	—
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	—	—	10%	50%	20%	40%
<i>Pichia galeiformis</i>	—	—	—	10%	70%	50%

Tab. 3.1 Distribuzione delle specie di lievito isolate dalla vinaccia, acidificata e non, a diversi tempi di campionamento.

Si può concludere, per quanto riguarda l'evoluzione della popolazione microbica, che lieviti e batteri sono stati influenzati in maniera diversa dal trattamento. L'acidificazione è stata efficace nel mantenere basse le conte di batteri aerobi e microaerofili per i primi 15 giorni, quando la fermentazione è in corso. Al contrario, la popolazione dei lieviti risulta più elevata nella vinaccia acidificata rispetto a quella non acidificata durante tutto il periodo di stoccaggio, suggerendo una competizione per i nutrienti tra le due popolazioni, che ha favorito lo sviluppo di quella batterica a pH più elevati (Ribereau-Gayon et al., 2007).

Anche i dati relativi alla successione delle specie mostrano delle differenze tra i due tipi di trattamento. Dati pubblicati recentemente (Bovo et al., 2009), mostrano che durante la fermentazione spontanea della vinaccia si susseguono varie specie di lieviti con un progressivo aumento della concentrazione di *S. cerevisiae*, che diventano dominanti durante i primi 15 giorni. Anche in questa prova si osserva una dominanza del 60% di *S. cerevisiae* nella vinaccia non trattata al T15, situazione che non si verifica però nella vinaccia acidificata, suggerendo che in questo ambiente vengono favorite specie non-*Saccharomyces* o che le specie di *Saccharomyces*, presenti durante i primi giorni di fermentazione sono state rimpiazzate dalle non-*Saccharomyces* negli ultimi giorni.

3.2.2 Valutazione della produzione di composti aromatici al termine del periodo di stoccaggio

Considerazioni generali

I campioni di vinaccia raccolti al termine del periodo d'insilamento, per la vinaccia trattata e di controllo, sono stati sottoposti singolarmente a distillazione con lo scopo di separare le sostanze volatili dalla massa semisolida. A questo scopo è stata utilizzata un'apparecchiatura del tipo Cazenave – Miconi (Fig 3.5.), il cui funzionamento si basa sull'insufflazione di corrente di vapore nella vinaccia, consentendo di raccogliere i composti che si sono liberati in uscita (De Rosa, Castagner, 1994). In tutti i casi è stato raccolto un volume di distillato pari a 40-50 ml, una quantità sufficiente per consentire le successive procedure di estrazione e per evitare un'eccessiva diluizione dei composti nella soluzione causata dal prolungamento del processo di distillazione. Il distillato in tutte le prove era caratterizzato mediamente da una quantità in alcol compresa tra 7 e 10%.



Fig. 3.5. Apparecchiatura per distillazione in corrente di vapore di tipo Cazenave-Miconi

L'analisi delle molecole presenti nel prodotto di distillazione ottenuto è stata condotta mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Questo approccio è in grado di garantire accuratezza, velocità e flessibilità nell'analisi di un gran numero di composti. Prima di procedere con la separazione gascromatografica è stato necessario effettuare alcune operazioni preliminari, in quanto il distillato ottenuto, avente caratteristiche più simili a quelle di una flemma, possedeva un basso titolo in alcol e di conseguenza un quantitativo di acqua troppo elevato affinché il campione potesse essere direttamente analizzato mediante gascromatografia. È stata scelta una procedura adattata da protocolli presenti in letteratura, riguardanti l'analisi gascromatografica dei composti contenuti nel vino. Ortega e collaboratori (2001) hanno messo a punto un metodo di estrazione delle sostanze di interesse presenti nel vino tramite scioglimento in solvente organico. Data l'elevata eterogeneità dei composti aromatici (alcoli superiori, esteri, terpenoli, e norisoprenoidi) analizzati non esiste un unico solvente in grado di ottenere una resa di estrazione ottimale per tutte le classi di molecole. La metodica utilizzata risulta un buon compromesso tra la capacità di estrazione dei solventi organici e il gran numero di composti presenti nel vino o distillato che bene si adatta alle esigenze di questa sperimentazione. Il solvente organico utilizzato è il diclorometano, che ha dimostrato un'ottima resa di estrazione per i composti da noi considerati più rappresentativi del prodotto di distillazione. Lo si è quindi impiegato come solvente per effettuare un'estrazione a partire da due soluzioni standard appositamente preparate contenenti un mix delle molecole di interesse in grado di simulare la miscela idroalcolica delle flemme ottenute. Una soluzione conteneva i composti solubili in etanolo, l'altra quelli più idrofilici. A partire da queste sono state preparate diverse diluizioni

(1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000), a loro volta estratte in diclorometano, con lo scopo di costruire una retta di taratura per ogni composto presente. In questo modo, infatti, è possibile correlare il picco del segnale rivelato dal FID, alla concentrazione della sostanza nota introdotta nella soluzione. Inoltre, l'utilizzo di uno standard interno, nel nostro caso il 2-octanolo precedentemente introdotto in concentrazione nota, ha consentito di normalizzare i valori dei picchi dei composti presenti nelle soluzioni. Infatti nell'eventualità in cui la procedura di estrazione non consenta di portare completamente i composti in soluzione, il software di calcolo è sempre in grado di correlare il segnale ottenuto dallo standard interno rispetto alla concentrazione effettiva, evitando quindi una sottostima del dato.

La concentrazione delle molecole aromatiche scelte è stata determinata tramite gascromatografia espressa in mg/l o µg/l di distillato. In particolare sono state determinate le concentrazioni dei principali aromi di fermentazione (alcoli superiori ed esteri) e alcuni composti varietali particolarmente interessanti perché caratteristici del prodotto finito, la Grappa (beta-damascone, geraniolo, nerolo, linalolo). Gli alcoli superiori, molecole che possiedono più di due atomi di carbonio, sono prodotti principalmente dalle vie cataboliche di degradazione degli aminoacidi. Nella via di reazione proposta da Ehrlich l'aminoacido viene deaminato ad alfa-chetoacido che poi viene decarbossilato ad aldeide ridotta a sua volta al corrispondente alcol dall'alcol deidrogenasi (Ribereaux-Gayon 1998). Il risultato finale porta alla produzione da un amminoacido con n atomi di carbonio di un alcol con $n-1$ atomi di carbonio. I lieviti buoni fermentatori sono anche alti produttori di alcoli superiori mentre i lieviti di vigneto quali *Hanseniaspora uvarum* non lo sono. Condizioni di pH elevati, superiori a 4, alte temperature e carenza di ammonio e aminoacidi (condizioni tutte che si verificano generalmente nell'ambiente vinaccia) ne favoriscono la sintesi. I principali alcoli superiori che si trovano nelle vinacce sono: 1-propanolo (n-propanolo), 2-propanolo, 2-metil-1-propanolo (isobutanolo), 3-metil-1-butanolo (isoamilico inattivo), 2-metil-1-butanolo (isoamilico attivo), 2-feniletanolo (β -feniletanolo).

A causa della loro volatilità si ritrovano anche nei distillati a cui apportano caratteri particolari. In generale la loro presenza è associata ad odori pungenti ad eccezione del β -feniletanolo che odora di rosa. In questa tesi sono stati determinati i seguenti alcoli superiori: 1-propanolo, isobutanolo, alcol isoamilico inattivo, 2-feniletanolo.

Una categoria estremamente interessante di molecole prodotte dal metabolismo dei lieviti con una forte valenza aromatica è costituita dagli esteri. In relazione alle modalità di sintesi possono essere divisi in due categorie, gli esteri acetici dell'etanolo e degli alcoli superiori e gli esteri etilici degli acidi grassi.

Gli esteri presenti nelle grappe si possono distinguere, ai fini organolettici in tre gruppi. Il primo comprende gli esteri più volatili tra i quali i principali esteri acetici di etanolo di cui l'acetato di etile, con il caratteristico odore di aceto, è il più importante. Nelle grappe se non supera i 150-250 mg su 100 ml di alcol anidro può essere utile a compensare ed equilibrare gli odori troppo intensi di altri esteri. Il secondo gruppo è costituito dall'acetato di isoamile, isobutile e di esile (non prodotto dai lieviti) nonché dagli esteri di acidi grassi con catena di lunghezza compresa tra 4 (butirrico) e 8 (caprilico) atomi di carbonio che hanno nota fruttata (banana, pera, albicocca) (Nykänen, 1986) e dagli esteri etilici degli acidi grassi a 10 (caprico) e 12 (laurico) atomi di carbonio. Il terzo gruppo comprende gli esteri degli acidi grassi a peso molecolare elevato (dai tetradecanoici agli ottadecanoici) a sensazione oleosa, rancida e sgradevole (Versini e Margheri, 1979). In questa sperimentazione sono state determinate le concentrazioni dei principali esteri prodotti dai lieviti ovvero etilacetato, isopentilacetato, fenilacetato, etilcaproato ed etilcaprilato.

Sono stati presi inoltre in considerazione alcuni dei composti aromatici varietali dell'uva che sono stati rilevati nella varietà Prosecco (Calò, 2000) scelti all'interno di due (norisoprenoidi e terpeni) delle tre categorie principali. Nella classe dei norisoprenoidi, composti derivati dalla trasformazione dei carotenoidi, (molecole di cui la buccia è particolarmente ricca) è stato scelto il beta-damascone. La classe dei terpeni è, forse, quella più interessante e più studiata all'interno degli aromi varietali. Costituiscono una grande famiglia di composti (circa 4000), di cui odorosi sono i monoterpeni (composti a 10 atomi di carbonio) e i sesquiterpeni (composti a 15 atomi di carbonio), formati rispettivamente a partire da due e tre unità isopreniche. Nell'uva sono stati trovati soprattutto composti terpenici mono, di e triidrossilati (Williams et al. 1980). All'interno della classe dei terpeni sono stati scelti quelli che principalmente si trovano nell'uva Prosecco (linalolo, geraniolo, nerolo). Queste molecole, nelle condizioni di separazione scelte formano il picco corrispondente in una zona in cui il rumore

di fondo è piuttosto elevato ed essendo la loro concentrazione decisamente bassa la determinazione non è stata particolarmente precisa.

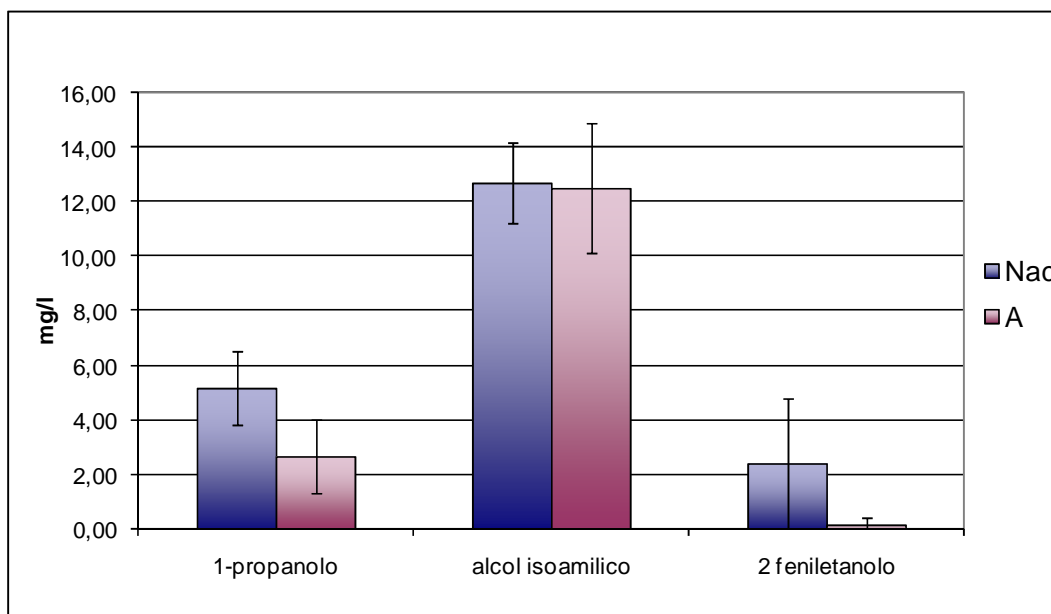
E' stata inoltre determinata la concentrazione di metanolo. Questo composto, pur non avendo nessuna importanza dal punto di vista aromatico, è estremamente rilevante in quanto è caratterizzato da una tossicità elevata per l'uomo e tende a concentrarsi nel distillato. Infine per valutare l'attività della microflora batterica è stato determinato l'andamento del 2-butanolo e del lattato di etile, il principale estere prodotto dai batteri lattici.

Produzione di composti aromatici

Le concentrazioni dei principali alcoli determinati in entrambi i tipi di vinaccia (acidificato e non acidificato) sono riportati nella Fig 3.6.

Per quanto riguarda 2-metil-2 butanolo, 2-butanolo, 1-butanolo e 1-propanolo, il distillato ottenuto dalla vinaccia non trattata mostra livelli significativamente elevati rispetto a quella acidificata. La concentrazione del metanolo, importante per il suo effetto sulla salute umana, non è significativamente diversa nei due distillati (1,7 e 2,6 mg/l).

a)



b)

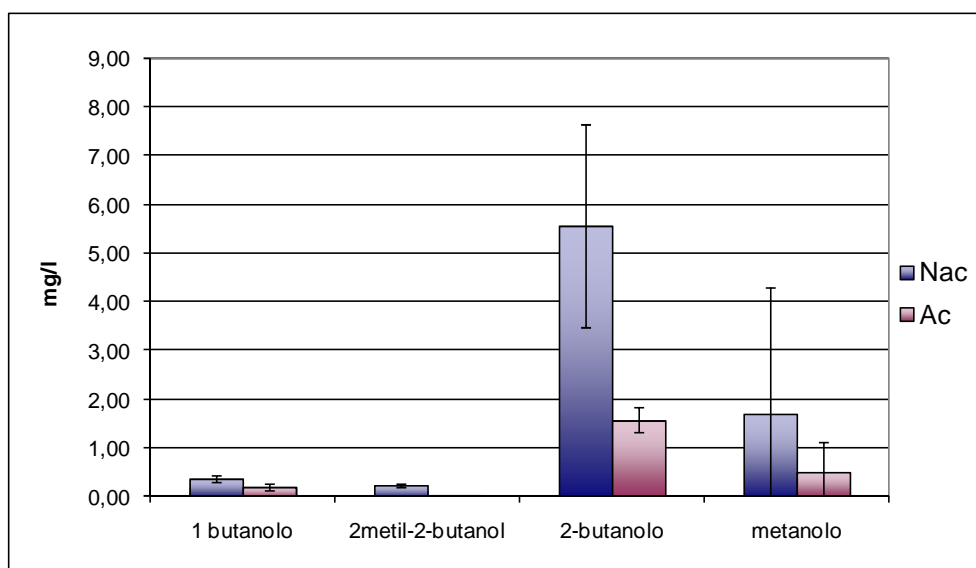


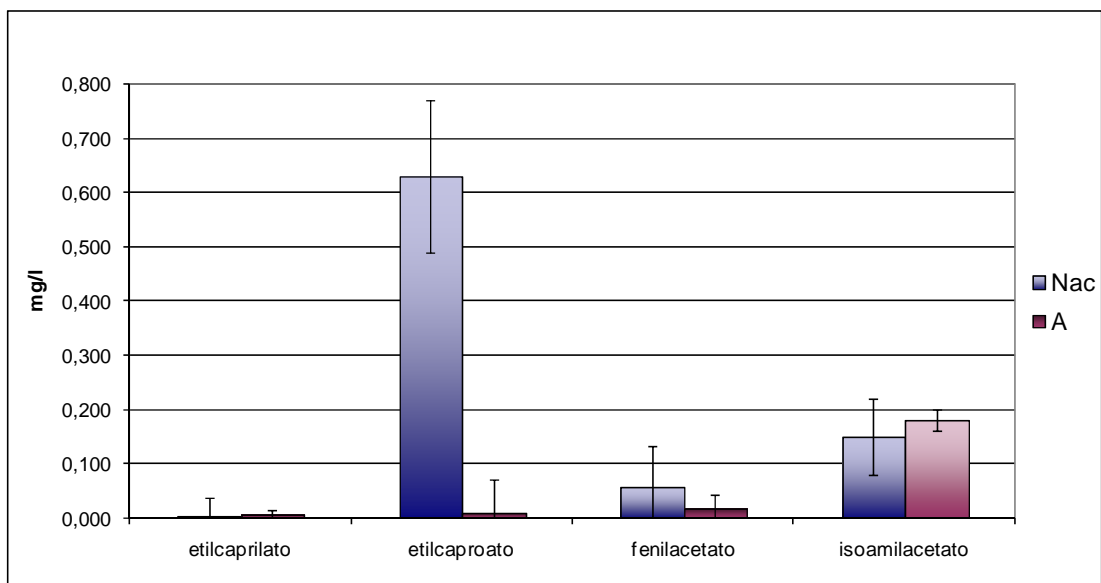
Fig 3.6 (a) e (b). Concentrazioni dei principali alcoli superiori, espressi in mg/l, determinati nel distillato ottenuto dalla vinaccia acidificata (A) e di controllo (Nac) a fine stoccaggio.

Inoltre è stata valutata la concentrazione dei principali esteri di origine microbica (Fig 3.7 a e b). Etilacetato (odore di solvente), etilattato (dall'aroma di burro) ed esteri degli acidi grassi a media catena, come l'etil-caproato e l'etil-caprilato (aroma fruttato), aventi una soglia olfattiva di 0,24 mg/l (in una soluzione al 10% di etanolo ed acqua, Soles et al.,1982), mostrano una concentrazione significativamente più bassa nella vinaccia acidificata.

In particolare, l'etilacetato, uno degli esteri più importanti a causa del suo odore sgradevole, è presente nel distillato ottenuto da vinaccia trattata ad una concentrazione inferiore a 0,9 mg/l, la soglia di percezione alla quale questo estere conferisce difetti all'aroma. Il contenuto di isoamil-acetato e di fenil-acetato non è molto diverso nei due tipi di vinaccia, così come dei loro precursori, alcol isoamilico e 2-feniletanolo.

Sono stati considerati inoltre alcuni composti varietali, linalolo, nerolo e geraniolo, molecole presenti a concentrazioni molto basse e nessuna significativamente diversa tra la due tipologie di vinacce, eccetto il geraniolo che raggiunge i 46.4 µg/l nel controllo e 7.2 µg/l nelle vinacce acidificate (Fig. 3.8).

a)



b)

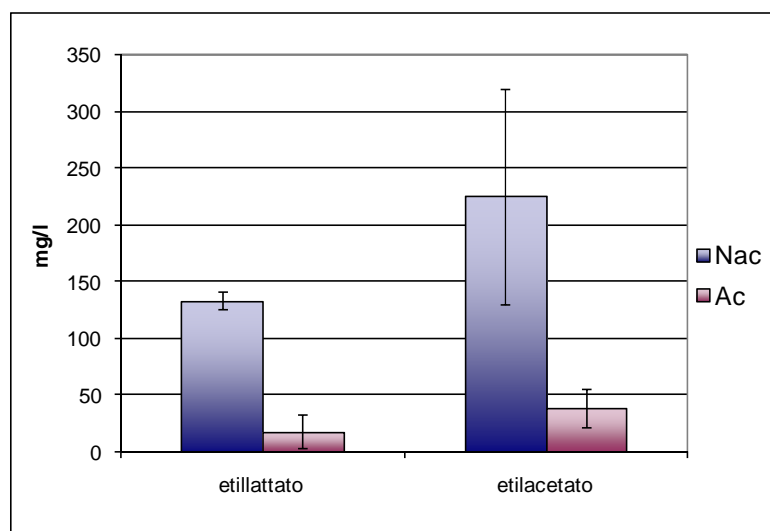


Fig 3.7. Concentrazioni dei principali esteri (a) e (b), espressi in mg/l, determinati nel distillato ottenuto dalla vinaccia acidificata (A) e di controllo (Nac) a fine stoccaggio a fine stoccaggio.

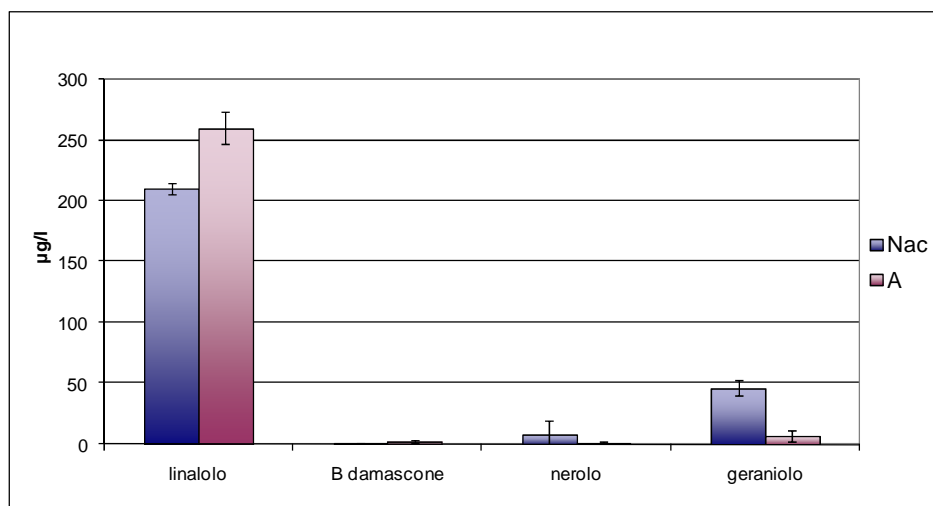


Fig 3.8. Concentrazioni dei principali terpeni, espressi in $\mu\text{g/l}$, determinati nel distillato ottenuto dalla vinaccia acidificata (A) e di controllo (Nac) a fine stoccaggio.

Le concentrazioni di molti composti aromatici, che differiscono significativamente a seconda delle condizioni di stoccaggio, suggeriscono un effetto generale del trattamento di acidificazione nel profilo aromatico del distillato. Per quanto riguarda gli alcoli superiori, è stata riscontrata una generale diminuzione nella vinaccia trattata, fattore che conferisce un aumento della qualità del distillato, migliorata inoltre per effetto della diminuzione (di quasi 6 volte) del contenuto di etilacetato. Inoltre, l'abbassamento del pH ha consentito di controllare gli aromi sgradevoli apportati da 2-butanolo ed etil-lattato. Il contenuto di questi due composti (solitamente attribuiti al metabolismo batterico, Pozo-Bayon et al., 2005) è stato per la prima volta correlato al controllo della proliferazione della popolazione batterica, uno degli effetti più rilevanti del trattamento di acidificazione. In particolare, l'etil-lattato, determinato nella vinaccia fermentata naturalmente, è presente ad una concentrazione dieci volte più elevata che nella vinaccia non trattata.

Da studi di letteratura è noto che la concentrazione di alcuni composti può dipendere dalle specie di lieviti presenti (Viana et al., 2008), ma può anche variare tra ceppi all'interno di una specie (Romano et al., 2003). Alcuni autori attribuiscono un ruolo principale nella determinazione dell'aroma del vino al metabolismo di lieviti buoni fermentatori, come *S. cerevisiae* (Ribereau-Gayon et al., 2007), che generalmente producono un elevato livello di alcoli secondari. Un ruolo significativo è talvolta riconosciuto ai lieviti enologici non-*Saccharomyces*

(inclusi i generi di *Hanseniaspora*, *Pichia* ed *Issatchenkia*, Clemente-Jimenez et al., 2004), noti come buoni produttori di esteri, comunemente associati ad effetti negativi per l'elevato contenuto di etil-acetato prodotto.

Pertanto non è stato semplice correlare ai generi o alle specie di lieviti identificate la concentrazione degli aromi, che potrebbero essere addirittura associati alla dominanza di diversi ceppi, selezionati dall'abbassamento del pH. Infatti è già stato riscontrato nelle vinacce un elevato livello biodiversità intraspecifica sia per i *Saccharomyces* che per i non-*Saccharomyces* (Bovo et al., 2009). I dati riportati in questa tesi suggeriscono inoltre che l'acidificazione potrebbe aver causato cambiamenti di tipo metabolico nelle cellule di lievito, influenzando la produzione di alcoli ed esteri.

3.3. PROVA DI INOCULO

3.3.1 Evoluzione della popolazione microbica

Durante lo stoccaggio della vinaccia sottoposta ad inoculo con un ceppo scelto, sono stati effettuati tre prelievi per la determinazione quantitativa della popolazione di lieviti e batteri, all'inizio dello stoccaggio (T0), dopo 15 giorni (T15), e al termine del periodo di conservazione (T40).

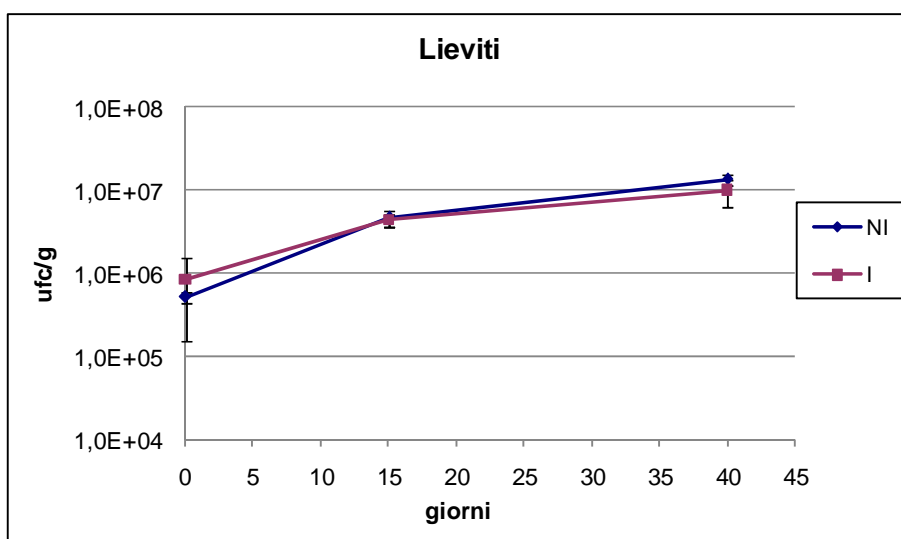
Come nel caso del trattamento di acidificazione precedentemente descritto, l'evoluzione della microflora è stata analizzata con il metodo tradizionale dell'isolamento su piastra considerando il terreno WL per i lieviti e i terreni PCA (in presenza di ossigeno) ed MRS (in condizioni di microaerofilia) per i batteri.

La Fig. 3.9 mostra separatamente le dinamiche della popolazione di lieviti e batteri durante lo stoccaggio della vinaccia. La popolazione di lieviti in entrambe le vinacce, inoculate e di controllo, segue un andamento simile durante i 40 giorni di insilamento. La popolazione iniziale di lieviti presenti al momento dello stoccaggio è di circa 5×10^5 ufc/g, mentre quella rilevata nella vinaccia inocolata è di 8×10^5 ufc/g, valore leggermente più basso rispetto a quello calcolato per l'inoculo, pari a 10^6 ufc/g. Questo è probabilmente dovuto alla difficoltà di omogenizzare in modo ottimale la vinaccia, il cui rimescolamento è stato eseguito manualmente mentre la massa che scendeva dalla tramoggia veniva vaporizzata con la sospensione di lievito. Dopo 15 giorni di stoccaggio, quando è noto da studi precedenti che la fermentazione degli zuccheri è ormai conclusa, si osserva un incremento di quasi un logaritmo della popolazione di lieviti, che si attesta dopo

40 giorni a valori di circa 10^7 ufc/g. La dinamica nel corso dello stoccaggio pertanto, è del tutto simile a quello rilevato in precedenti sperimentazioni.

Per quanto riguarda l'evoluzione della popolazione batterica l'andamento non è così chiaro come nel caso dei lieviti. In particolare, al tempo T0 si osserva una notevole differenza, di ben 2 logaritmi, tra le conte determinate su terreno MRS e quelle determinate su PCA. Una spiegazione al valore decisamente elevato (10^7 ufc/g) rilevato in quest'ultimo caso, potrebbe essere ricercata nel fatto che le conte su terreno PCA, utilizzato per determinare la carica batterica totale, sono state alterate dalla presenza nella vinaccia di *Bacillus thuringiensis*. Questo microrganismo è stato utilizzato in vigneto come antiparassitario, pertanto è probabile che sia rimasto in concentrazioni elevate anche nella vinaccia. La crescita delle colonie di *Bacillus* su terreno PCA è caratterizzata dalla formazione di un alone spesso diffuso su tutta la piastra di isolamento, pertanto le diluzioni seriali sono risultate poco chiare. Dopo 15 giorni si osserva in generale un aumento della popolazione, tranne nel caso dei batteri determinati su terreno PCA nella vinaccia inoculata, che subiscono un calo fino ad un valore di 3×10^6 ufc/g. Anche questo dato potrebbe essere imputato alla difficoltà di determinare in modo chiaro le conte su piastra. Al termine dello stoccaggio la situazione è molto più definita, si osserva una differenza significativa tra le due tipologie di vinacce, in quella di controllo i batteri si attestano attorno ad un valore di 10^7 ufc/g, mentre in quella inoculata il valore è più basso 5×10^6 ufc/g.

a)



b)

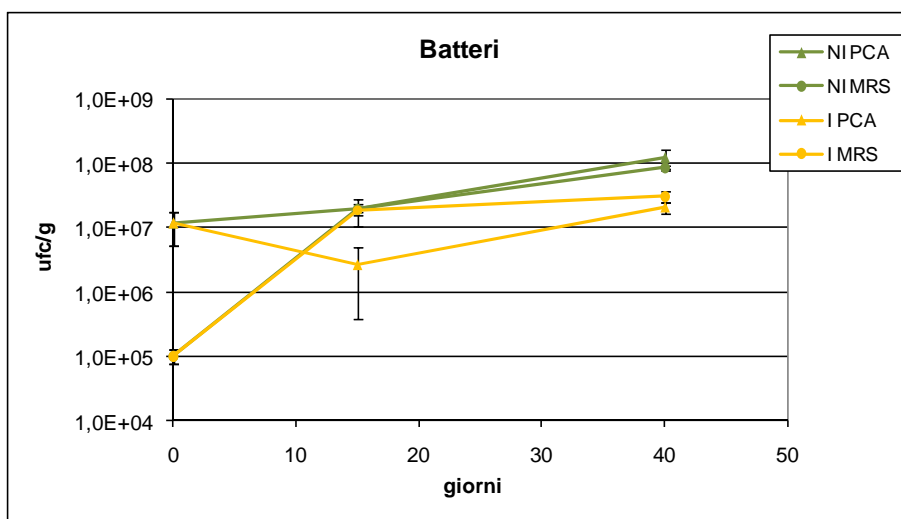


Fig. 3.9. Evoluzione della popolazione dei lieviti (a) e dei batteri (b) durante il periodo di stoccaggio della vinaccia di controllo (NI) e inocolata (I).

Con lo scopo di verificare la presenza del ceppo NM12 nelle vinacce inoculate durante il periodo di stoccaggio, un numero di colonie (compreso tra 15 e 18) di lieviti isolati casualmente su piastre di terreno WL, è stato sottoposto ad un'analisi molecolare in grado di determinare una caratterizzazione ceppo specifica degli isolati. E' stato scelto un metodo presente in letteratura da diversi anni (Querol A. et al., 1996) che prevede l'analisi di profili elettroforetici mediante digestione enzimatica del DNA totale. Questa tecnica sfrutta la diversa composizione in guanina e citosina del DNA mitocondriale (17% circa) di *S. cerevisiae* rispetto al DNA nucleare (39-41%), e la maggiore velocità di mutazione del DNA

mitocondriale rispetto a quello nucleare. Utilizzando enzimi di restrizione che riconoscono siti ricchi in guanina e citosina si ottengono frammenti di dimensioni maggiori provenienti dal DNA mitocondriale che migrano più lentamente rispetto a quelli provenienti dal DNA nucleare. Confrontando i profili elettroforetici è possibile identificare ceppi diversi. L'analisi del DNA mitocondriale è il sistema di caratterizzazione genetica più utilizzato per identificare ceppi appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in particolare impiegando *HinfI* come enzima di restrizione (Lopez et al., 2001; Shuller et al., 2004). Il confronto dei profili di restrizione è stato fatto utilizzando il software GelComparII (Applied Maths, Belgium) che è in grado, attraverso la costruzione di una matrice, di calcolare il livello di similarità tra profili e visualizzarlo sottoforma di dendrogramma.

I profili ottenuti a ciascun tempo di campionamento sono stati confrontati con il profilo del ceppo NM12, anch'esso inserito nell'analisi per verificare se gli isolati da vinaccia avessero un profilo identico a quello del lievito inoculato. La figura 3.10 riporta la percentuale di ceppi con lo stesso profilo di NM12, per ciascuno dei tre prelievi effettuati. I risultati evidenziano come, subito dopo aver effettuato la procedura di inoculo, la dominanza del ceppo introdotto sia totale (100%). Dopo 15 giorni di stoccaggio il valore scende fino al 61% ma rimane sempre piuttosto elevato. Al termine della sperimentazione il ceppo NM12 risulta assente. In base ai dati ottenuti si può affermare che, nonostante le difficoltà di omogenizzazione della vinaccia dovute allo stato solido di questa materia prima, la procedura di inoculo sia stata effettuata correttamente. Il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* NM12 ha dominato fin dall'inizio la popolazione di lieviti, mantenendosi a valori elevati durante la fase iniziale della fermentazione. Può essere considerato pertanto il principale responsabile della trasformazione degli zuccheri presenti nella vinaccia, in alcol e composti di fermentazione. Durante la seconda parte dell'insilamento probabilmente lascia il posto ad altre specie di lieviti normalmente presenti a tempi prolungati di stoccaggio o ad altri ceppi di *Saccharomyces*.

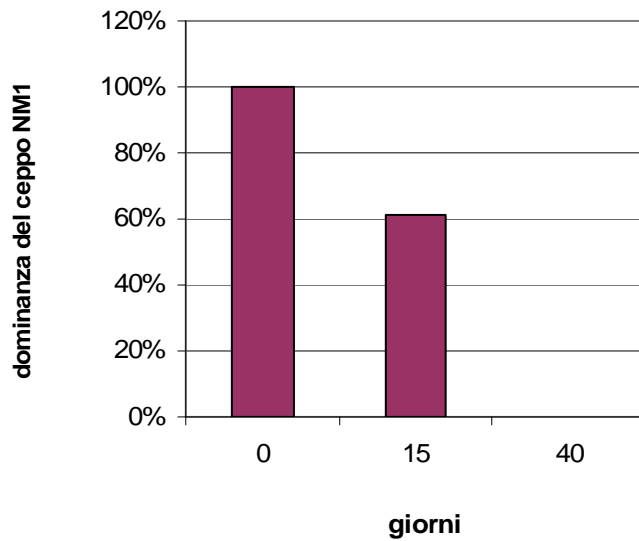


Fig. 3.10. Numero di isolati (espresso in %) con profilo del DNA mitocondriale identico al ceppo NM12, determinati ai tre tempi di campionamento.

Con lo scopo di verificare che nella vinaccia non inoculata la situazione fosse simile a quella attesa durante uno stoccaggio gestito in modo corretto, è stata monitorata l'evoluzione delle specie di lievito, le cui dinamiche nella vinaccia non trattata sono ormai note da sperimentazioni precedenti. E' stata eseguita un'analisi molecolare ITS-RFLP (descritta nel paragrafo 2.6), su un numero di colonie compreso tra 17 e 20. Dai dati riportati in tabella 3.2 si può osservare che al tempo T0 sono presenti le specie di lieviti apiculati normalmente presenti in vigneto, con una dominanza dell'82% di *Hanseniaspora uvarum*. Dopo 15 giorni l'unica specie presente è *S. cerevisiae* che domina anche a fine stoccaggio ma non completamente, lasciando spazio a specie appartenenti principalmente al genere *Pichia*.

Specie	T0	T15	T40
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	82%	—	—
<i>Pichia kluyveri</i>	12%	—	—
<i>Issatchenkia terricola</i>	6%	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	100%	55%
<i>Pichia galeiformis</i>	—	—	25%
<i>Pichia occidentalis</i>	—	—	10%
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	—	—	10%

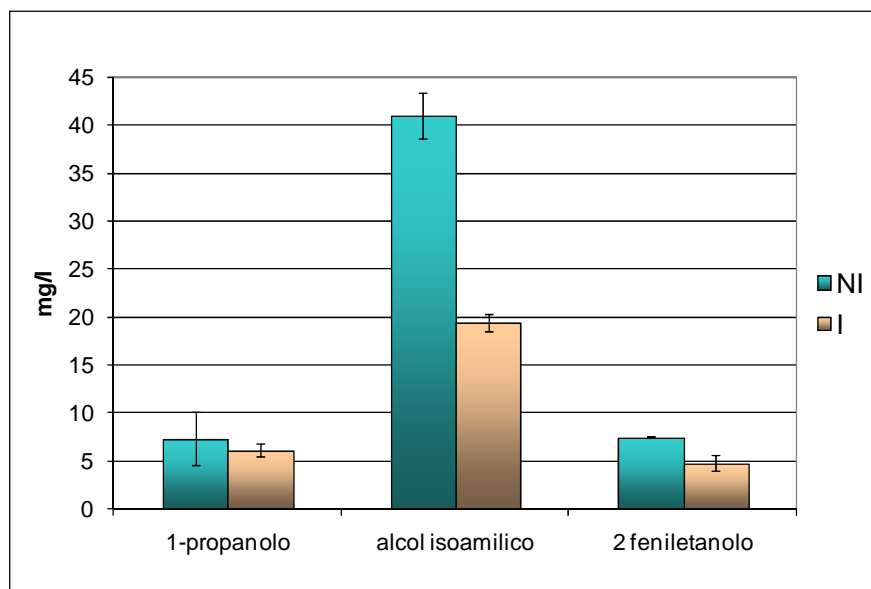
Tab 3.2. Distribuzione delle specie di lievito isolate dalla vinaccia di controllo non inoculata a diversi tempi di campionamento.

3.3.2 Valutazione della produzione di composti aromatici al termine del periodo di stoccaggio

Attraverso l'analisi gas-cromatografica già impiegata nella sperimentazione precedente, è stata fatta una valutazione preliminare dei composti volatili presenti nella flemma ottenuta dalla distillazione delle vinacce, inoculate e non, dopo 40 giorni di stoccaggio. Lo scopo di quest'analisi era di mettere in evidenza eventuali differenze nella concentrazione degli aromi prodotti nella vinaccia inoculata con il ceppo NM12 rispetto a quelli presenti nella vinaccia di controllo. Nella Fig. 3.11 sono riportati solo alcuni dei composti determinati in quanto le analisi sono ancora in fase di elaborazione. Gli alcoli superiori (3 metilbutanolo, 2 feniletanolo) e gli esteri (etilcaproato e isopentilacetato) riportati nella figura, hanno concentrazioni più elevate nella vinaccia di controllo rispetto a quella inoculata. Non vi è una differenza significativa nel caso dell'1 propanolo. In base a questi dati preliminari si osserva che vi sono differenze nell'effettuare o meno il trattamento di inoculo, ma non nella direzione in cui ci si aspetterebbe in quanto gli aromi diminuiscono nella vinaccia trattata. Tuttavia l'assenza del ceppo inoculato al termine dello stoccaggio a favore di altre specie o altri lieviti del genere *Saccharomyces* potrebbe avere influenzato le dinamiche di produzione dei composti di fermentazione. Un dato che vale la pena sottolineare riguarda il fatto che gli alcoli superiori sono tenuti a valori bassi, aspetto considerato positivo in quanto si tratta di aromi sgradevoli che si ritrovano anche in fase di distillazione.

Un giudizio più discriminante degli effetti dell'inoculo sarà sicuramente reso possibile dalla valutazione organolettica del prodotto finito, la Grappa, ottenuto dalla distillazione della vinaccia al termine dello stoccaggio.

a)



b)

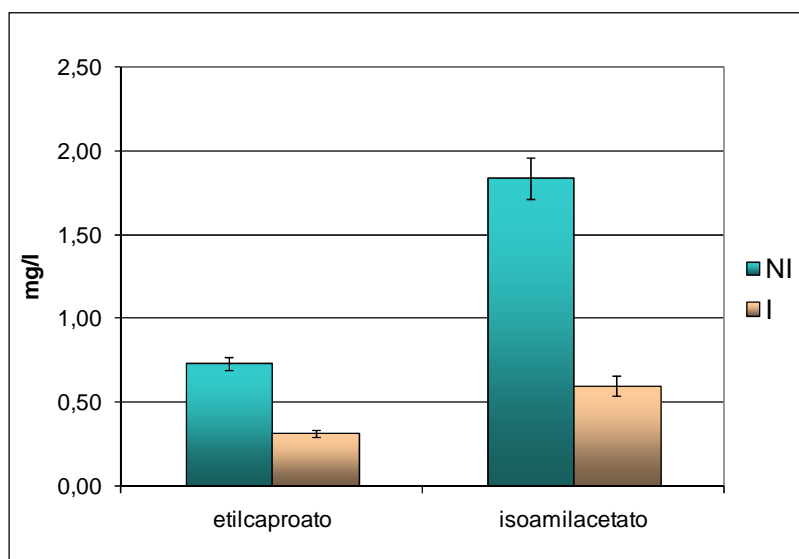


Fig. 3.11 Concentrazione di alcuni alcoli superiori (a) ed esteri (b), espressa in mg/l, determinati nel distillato ottenuto dalle vinacce inoculate (I) e di controllo (NI), al tempo T40.

3.4 Conclusioni

Le sperimentazioni riportate in questa tesi, hanno consentito di evidenziare alcuni degli effetti di due trattamenti tecnologici applicati alla vinaccia destinata alla produzione di grappa, sull'evoluzione della microflora e sulla produzione di composti aromatici prodotti al termine della fase critica dello stoccaggio.

- La prima sperimentazione, riguardante una pratica normalmente adottata dalle distillerie al momento dello stoccaggio, l'acidificazione, ha messo in evidenza come la variazione di pH ottenuta artificialmente si sia mantenuta durante tutto il periodo dello stoccaggio.
- L'abbassamento del pH ad un valore di 2,9 ha provocato cambiamenti significativi nelle popolazioni di lieviti e batteri e nel turnover di specie di lieviti durante la fermentazione. La popolazione batterica è mantenuta bassa mentre quella di lieviti aumenta, probabilmente per maggiore disponibilità di nutrienti. Le specie appartenenti al genere *Saccharomyces* sono presenti durante i primi giorni di fermentazione per poi essere rimpiazzate dalle non-*Saccharomyces* già dopo 15 giorni.
- L'analisi gas-cromatografica dei distillati ottenuti evidenzia come in generale vi sia un effetto di contenimento delle concentrazioni dei composti aromatici nella vinaccia sottoposta ad acidificazione.
- Composti quali etil lattato e 2-butanolo, prodotti dal metabolismo dei batteri e ritenuti sgradevoli per la qualità del distillato, sono tenuti a valori bassi, confermando il dato relativo al contenimento della popolazione batterica.
- La seconda sperimentazione ha previsto l'inoculo della vinaccia con un lievito *Saccharomyces cerevisiae*, scelto tra un ampio *pool* di isolati per le buone performance di fermentazione testate su scala di laboratorio.
- Le dinamiche di popolazione di lieviti seguono un andamento simile nella vinaccia inoculata e in quella di controllo, con un aumento atteso della popolazione che si attesta a valori elevati al termine dello stoccaggio.

- Analisi molecolari hanno consentito di verificare la presenza del ceppo inoculato a concentrazioni rilevanti al momento dello stoccaggio e fino a 15 giorni di conservazione, dimostrando buone capacità di colonizzazione dello starter. E' possibile affermare quindi, che il ceppo scelto sia stato responsabile della trasformazione degli zuccheri in alcol che si conclude rapidamente durante i primi giorni di stoccaggio.
- I dati preliminari ottenuti dall'analisi gas-cromatografica hanno evidenziato come in generale sembri esserci una diminuzione delle concentrazioni dei composti aromatici nel distillato ottenuto da vinaccia inoculata, fatto sicuramente positivo per quanto riguarda gli alcoli superiori, solitamente associati ad odori sgradevoli nel prodotto finale. Tuttavia l'assenza del ceppo inoculato al termine dello stoccaggio a favore di altre specie o altri lieviti del genere *Saccharomyces* potrebbe avere influenzato le dinamiche di produzione dei composti di fermentazione.

4. Bibliografia

BARTOWSKY E. e HENSCHKE P. (2008), Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine- a review. *International Journal of Food Microbiology* 125:60-70.

BOATTO V., GALLETTO L., ROSSETTO L., TRESTINI S. (2003), Dati di mercato nei vari canali di vendita. *Accademia della Grappa e delle Acquaviti – Osservatorio sulla Grappa*.

CAI J., ROBERTS I.N., COLLINS M.D. (1996), Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 46: 542-549.

CALÒ A., COSTACURTA A., CANCELLIERI S., CRESPIAN M., MILANI N., CARRARO R., GIUSTI M., SARTORI E., FORTI R., CIPRIANI L., DI STEFANO R., PIGELLE R., BOTTERO S. E GENTILINI N. (2000) *Delle viti Prosecche*. Edizioni Libra.

CASAREGOLA S., NGUYEN H.V., LAPATHITIS G., KOTYK A. AND GAILLARDIN C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51: 1607-1618.

CHINNICI F., NATALI N., ANTONELLI A., RIPONI C. (2001), Influenza del ceppo di lievito sulle caratteristiche aromatiche della grappa da vinacce di cv. Trebbiano, *Industrie delle Bevande* XXX ottobre, 475-479.

DA PORTO C. (2002), Volatile composition of “grappa low wines” using different methods and conditions of storage on an industrial scale, *Int. J. Food Science and Technol.*, 37:395-402.

DA PORTO C., DECORTI D. (2006), Effect of cooling conditions on separation of volatile compounds in grappa using tray and packed columns without reflux, *Int. J. Food Science and Technol.*, 43, 638-643.

DE BARROS LOPES M, BELLON JR, SHIRLEY NJ AND GANTER PF (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* 1: 323-331.

DE PINA C.G, HOGG T.A. (1999), Microbial and chemical changes during the spontaneous ensilage of grape pomace, *J. Appl. Microbiol.*, 88: 777-784.

DE ROSA T., CASTAGNER R. (1994), *Tecnologia delle grappe e dei distillati d'uva*, Ed agricole.

ESTEVE-ZARZOSO B., BELLOCH C., URUBURU F., QUEROL A. (1999), Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 329-337.

FLAMINI R., DALLA VEDOVA A., CASTAGNER R., SALVADOR M. (2002a) Il profilo aromatico della grappa di Prosecco: gli aromi dalle vinacce al distillato. *L'Enologo* (12):89-94.

FLEET G.H. (2003), Yeast interaction and wine flavour, *Int. J. Food Microbiol.*, 86: 11-22.

FOURY F., ROGANTI T., LECRENIER N., PURNELLE B. (1998), The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 440: 325-331.

GAROGLIO P.G. (1980), Nuova enologia, Edizione rinnovata del volume III dell'enciclopedia vitivinicola mondiale, Edizione AEB.

JOHNSTON M., HILLIER L., RILES L. *et al.* (1997), *Nature*, 29: 387.

JOLLY N.P., AUGUSTYN O.P.H, PRETORIUS I.S. (2006), The role and the use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, vol.27 (1): 15-37.

KURTZMAN C.P. (1993), Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence, *Antonie van Leeuwenhoek*, 63: 165-174.

KURTZMAN C.P., ROBNETT C.J. (1998), Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek* , 73:331-371.

KURTZMAN C.P., FELL J.W. (1998), *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.

KURTZMAN C.P., FELL J.W. (2000), *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.

KURTZMAN C.P. (2003), Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma*, and *Zygorulasporea*, *FEMS Yeast Research*, 4: 233-245.

MEWES H.W., ALBERMANN K., BÄHR M., FRISHMAN D., GLEISSNER A., HANI J., HEUMANN K., KLEINE K., MAIERL A., OLIVER S.G., PFEIFFER F., ZOLLNER A. (1997), Overview of the yeast genome, *Nature*, 387 supp: 7-8.

NAUMOV G.I., JAMES S.A., NAUMOVA E.S., LOUIS E.J., ROBERTS I.N. (2000), Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1931-1942.

NAUMOV G.I., NGUYEN H.V., NAUMOVA E.S., MICHEL A., AIGLE M., GAILLARDIN C. (2001), Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast, *Int. J. Food Microbiol.*, 65: 163-171.

- NGUYEN H.V., LÉPINGLE A. and GAILLARDIN C., (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, *Syst Appl Microbiol.* 23: 71-85.
- NYKÄNEN L. (1986) Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages, *Am J Enol Vitic* 37 (1): 84 – 96.
- ODELLO L., GIOMO A., VERSINI G., ZIRONI R. (1997) *Grappa analisi sensoriale & Tecnologie*, Ed. Centro studi e formazione assaggiatori, Brescia.
- ODELLO L. (1999), *Grappa, solo italiana per tradizione e per legge*, Supplemento a L'Assaggio n.5, Editore: Centro studi e formazione Assaggiatori s.c.a. r.l.
- ORTEGA C., LÓPEZ R., CACHO J., FERREIRA V., (2001), Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic – flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts, *Journal of Chromatography A*, 923205 – 214
- PRAMATEFTAKI P.V., LANARIDIS P., TYPAS M.A. (2000), Molecular identification of wine yeasts at species or strain level : a case study with strains from two vine-growing areas of Greece, *J. Appl. Microbiol.*, 89: 236-248.
- PRETORIUS I.S. (2000), Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*, 16: 675-729.
- RIBÉREAU-GAYON P. ., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A. (1998) *Trattato di enologia II*, Edizione Edagricole
- RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A. (2000), *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinification*, John Wiley & Sons Ltd.
- ROUSSEAU S., DONÈCHE B. (2001), Effects of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry, *Vitis*, 40: 75-78.
- RUBERTO G., RENDA A., AMICO V., TRINGALI C. (2008) Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology* 99: 261-268.
- VERSINI G., MARGHERI G. (1979), Rapporto fra i costituenti volatili della Grappa e le caratteristiche organolettiche. *Vini d'Italia XXI*: 269-277.
- VICENZINI M., ROMANO P., FARRIS G.A.(2005), *Microbiologia del vino*. Edizioni Ambrosiana.
- ZAMBONELLI C. (2003), *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*, Edagricole.