

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Utilizzo di *Lachancea thermotolerans* in fermentazione sequenziale su due mosti rosati

Use of *Lachancea thermotolerans* in sequential fermentation on two rosé musts

Relatore:

Prof. Simone Vincenzi

Laureando:

Davide Bertazzon

Matricola n. 1223046

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	3
1.1 INTRODUZIONE E SCOPO	5
1.2 METODI COMUNI PER RIMEDIARE AL PROBLEMA	6
2. COMPONENTI DEL VINO	7
2.1 ACIDITÀ TOTALE	7
2.2 ACIDI DEL VINO	7
2.3 ACIDITÀ VOLATILE	8
2.4 pH	8
2.5 GLICEROLO	9
2.6 SOLFITI	9
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 PRODOTTI ENOLOGICI	11
3.2 LACHANCEA THERMOTOLERANS	13
3.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE	15
3.4 LABORATORIO	16
3.5 MOSTI TRIAL PROTOCOL	17
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	19
4.1 VINIFICAZIONE SPERIMENTAZIONE 69 SYRAH	19
4.2 VINIFICAZIONE SPERIMENTAZIONE 82 CINSAUT	23
4.3 ACIDO LATTICO	27
4.4 ACIDITÀ TOTALE e pH	28
4.5 ALCOL	29
4.6 pH, INTENSITÀ COLORANTE E SOLFITI	29
4.7 GLICEROLO	31
4.8 COMPOSIZIONE AROMATICA DEL VINO	31
4.9 DISCUSSIONE	34
RINGRAZIAMENTI	37
BIBLIOGRAFIA	38
SITOGRAFIA	39

RIASSUNTO

Il cambiamento climatico sta avendo un effetto importante sulla produzione di vino, causando un aumento del grado alcolico e la perdita delle caratteristiche di freschezza e acidità, rendendo i vini microbiologicamente e chimicamente meno stabili. *Lachancea thermotolerans* diventa quindi una soluzione enologica a queste problematiche, poiché ha la capacità di trasformare parte degli zuccheri fermentescibili in acido lattico, permettendo un'acidificazione biologica. L'acido lattico non è generalmente presente nei mosti, ma si trova nei vini che svolgono la fermentazione malo-lattica. L'obiettivo della tesi sperimentale, svolta con Sofralab, è quello di valutare gli effetti di una vinificazione con tre ceppi differenti di *Lachancea thermotolerans* su mosti di Syrah e Cinsaut, vinificati in rosato. È stata quindi svolta una fermentazione sequenziale con la prima aggiunta di *Lachancea thermotolerans* e dopo 24 o 48 ore è stato aggiunto *Saccharomyces cerevisiae*, per svolgere la fermentazione alcolica. Sono stati valutati gli effetti sulle caratteristiche chimiche del vino, evidenziando l'elevata produzione di acido lattico che ha portato ad una diminuzione di pH e ad un aumento dell'acidità totale, la maggiore quantità di glicerolo e una diminuzione del grado alcolico. Le analisi aromatiche evidenziano una maggiore presenza di lattato di etile, ma sotto la soglia di percezione e differenti quantità di alcuni esteri e acetati. Appare evidente che un'acidificazione biologica e una diminuzione del grado alcolico siano fondamentali per le caratteristiche di un vino rosato, in particolare se prodotto in una zona calda.

ABSTRACT

The climate change is going to have a huge impact in the wine production, it will cause the increasing of alcohol and the losing of freshness and acidity, as well as making the wines microbiologically and chemically less stable. *Lachancea thermotolerans* could become an interesting enological resolution at these problems, because it is able to transform part of the fermentable sugars into lactic acid, having a biological acidification. Generally, lactic acid is not present in the must but in the wine that undergo a malo-lactic fermentation. These experiments, carried out with Sofralab, have as their objectives to evaluate the effects of a vinification with three different strains of *Lachancea thermotolerans* on rosé must of Syrah and Cinsaut. We made a sequential fermentation adding first *Lachancea thermotolerans* and after 24 or 48 hours we added *Saccharomyces cerevisiae*, for the alcoholic fermentation. We evaluated the different effects on the chemical characteristics of the wines, discovering a high amount of lactic acid that caused the decreasing of pH, the increasing of total acidity, a higher amount of glycerol and the decreasing of alcohol. The organoleptic analyses highlight a higher quantity of ethyl lactate, but under the soil of perception and different quantities of

some esters and acetates. Appears evident that a biologic acidification and a decreasing of alcohol are fundamental for a rosé wine, particularly if the wine is made in a hot region.

1.1 INTRODUZIONE E SCOPO

L'atmosfera assicura al nostro pianeta un clima adatto alla vita grazie al cosiddetto effetto serra naturale. I raggi solari raggiungendo la superficie terrestre, vengono in parte assorbiti e in parte vengono riflessi verso l'esterno. In assenza di atmosfera si disperderebbero nello spazio ma vengono invece in buona parte trattenuti e quindi reindirizzati verso la Terra da alcuni gas presenti nell'atmosfera. "Il riscaldamento climatico a cui stiamo assistendo da circa 150 anni è però anomalo, perché innescato dall'uomo e dalle sue attività" (I). Si chiama effetto serra antropico e si aggiunge all'effetto serra naturale, causando un incremento della temperatura media mondiale. Questo fattore influenza direttamente l'agricoltura, basti pensare che in mancanza di interventi, "la temperatura media del nostro pianeta potrebbe aumentare di +1,5 °C tra il 2030 e il 2050" (I). Se gli accordi di Parigi non venissero rispettati dai Paesi e non si verificasse una transizione ecologica per limitare l'eccessivo surriscaldamento, si avrebbero effetti devastanti in agricoltura. Dal punto di vista fenologico, "l'aumento di temperatura è considerato responsabile per un avanzamento di 6-25 giorni per differenti vitigni in Europa, con una media di 3-6 giorni di risposta per 1°C di riscaldamento negli ultimi 30-50 anni" (1). Questo causa problematiche a livello fenologico ed enologico, perché le temperature più elevate significano maturazioni precoci con squilibri dal punto di vista della composizione delle bacche, soprattutto nel rapporto zuccheri/acidi. Si avrà una precoce perdita di acidità con conseguente maggior accumulo di zuccheri nel mosto, perdendo le caratteristiche di freschezza e acidità fondamentali nel vino, oltre a rendere i vini microbiologicamente e chimicamente meno serbevoli.

Il consumo di bevande alcoliche, in particolare di vino, è comunemente accettato in quanto fa parte della cultura e tradizione italiana. Ciò non di meno il consumo di alcol rappresenta un importante problema di salute pubblica, "in quanto responsabile in Europa del 4% della mortalità" (II). Data la tossicità dell'alcol e le regolamentazioni vigenti che ne limitano il consumo, sempre più consumatori cercano prodotti a basso tenore alcolico. "La percentuale dei consumatori giornalieri di bevande alcoliche è pari al 20,2%, in diminuzione rispetto a quanto osservato dieci anni prima (27% nel 2009)" (III). Il trend in crescita negli ultimi anni è il consumo di bevande a basso tenore alcolico, il consumo di birra è aumentato a scapito di quello del vino. Di conseguenza la tendenza che si osserva negli ultimi anni è la limitazione del grado alcolico nei vini, per favorirne il consumo.

La sperimentazione si pone come obiettivo di verificare gli effetti di *Lachancea thermotolerans* sul vino; in particolare si concentra sulla capacità acidificante tramite la produzione di acido lattico da zuccheri fermentescibili con conseguente capacità di abbassare il grado alcolico.

1.2 METODI COMUNI PER RIMEDIARE AL PROBLEMA

Gli enologi intervengono con aggiunte di acidi di origine chimica per limitare il problema della bassa acidità. Vengono aggiunti acido tartarico, malico, lattico e citrico al fine di garantire freschezza e bevibilità del vino. Queste aggiunte sono regolamentate dalla OIV e dall'Unione Europea al fine di limitare l'eccessivo utilizzo di questi prodotti. La UE è divisa in tre macro-zone: A, B e C. Queste contengono i diversi paesi dell'Unione, l'Italia rientra nell'area C insieme a Spagna, Portogallo, Cipro, Grecia e sud della Francia, in cui è consentita l'acidificazione dei vini tramite acidi di origine chimica. Le aggiunte possono essere effettuate sia su mosto che su vino, ma con diverse condizioni. Ogni acido ha diverse caratteristiche e diversi poteri acidificanti e viene scelto in base alle condizioni di vinificazione e ai tipi di vino. Inoltre è possibile eseguire un'acidificazione tramite tagli con mosti più acidi, l'utilizzo di resine a scambio cationico ed elettrodialisi.

Il tenore alcolico non è facilmente diminuibile, poche sono le tecniche in grado di abbassarlo anche solo in parte. Le pratiche viticole ed enologiche classiche permettono una parziale risposta al problema, infatti si possono mettere in atto vendemmie anticipate, minori esposizioni solari, climi più freschi, gestione della chioma e sistemi di allevamento a tendone. Le pratiche enologiche ammesse sono lasciare un residuo zuccherino, eseguire tagli con mosti meno zuccherini o tramite la nanofiltrazione.

2. COMPONENTI DEL VINO

2.1 ACIDITÀ TOTALE

La componente acida è fondamentale sia per l'equilibrio "chimico" del vino, sia per i suoi aspetti gustativi. Un'acidità troppo elevata rende il vino aspro, mentre se troppo bassa lo rende piatto, scialbo e insipido. Risulta quindi fondamentale eseguire delle analisi per identificarla. L'acidità totale è quel valore che misura il contenuto di tutte le sostanze acide presenti nel mosto e nel vino, include sia le sostanze acide volatili (acido acetico), sia quelle fisse (acido tartarico, malico, lattico, citrico, succinico etc.). Alcuni acidi come l'acido tartarico, citrico e malico sono normalmente presenti nell'uva e si modificano durante il processo di maturazione a differenza dell'acido lattico, succinico e acetico che vengono prodotti dai processi metabolici di lieviti e batteri.

2.2 ACIDI DEL VINO

L'acido più importante nell'uva è l'acido tartarico, presente in quantità fino ai 150 mM/L, è prodotto dal metabolismo secondario degli zuccheri. "La fase erbacea dello sviluppo dell'uva si caratterizza da un rapido accumulo di tartarico che rimane relativamente costante, malgrado l'aumento di volume dell'acino" (2). Questo acido ha un gusto duro e tende a precipitare sotto forma di sale, formando cristalli di calcio o potassio.

L'acido citrico non è presente in grandi quantità nell'uva e di conseguenza si ritrova nel vino in bassissime concentrazioni. L'acido citrico viene facilmente degradato dai batteri, dunque bisogna utilizzarlo in modo adeguato ed evitare aggiunte prima dei processi microbiologici.

L'uva contiene l'isomero L(-)malico, componente fondamentale soprattutto per i vini spumanti ma anche per i vini rossi per la correlazione con la fermentazione malo-lattica. La maturazione dell'uva modifica il metabolismo dell'acido malico, il quale tenore diminuisce rapidamente dopo l'invasatura arrivando a tenori nel mosto che variano da 1-5 g/L.

L'acido lattico è uno dei principali acidi del vino, componente dell'acidità totale. L'acido lattico però non è presente nel mosto e non viene prodotto durante la fermentazione alcolica. La sua presenza è generalmente attribuita all'attività dei batteri lattici che, svolgendo la fermentazione malo-lattica, trasformano l'acido malico in acido lattico.

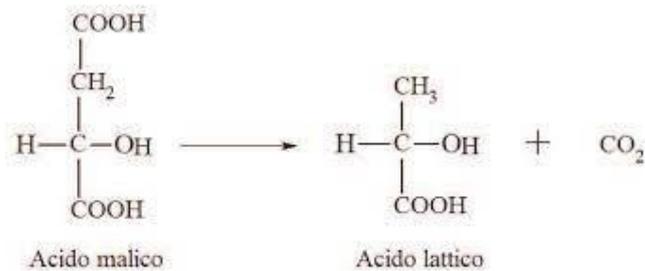


Figura FML: trasformazione dell'acido malico in lattico, trasformazione che avviene nella fermentazione malo-lattica (immagine da <http://agrariafree.altervista.org/appunti%20agraria/microbiologia/microbiologia%20enologica.pdf>)

È un acido monoprotico, stabile e dal sapore lattico. Garantisce al vino una minore acidità, rendendolo più morbido e piacevole. Può formare esteri interagendo con l'etanolo, formando l'etil lattato o anche chiamato 2-idrossi-etil-propionato. Il lattato di etile si può trovare naturalmente in piccole quantità in vari alimenti, tra cui vino, pollo e diversi frutti. L'odore di etil lattato quando diluito è lieve, burroso, cremoso e con sentori di frutta e cocco.

2.3 ACIDITÀ VOLATILE

L'acidità volatile è composta principalmente dall'acido acetico che è sempre prodotto dal lievito, ma le elevate quantità si ottengono a causa di alterazioni batteriche. “I vini finiti presentano valori di 0,3-0,5 g/L di acidità volatile (H₂SO₄) proveniente dall'attività dei lieviti e dei batteri lattici” (2). L'acido acetico viene principalmente prodotto in due momenti: durante la prima fase di glicero-piruvica e in fase stazionaria. “All'aumentare degli zuccheri c'è un aumento di acetico e glicerolo che avviene per una maggiore trascrizione dei geni GDP1 responsabile della sintesi di glicerolo e ALD2, ALD3 e ALD4 responsabili della sintesi di acetato” (2). La formazione di acetato svolge un ruolo fisiologico nell'equilibrio redox, rigenerando NADH. In fase stazionaria viene prodotto acetato, che rallenta il ciclo degli acidi grassi; quindi, l'AcetilCoA implicato nella loro sintesi viene idrolizzato in acetato per liberare il CoA che in questa fase di vinificazione è in basse quantità e necessita un turnover.

2.4 pH

Il pH è una scala che indica il carattere acido o basico delle soluzioni. In genere i valori di pH del vino oscillano tra i 3 e 3,8, indicando una soluzione molto acida. Questo varia in base alla concentrazione degli ioni H⁺ e degli ioni OH⁻, più è elevata la concentrazione degli acidi più il pH è basso poiché questi sono in grado di dissociarsi e rilasciare ioni H⁺ in soluzione. “Al diminuire del pH, compresa la diminuzione causata dall'acidificazione con acido lattico, l'intensità del colore degli antociani aumenta” (3). Questo suggerisce quindi che le sperimentazioni con *L. thermotolerans* dovrebbero avere una maggiore colorazione data dalla diminuzione del pH.

2.5 GLICEROLO

Il glicerolo è un componente fondamentale del vino, conferendo corpo, morbidezza e setosità al prodotto. Una caratteristica desiderata e ricercata dai consumatori. La produzione di glicerolo si ottiene attraverso la fermentazione glicero-piruvica, che avviene prima della fermentazione alcolica con gli obiettivi di bilanciare l'equilibrio osmotico (il lievito si trova in una soluzione ipertonica) e per riossidare il NADH (per permettere la glicolisi). Di conseguenza i lieviti utilizzano questa via metabolica per ottenere le condizioni adeguate ad avviare la fermentazione alcolica. Il glicerolo si trova in quantità da 3 a 15 g/L nel vino, in base alle caratteristiche del mosto (più zuccheri ci sono più bisognerà bilanciare la concentrazione osmotica). Nella fermentazione del mosto circa l'8% delle molecole di zucchero segue la via della fermentazione glicero-piruvica. “La glicero-piruvica non è solamente una fermentazione d'induzione, ma fermentazione alcolica e glicero-piruvica sono strettamente legate durante tutta la vinificazione” (2).

2.6 SOLFITI

I solfiti (o la solforosa) sono dei prodotti essenziali, utilizzati in innumerevoli processi di vinificazione e in innumerevoli prodotti alimentari. Hanno potere antiossidante, antisettico e anti-ossidativo. “*S. cerevisiae* ha un'elevata tolleranza nei confronti dei solfiti” (4). Attua diversi meccanismi di resistenza tra cui: elevata produzione di acetaldeide (che lega la SO_2 bloccandone l'entrata nella cellula), l'utilizzazione dei solfiti tramite solfito riduttasi, inferiore penetrazione di SO_2 attraverso la membrana e un elevato contenuto di glutatione (che blocca l'azione della SO_2). Nel corso della vinificazione la solforosa viene impiegata in vari modi dall'aggiunta nel carro di trasporto dell'uva fino all'imbottigliamento. Possono essere utilizzati per diversi scopi in base ai momenti di utilizzo, all'inizio per evitare l'ossidazione del mosto, inibire fermentazioni spontanee e bloccare l'attività di enzimi ossidativi, successivamente con scopo di protezione dall'ossigeno e dallo sviluppo di batteri. I solfiti permettono una maggiore “shelf life” del prodotto. Waterhouse nei suoi studi (2016) riporta che sono sufficienti 20-40 mg/L di SO_2 libera per proteggere il vino da ossidazioni e sviluppo di microbi. In Europa, ma anche in altri paesi del mondo, la quantità di solfiti è regolamentata, poiché sono tossici e possono causare problemi alla salute. La normativa europea 2019/934 stabilisce i limiti in accordo con la OIV. Per i vini rosati fermi con residuo zuccherino inferiore ai 5g/L, la dose massima di solforosa totale è di 200 mg/L. *Lachancea thermotolerans* è un lievito che non sopporta bene la solforosa, “questo potrebbe essere legato alla bassa produzione di acetaldeide e di acido piruvico di questo” (5), per questo motivo non è stata aggiunta dopo la pressatura delle uve, per evitare l'azione tossica nei confronti di questo lievito. La SO_2 ha una forte interazione con le sostanze coloranti, legandole può renderle incolore diminuendo la tonalità del vino. La sua efficacia è anche

influenzata dall' acidità e quindi dal pH, di conseguenza ci sono correlazioni tra questi fattori che analizzeremo successivamente.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PRODOTTI ENOLOGICI

Durante il processo di vinificazione sono stati utilizzati diversi prodotti enologici. Per ottenere un prodotto di qualità è spesso necessario correggere dei parametri analitici attraverso l'ausilio di prodotti esogeni. Questi permettono di evitare problemi durante la vinificazione come: arresti fermentativi, aromi impropri, casse e contaminazioni batteriche. Diventa quindi fondamentale l'ausilio di:

SOLFOROSA: prodotto antiossidante, antisettico e anti-ossidativo indispensabile per preservare le caratteristiche del vino. È stata utilizzata sia solforosa liquida che sotto forma di metabisolfito di potassio, durante i vari processi di vinificazione.

DIWINE SR: prodotto a base di PVI/PVP ha lo scopo di allungare la vita dei vini rosati, permette di evitare i fenomeni di ossidazione conservando aromi freschi e la componente colorante. Diminuisce la concentrazione dei polifenoli che presentano rischi di ossidazione, il colore giallo dei rosati ed elimina i metalli pesanti.

PVPP: polivinilpolipirrolidone è un prodotto che crea un reticolo di macromolecole agendo per adsorbimento e catturando selettivamente polifenoli ossidati.

SO DELIGHT: lievito selezionato in Val de Loire per Sofralab, scelto per la sua attitudine a produrre vini bianchi e rosati aromatici con uno stile fresco e fruttato. Dotato di una rapida cinetica di fermentazione, necessita di un elevato quantitativo di azoto. Utilizzato a 20 g/hL, reidratato in dieci volte il suo peso a 37°C.

NUTRICELL MIDFERM: è un nutrimento complesso necessario per una buona conduzione di fermentazione alcolica, libera nella soluzione azoto minerale, organico e scorze di lievito. Contiene una buona fonte amminoacidica, di ione ammonio e di scorze che permettono una parziale detossificazione della soluzione (circa 2,3 g/hL di azoto per 20 g/hL di prodotto). Viene sciolto in dieci volte il suo peso in acqua calda e aggiunto alla soluzione.

ELECTRA: è una bentonite calcica attivata con forte potere deproteinizzante, può essere usata sia su mosto che su vino, al fine di evitare la formazione di precipitati proteici. Elimina le proteine instabili, enzimi ossidanti, ma anche una parte della componente colorante.

CRISTALINE: colla di pesce dall'aspetto granulare, ottenuta da vescica natatoria di storione. Una colla proteica molto delicata adatta per vini bianchi e rosati difficili e torbidi. È un prodotto di affinamento e definizione che migliora la filtrabilità, elimina l'amaro, precipita polveri e particelle in

sospensione ottenendo un vino limpido e cristallino. Deve essere diluita in cinquanta volte il suo peso in acqua fredda e aggiunta agitando il vino per una migliore omogenizzazione.

ANTARTIKA FRESH: è uno stabilizzante tartarico, basato sull'associazione di poliaspartato di potassio e polisaccaridi vegetali. Permette una stabilizzazione tartarica dei vini conservando e rafforzando il carattere fresco e fruttato. Va aggiunto dopo filtrazione, in dose di 20 cl/hL.

3.2 LACHANCEA THERMOTOLERANS

È un lievito che utilizza gli zuccheri fermentescibili come fonte di energia e produce acido lattico come scarto. Sono stati utilizzati 3 ceppi differenti che chiameremo “lievito 1”, “lievito 2” e “lievito 3”. “*Lachancea (kluyveromyces) thermotolerans* è un lievito ubiquitario che si può trovare naturalmente sulle uve, ma anche in altri habitat come suolo, insetti e piante. Morfologicamente è globoso o ellissoidale, non distinguibile da *S. cerevisiae*. E’ un lievito teleomorfo che presenta riproduzione sessuale con produzione di ascospore (da 1 a 4) La riproduzione asessuata avviene per gemmazione multi laterale” (6). “*L. thermotolerans* è uno dei lieviti che si possono trovare naturalmente nella fermentazione del vino ed è già stato dimostrato che può aumentare l’acidità dei vini mediante produzione di acido lattico” (7). “Le sue caratteristiche sono proprio alta produzione di acido lattico, bassa produzione di acidità volatile, moderata produzione di alcol, e assenza di produzione di off flavours” (Ribereau-Gayon et al. 1975). Questo particolare lievito utilizza l’enzima lattico deidrogenasi (LDH) per trasformare parte del piruvato in lattato, permettendo una ri-ossidazione del NADH, che verrà poi utilizzato nella glicolisi. “L’alta espressione della lattico deidrogenasi è legata ad una assenza di espressione di alcol deidrogenasi (ADH), che richiede quindi una via alternativa per mantenere il bilancio redox” (5).

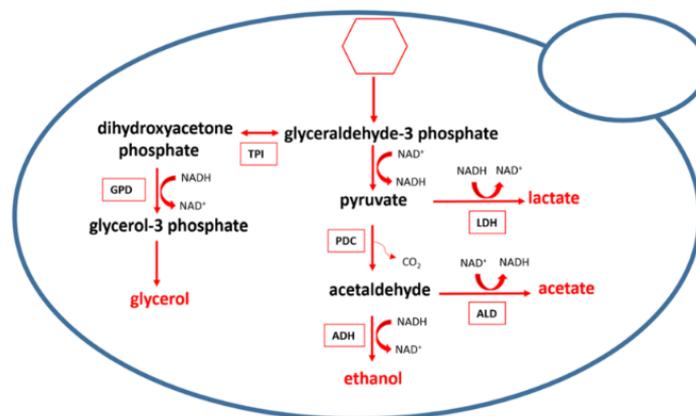


IMMAGINE *Lachancea thermotolerans*: immagine metabolismo di *Lachancea thermotolerans*. (immagine da “Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation Ana Hranilovic^{1,2}, Joanna M.Gambetta³, Leigh Schmidtke^{1,3}, Paul K. Boss⁴, Paul R.Grbín², Isabelle Masneuf-Pomarede^{5,6}, Marina Bely⁵, Warren Albertin^{5,7} & Vladimir Jiranek”)

Nella fermentazione alcolica classica *S. cerevisiae* produce etanolo con lo stesso obiettivo, la ri-ossidazione di NADH. Diventa quindi una possibile soluzione alle problematiche correlate all’aumento dei gradi alcolici e alla diminuzione dell’acidità. L’abbassamento dell’acidità e l’innalzamento del pH compromettono la freschezza del vino e questi ceppi di *Lachancea thermotolerans* rappresentano un’alternativa naturale all’acidificazione chimica, necessaria per

riequilibrare l'acidità. Questo lievito ha un elevato fabbisogno azotato e non è particolarmente resistente alla solforosa; infatti, nel mosto i tenori di SO₂ totale devono essere inferiori ai 10 mg/L al momento dell'inoculo, per permetterne lo sviluppo.

3.3 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

È il lievito che viene maggiormente utilizzato per trasformare il mosto in vino. Ne esistono innumerevoli ceppi con caratteristiche peculiari che vengono utilizzati in base agli obiettivi e alle caratteristiche del mosto. *Saccharomyces cerevisiae* utilizza gli zuccheri fermentescibili per produrre energia, ma produce come scarto etanolo che viene rilasciato in soluzione. Il meccanismo di produzione di energia inizia con la glicolisi che trasforma glucosio in piruvato, successivamente grazie all'enzima piruvato decarbossilasi viene prodotta acetaldeide e poi ridotta in etanolo. La produzione di glicerolo avviene prima della fermentazione alcolica con gli obiettivi di bilanciare l'equilibrio osmotico (il lievito si trova in una soluzione ipertonica) e per riossidare il NADH (per permettere la glicolisi). Una volta bilanciato l'equilibrio osmotico viene avviata la fermentazione alcolica e quindi consumati gli zuccheri.

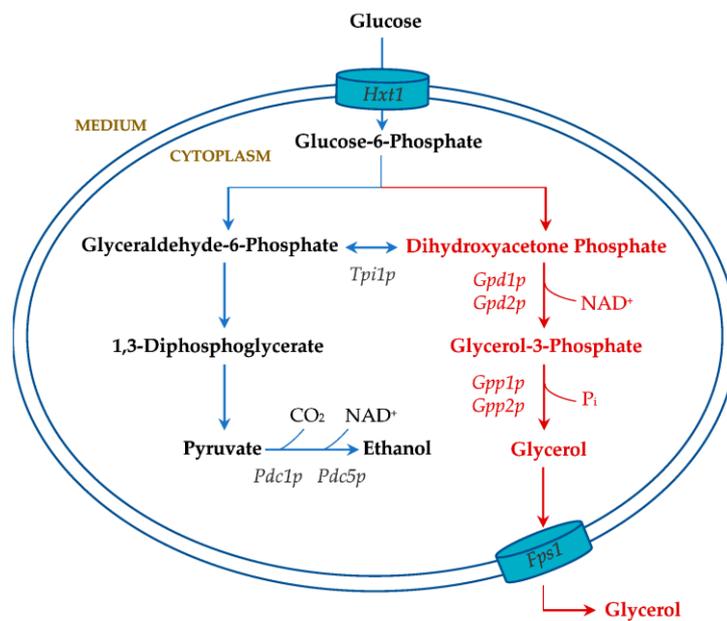


IMMAGINE *Saccharomyces cerevisiae*: processo di fermentazione glicero-piruvica (in rosso) e di fermentazione alcolica (immagine da “Advances in the Study of Candida stellata by Margarita García,*ORCID,Braulio Esteve-Zarzoso 2ORCID, Juan Mariano Cabellos and Teresa Arroyo”)

S. cerevisiae viene diviso in ceppi con carattere flocculento, di film (o velo) o polverulenti, quest'ultimi sono i più utilizzati e quelli scelti dai provider perché rimangono di più in soluzione permettendo una migliore fermentazione alcolica. Esistono lieviti dotati di fattore killer, alto produttori di esteri, altri con attività beta-liasica, con più o meno resistenza all'etanolo e bassi produttori di acido acetico. Di conseguenza la scelta del miglior ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* dipende dagli obiettivi enologici e dalle necessità.

3.4 LABORATORIO

Le analisi sono state svolte nel laboratorio del Campus Montagnac di Sofralab dove, insieme a Catherine Rocco enologa e responsabile del laboratorio, abbiamo analizzato mosto e vini nei diversi momenti del processo di vinificazione. I risultati di laboratorio non sono solo necessari e indispensabili per riflettere e trarre conclusioni sulla sperimentazione ma sono serviti per effettuare una migliore vinificazione evitando carenze nutritive, arresti di fermentazione, elevate quantità di metalli pesanti e conservazione delle caratteristiche di intensità aromatica e colorante.

Le analisi del glicerolo sono state commissionate al laboratorio Océanie di Vallet (Francia).

Le analisi di aromi sono state commissionate al laboratorio Nyseos di Montpellier (Francia).

Le analisi sono state effettuate con due strumenti differenti: FOSS WineScan e Konelab Arena 60. Quest'ultimo identifica la quantità dei due acidi per via enzimatica permettendoci di avere una maggiore precisione rispetto al FOSS, che li misura in modo approssimativo e quindi utilizzato per le altre analisi.

Foss Winescan serve per la misurazione di alcol potenziale, zuccheri, acidità totale e volatile, solforosa totale e libera, pH, rame, azoto assimilabile, ammoniacale e aminico, potassio e anidride carbonica. È basato sull'assorbanza d'energia infrarossa, i campioni sono pompati, scaldati e posizionati in una cellula di misura che è attraversata da un fascio di luce infrarosso (2500-10000 nm). Il sistema ottico utilizzato è un Interferometro a trasformazione di Fourier, che permette di scansionare istantaneamente l'intero spettro nel mezzo infrarosso. Lo spettro d'assorbanza è subito trasformato in risultato tramite un'equazione di calibrazione specifica del prodotto e del parametro misurati. La misura consiste di quantificare i cambiamenti nella potenza di luce indotta nel campione, di conseguenza la quantità di luce trasmessa è quella non assorbita dal campione misurato (ogni parametro ha un'equazione di calibrazione).

Konelab arena 60 è stato utilizzato per l'analisi di acido malico e lattico. È un analizzatore con un sistema integrato che permette la determinazione automatica di analisi di routine di biochimica clinica. La gamma Konelab comprende quattro modelli, noi abbiamo utilizzato Konelab PRIME 60 che permette di effettuare 600 analisi/ora. Il principio di funzionamento è che una cuvetta viene trasferita dal caricatore in una posizione libera dell'incubatore, poi viene ruotata in un canale previsto per la distribuzione del reattivo nel campione da analizzare, successivamente avviene un omogenizzazione grazie ad un agitatore rotativo e infine avviene l'analisi. I principi di analisi di acido malico e lattico sono differenti:

-principio l-malico: l'acido malico nell' uva e vino è l'isomero L(-) che contribuisce all'acidità fissa di un vino ed è biologicamente instabile. Il principio di analisi è che in presenza di NAD (Nicotinammide-Adenina-Dinucleotide) l'acido malico è ossidato in ossalacetato in una reazione catalizzata da K-malato deidrogenasi (L-MDH). Così viene prodotto ossalacetato e NADH+H*. La formazione di NADH misurata tramite l'aumento di assorbanza a 340 nm è proporzionale alla quantità di L-malico presente (la misurazione viene effettuata dopo 5 minuti perché è il momento in cui si esprime con miglior precisione la quantità di acido).

-principio l-lattico: L'acido lattico è presente nei vini ma non nell'uva. Normalmente deriva dalla trasformazione dell'acido malico da parte dai batteri lattici, spesso viene effettuata la fermentazione malo-lattica perché l'acido lattico è un acido più gradevole e setoso e contribuisce all'acidità di un vino. Il principio per la sua misurazione è lo stesso dell'acido l-malico, ovvero viene misurata la quantità di NADH prodotta dalla reazione del lattato+NAD, che utilizzando l'enzima L-Lattatodeidrogenasi produce Piruvato+NADH+H*. In questo caso la misurazione viene effettuata a 10 minuti poiché è questo il tempo di reazione più preciso per effettuare la misurazione del NADH a 340 nm.

Il bentotest Richard Wagner è un reattivo che permette di mettere in evidenza la presenza di proteine instabili in un vino. Viene utilizzato per determinare la quantità necessaria di bentonite da utilizzare per eliminare le proteine instabili di vini bianchi o rosati. Consiste nel prendere 10ml di vino e filtrarlo a 0,45 μm in un tubo falcon, successivamente aggiungere 1 ml della soluzione Bentotest (acido fosfomolibdico) agitare e attendere fino al giorno successivo quando si osserverà del deposito sul fondo del tubo. Sarà compito dell'enologo quantificare la bentonite necessaria in base al deposito e all'esperienza personale.

3.5 MOSTI TRIAL PROTOCOL

I mosti di Syrah e Cinsaut sono stati acquistati alla "Cave Cooperative Montagnac". Le uve vengono acquistate da viticoltori della zona, giunte in cantina vengono diraspate, pigiate e pressate. Olivier Fonade, l'enologo della cantina sperimentale, ha la possibilità di acquistare e scegliere i mosti che desidera, selezionando quelli più affini al tipo di sperimentazione. CC Montagnac permette di adattare i trattamenti dei mosti per soddisfare i criteri di ricerca della Cave Experimentale, inoltre possono essere modificate le caratteristiche per raggiungere gli obiettivi di vinificazione. La temperatura del mosto al suo ricevimento era di 16°C.

Le sperimentazioni sono state svolte utilizzando 3,5 hL di mosto per ogni sperimentazione. Il mosto è stato posto in una vasca refrigerata da 4 hL, dopo la precipitazione statica a freddo è stato distribuito in 5 parti uguali in 5 vasche da 1 hL. La temperatura e la densità di ogni vasca sono stata monitorate

ogni mattina tramite densimetro. Inoltre sono stati presi e inviati al laboratorio campioni di mosto/vino durante tutta la permanenza del vino in cantina, per conoscerne le caratteristiche.

Lieviti e preparazione degli inoculi

“In genere si possono utilizzare due modalità di inoculo: sequenziale e co-inoculo. Nel co-inoculo tutti i lieviti sono aggiunti al mosto nello stesso momento, mentre nell’inoculo sequenziale i non-*Saccharomyces* vengono inoculati per primi e lasciati fermentare per un certo periodo, prima di inoculare il *Saccharomyces*” (8). Le due sperimentazioni svolte avevano l’obiettivo di valutare le caratteristiche di una fermentazione sequenziale, utilizzando come primo inoculo *Lachancea thermotolerans* e dopo 24 o 48 ore inoculare *Saccharomyces cerevisiae*. Sono stati utilizzati differenti ceppi di lievito, che abbiamo chiamato “lievito 1”, “lievito 2” e “lievito 3”. Al fine di valutarne le caratteristiche e studiare differenti lieviti di differenti case produttrici.

I lieviti hanno svolto reidratazioni e inoculazioni leggermente diverse in base a quanto riportato dai provider:

-lievito 1: reidratazione a 25°C, in quantità di 25 g/HL, senza nutrimento e inoculato a circa 15°C

-lievito 2: reidratazione a 25°C, in quantità di 25 g/HL, senza nutrimento e inoculato a circa 15°C

-lievito 3: reidratazione a 37°C, in quantità di 25 g/HL, senza nutrimento e inoculato a circa 15°C

Reidratati in dieci volte il loro peso. Le differenze tra la temperatura dell’inoculo e del mosto erano inferiori ai 10°C, evitando shock termici e non superando i 30 minuti di reidratazione.

Dopo 24 o 48 ore, in base alla modalità, è stato inoculato So delight, un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*. So delight permette di svolgere una buona fermentazione, rispettando le caratteristiche varietali del mosto. È stato utilizzato a 20 g/hL, reidratato in 10 volte il suo peso, con acqua a 37°C, insieme sono stati aggiunti 20 g/hL di Nutricell Initial (dovendo così raddoppiare il volume della soluzione). A metà fermentazione è stata aggiunta un’ulteriore dose di nutrimento (Nutricell Midferm) per evitare arresti fermentativi e portare a termine la fermentazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 VINIFICAZIONE SPERIMENTAZIONE 69 SYRAH

Il mosto di Syrah è stato preso dalla cantina sociale di Montagnac, dove è stato ottenuto tramite pressatura diretta di uve di Syrah, ottenendo così un mosto rosato. All'arrivo del mosto in cantina è stata eseguita la prima analisi:

Date	Cuve	Sucres réducteurs (g/L)	Degré potentiel (% vol.)	AT (g/L) H ₂ SO ₄	AV (g/L) H ₂ SO ₄	SO ₂ T (mg/L)	SO ₂ L (mg/L)	pH	Acide Malique (g/L)	Azote Assimilabile (mg/L)	K (mg/L)	Cuivre (mg/L)
08-set	T1	219,00	12,99	3,05	0,00	5,00	0,00	3,53	1,36	221,00	2044,00	1,30

IMMAGINE ANALISI A: analisi di mosto di Syrah al conferimento

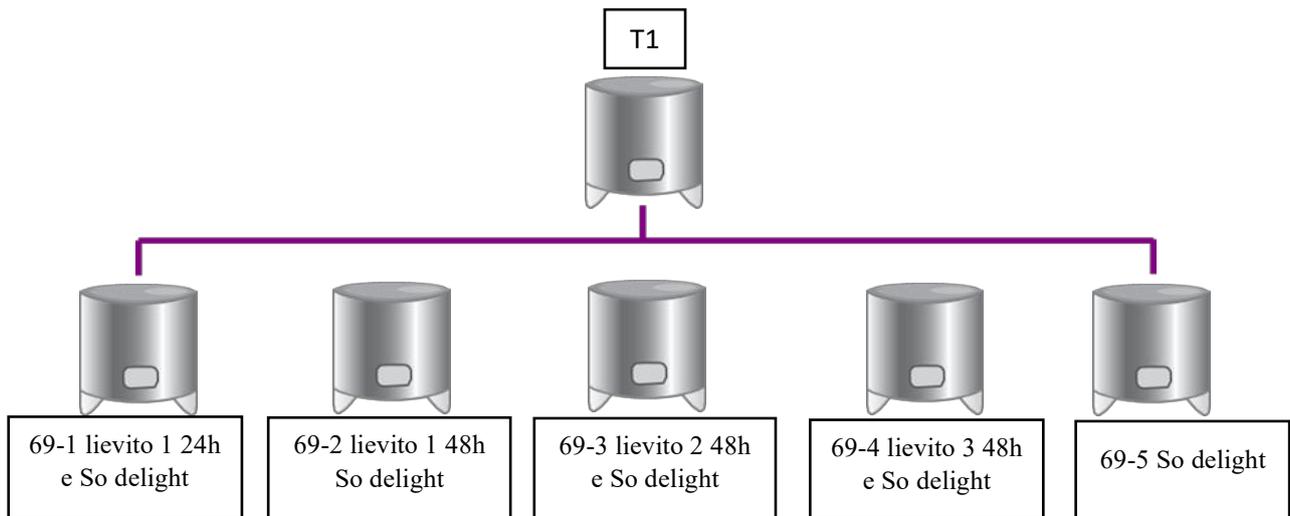
Questa analisi ci ha permesso di valutare le caratteristiche del mosto e di intervenire per correggere alcuni parametri. Una volta che il mosto è stato posto nella vasca è stata svolta la precipitazione statica a freddo, con l'obiettivo di eliminare fibre, residui di uva, polisaccaridi e altre molecole, evitando così l'elevata torbidità e l'insorgere di aromi di riduzione. Durante la precipitazione statica a freddo abbiamo aggiunto 30 g/hL di PVI/PVP al fine di eliminare la notevole quantità di rame che avrebbe compromesso sia le caratteristiche organolettiche, chelando gli aromi, che le componenti del colore, ossidandole. Inoltre, si evidenzia la buona quantità di APA e la bassa quantità di SO₂ necessaria per l'utilizzo di *Lachancea thermotolerans*.

L'analisi del giorno successivo conferma l'efficacia del trattamento:

09-set	T1	215,00	12,76	2,56	0,00	6,00	1,00	3,50	1,41	236,00	1677,00	0,92
--------	----	--------	-------	------	------	------	------	------	------	--------	---------	------

IMMAGINE ANALISI B analisi mosto di Syrah dopo il trattamento con PVI/PVP

Dopo la precipitazione statica a freddo il mosto è stato travasato in 5 differenti vasche, permettendoci di svolgere 5 modalità differenti: nelle prime quattro è stata svolta una fermentazione sequenziale ovvero prima si è aggiunto *Lachancea thermotolerans* e dopo 24 o 48 ore aggiunto *Saccharomyces Cerevisiae* (So delight), per svolgere la fermentazione alcolica. Sono stati aggiunti 3 ceppi differenti di *Lachancea thermotolerans* al fine di valutarne le caratteristiche (lievito 1, lievito 2 e lievito 3). Mentre nella quinta modalità è stata svolta una fermentazione alcolica classica.



In tutte le modalità sono stati aggiunti 20 g/hL di nutrimento a base di scorza di lievito insieme all'inoculazione di So Delight (Nutricell Initial), per stimolare l'attività dei lieviti e fornirgli l'adeguata nutrizione. A metà fermentazione alcolica sono stati aggiunti 20 g/hL di Nutricell Midferm.

La densità indica la concentrazione zuccherina nel mosto, di conseguenza viene utilizzata per valutare l'attività fermentativa e quindi il consumo degli zuccheri da parte del lievito. È stata monitorata giornalmente al fine di valutare il potere fermentativo dei lieviti e analizzare il progredire della fermentazione.

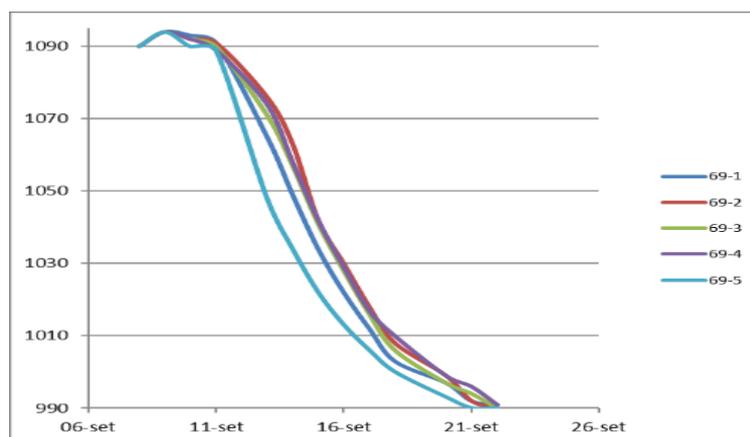


IMMAGINE DENSITA': curve di andamento della densità dei mosto-vini durante le fermentazioni

Come si può notare dal grafico la fermentazione si è svolta in circa 12 giorni con velocità molto simili tra 69-2, 69-3 e 69-4 dato che le due inoculazioni sono state effettuate nello stesso momento per le tre modalità. La modalità 69-5 si differenzia perché è stata svolta immediatamente una fermentazione alcolica con solo *S. cerevisiae*, che avendo un maggior potere fermentativo ha avuto un avvio più

rapido. Anche 69-1 termina la fermentazione prima delle altre tre modalità proprio perché So delight è stato aggiunto 24 ore dopo l'aggiunta di *L. thermotolerans*.

La temperatura è un fattore fondamentale nella fermentazione alcolica, perché influenza il metabolismo del lievito. Bisogna evitare temperature troppo elevate poiché causerebbero fermentazioni incomplete e sfavorevoli per lo sviluppo di aromi, ma d'altro canto, anche una temperatura troppo bassa può causare l'arresto della fermentazione.

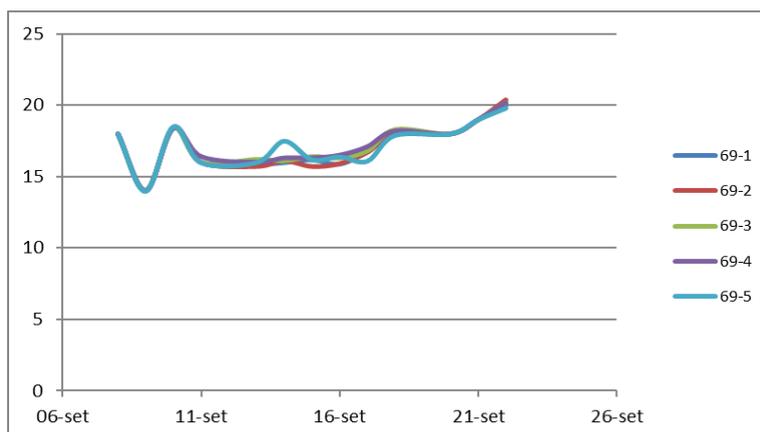


IMMAGINE TEMPERATURA: curve di andamento della temperatura durante le fermentazioni

La temperatura ideale alla quale condurre la fermentazione dipende dal tipo di vinificazione che si sta effettuando. Nel nostro caso vinifichiamo un vino rosato e quindi per preservare aromi freschi e fruttati si preferiscono temperature tra i 15°C e i 20°C. Abbiamo mantenuto queste temperature durante tutto il processo di fermentazione, come si denota dal grafico.

In questa sperimentazione la temperatura è stata controllata grazie a vasche refrigerate. (In data 15 settembre si nota un picco della temperatura per la modalità 69-5 poiché c'è stato un malfunzionamento del sistema refrigerante, risolto in giornata e quindi ristabilita la temperatura adatta). Il 16 settembre la consegna del sistema di raffreddamento è passata da 16°C a 17°C. Mentre il 21 settembre il sistema di refrigerazione è stato fermato, come si può notare nella IMMAGINE TEMPERATURA, per permettere al lievito di consumare tutti gli zuccheri, evitando residui zuccherini che avrebbero causato problemi di instabilità microbiologica.

All'inoculo di So delight sono stati aggiunti 20 g/hL di Nutricell Initial e verso metà fermentazione alcolica Nutricell Midferm, per fornire nutrimento e limitare la tossicità da etanolo, favorendo lo sviluppo del lievito e permettendogli di completare la fermentazione in modo ottimale.

Una moderata quantità di ossigeno è necessaria per un buon svolgimento di fermentazione. Infatti, la sua carenza sfavorisce la riproduzione di lieviti, causando stress e quindi possibili blocchi fermentativi. Per questo motivo il 13 e 14 settembre sono stati svolti due rimontaggi. Il rimontaggio permette di ossigenare il vino allo scopo di ottenere un ambiente meno riducente e stimolando la produzione di steroli e acidi grassi insaturi, necessari per limitare la tossicità all'etanolo. Inoltre, viene utilizzato per rimuovere odori sgradevoli di ridotto dati dall'idrogeno solforato.

L'obiettivo della fermentazione alcolica (che viene svolta da So delight) è trasformare gli zuccheri fermentescibili in etanolo, mentre per quanto riguarda i ceppi di *Lachancea thermotolerans* utilizzano gli zuccheri come fonte energetica producendo acido lattico che verrà rilasciato in soluzione.

Una volta terminata la fermentazione è stato eseguito un travaso eliminando le fecce di lievito e per consentirne la conservazione, i vini sono stati protetti con anidride solforosa (SO₂) liquida.

Il primo ottobre tutti i vini sono stati collati con 10 g/hL di bentonite Electra, al fine di eliminare le proteine instabili che avrebbero causato una casse proteica. Successivamente è stata aggiunto 1,5 g/hL di colla di pesce Cristaline garantendo brillantezza e trasparenza. Una settimana più tardi è stato svolto il travaso per eliminare i prodotti enologici e sono stati aggiunti 3 g/hL di solforosa.

Il 3 ottobre 2021 il vino è stato filtrato, poi aggiunto Antartika Fresh (poliaspartato di potassio per la stabilità tartarica) e imbottigliato.

Le analisi finali, dopo imbottigliamento, del 22 novembre confermano il completamento della fermentazione alcolica e l'attività svolta dai ceppi sperimentati:

	Sucres réducteurs (g/L)	Degré acquis (% vol.)	AT (g/L) H ₂ SO ₄	AV (g/L) H ₂ SO ₄	SO ₂ T (mg/L)	SO ₂ L (mg/L)	pH	Acide Malique (g/L)	Acide lactique (g/L)	CO ₂ mg/L
69-1	0,4	13,73	3	0,29	89	26	3,52	1,32	0,49	840
69-2	1	13,67	3,14	0,35	82	29	3,47	1,18	0,84	994
69-3	0,8	13,66	3,03	0,31	77	28	3,48	1,14	0,69	930
69-4	1	13,58	3,57	0,33	71	21	3,4	1,14	1,74	848
69-5	0,3	13,76	2,7	0,31	109	37	3,56	1,31	0,02	718

IMMAGINE ANALISI: analisi del vino in bottiglia

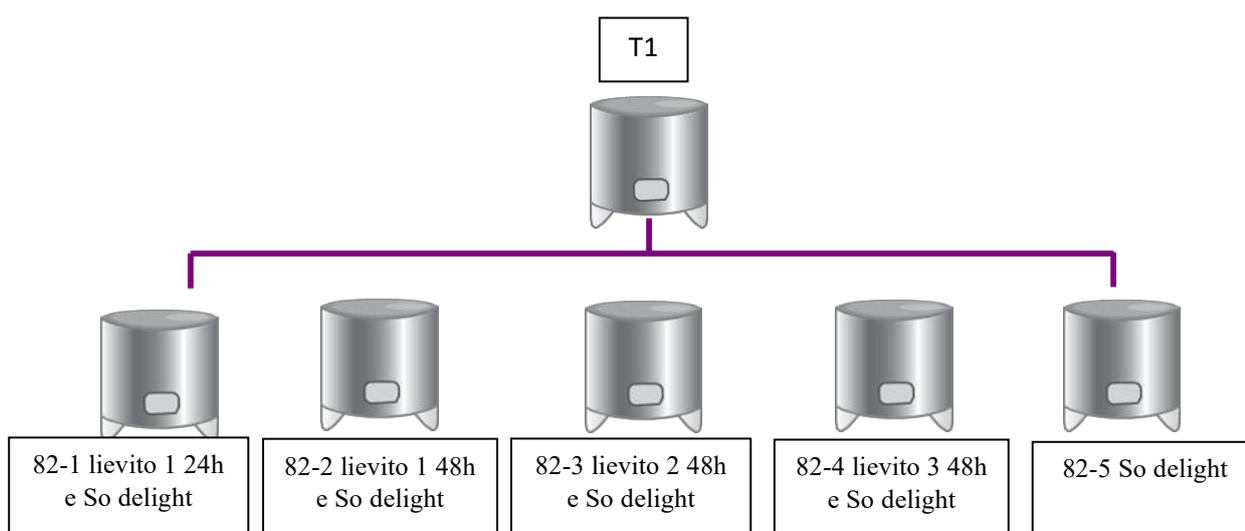
4.2 VINIFICAZIONE SPERIMENTAZIONE 82 CINSAUT

Il mosto rosato di Cinsaut è stato preso dalla cantina sociale di Montagnac, dove è stato ottenuto per pressatura diretta di uve di Cinsaut. Il mosto è stato analizzato in laboratorio. Presentava evidenti note ossidative sia dal punto di vista aromatico che del colore, di conseguenza sono stati aggiunti 20 g/hL di PVPP e 30 g/hL di PVI/PVP, permettendoci di eliminare le componenti ossidate e limitare le future ossidazioni. L'analisi mostra un'adeguata concentrazione zuccherina (187 g/L), una buona dose di APA (182 mg/L) ma anche una elevata concentrazione di rame (1,30 mg/L) motivo per cui è stato aggiunto PVI/PVP.

Date	Cuve	Sucres réducteurs (g/L)	Degré potentiel (% vol.)	AT (g/L) H ₂ SO ₄	AV (g/L) H ₂ SO ₄	SO ₂ T (mg/L)	SO ₂ L (mg/L)	pH	Acide Malique (g/L)	Azote Assimilabile (mg/L)	K (mg/L)	Acide Tartrique (g/L)	Cuivre (mg/L)
18-set	T1	187	11,12	3,47	0,00	5	0	3,35	2,11	182	1723	4,39	1,30

IMMAGINE ANALISI: analisi di mosto di Cinsaut al conferimento

Dopo la precipitazione statica a freddo il mosto è stato travasato in 5 differenti vasche, permettendoci di svolgere 5 modalità differenti: nelle prime quattro è stata svolta una fermentazione sequenziale ovvero prima si è aggiunto *Lachancea thermotolerans* e dopo 24 o 48 ore aggiunto *Saccharomyces Cerevisiae* (So delight), per svolgere la fermentazione alcolica. Sono stati aggiunti 3 ceppi differenti di *Lachancea thermotolerans* al fine di valutarne le caratteristiche (lievito 1, lievito 2 e lievito 3). Mentre nella quinta modalità è stata svolta una fermentazione alcolica classica.



In tutte le modalità sono stati aggiunti 20 g/hL di nutrimento a base di scorza di lievito insieme all'inoculo di So Delight (Nutricell Initial), per stimolare l'attività dei lieviti e fornirgli l'adeguata

nutrizione. “La risposta del lievito al contenuto di azoto durante la fermentazione alcolica influenza sia la cinetica di fermentazione che la produzione di sottoprodotti. I lieviti hanno sviluppato un complesso sistema regolatorio per adattarsi alle modifiche nella disponibilità di azoto, come quelle che avvengono durante la fermentazione alcolica” (9). A metà fermentazione alcolica sono stati aggiunti 20 g/hL di Nutricell Midferm.

La densità indica la concentrazione zuccherina nel mosto, viene utilizzata per valutare l'attività fermentativa e quindi il consumo degli zuccheri da parte del lievito. È stata monitorata giornalmente al fine di valutare il potere fermentativo dei lieviti e analizzare il progredire della fermentazione.

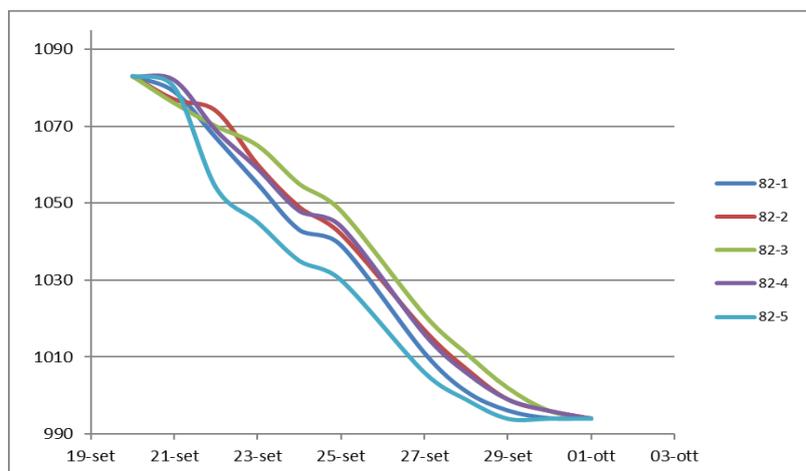


IMMAGINE DENSITA': curve di andamento della densità durante le fermentazioni

Come si può notare dal grafico la fermentazione è stata svolta in circa 12 giorni con velocità molto simili tra 82-2, 82-3 e 82-4, mentre le modalità 82-1 e 82-5 portano a termine la fermentazione più velocemente perché So delight, rispetto alle altre modalità, è stato aggiunto prima.

La temperatura è un fattore fondamentale nella fermentazione alcolica, perché influenza il metabolismo del lievito. Bisogna evitare temperature troppo alte poiché causerebbero fermentazioni incomplete e sfavorevoli per lo sviluppo di aromi ma d'altro canto, anche una temperatura troppo bassa può causare l'arresto della fermentazione. Come nella vinificazione precedente stiamo parlando di un vino rosato e quindi per preservare aromi freschi e fruttati si preferiscono temperature tra i 20°C e i 15°C.

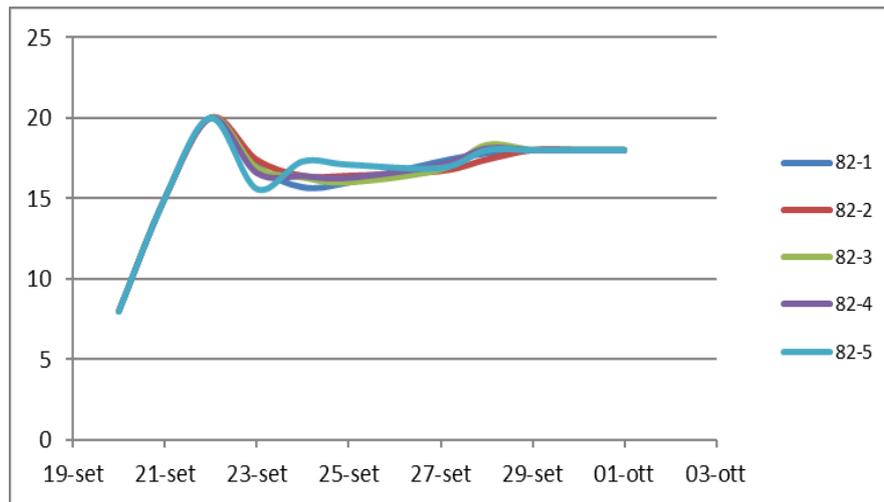


IMMAGINE TEMPERATURE: curve di andamento della temperatura durante le fermentazioni

Anche in questo caso è stata monitorata la temperatura che presenta un picco iniziale che arriva a 20 °C per poi scendere grazie al sistema di raffreddamento, permettendoci di svolgere una fermentazione a 16-17 °C. I lievi aumenti di temperatura che si osservano dopo il 25 settembre sono dati dalla decisione di alzare la temperatura di refrigerazione a 17 °C. Lo stesso giorno sono stati aggiunti 20g/HL di Nutricell Midferm.

Il 23 e 25 settembre sono stati svolti due rimontaggi, per favorire un ambiente meno riducente e eliminare sgradevoli odori di idrogeno solforato.

L'obiettivo della fermentazione alcolica (che viene svolta da So delight) è trasformare gli zuccheri fermentescibili in etanolo, mentre per quanto riguarda i lieviti *Lachancea thermotolerans* permette loro di produrre energia e quindi di svilupparsi dal glucosio, che utilizza come fonte carboniosa, ottenendo come prodotto di scarto acido lattico che verrà rilasciato in soluzione.

Una volta terminata la fermentazione è stato eseguito un travaso eliminando le fecce di lievito e per consentirne la conservazione, i vini sono stati protetti con anidride solforosa (SO₂) liquida.

Il dodici ottobre è stato svolto un Bentotest. Il giorno successivo, ottenuti i risultati, le cinque modalità sono state collate con 40 g/hL di Electra, al fine di eliminare le proteine instabili che avrebbero causato una casse proteica. Successivamente sono stati aggiunti 2 g/hL di Cristaline per garantire brillantezza e trasparenza. Una settimana più tardi è stato svolto il travaso per eliminare i prodotti enologici ed aggiunti 3 g/hL di solforosa.

Il 3 ottobre 2021 il vino è stato filtrato, aggiunto Antartika Fresh (per la stabilità tartarica), solfitato e imbottigliato.

Le analisi finali, dopo imbottigliamento della sperimentazione 82:

	Cuve	Zuccheri (g/L)	Grado alcolico (% vol.)	AT (g/L) H ₂ SO ₄	AV (g/L) H ₂ SO ₄	SO ₂ T (mg/L)	SO ₂ L (mg/L)	pH	Acido Malico (g/L)	Acideo Lattico (g/L)	CO ₂ mg/L
22-nov	82-1	1,5	11,29	4,05	0,29	100	25	3,39	1,47	1,18	482
	82-2	1,8	11,27	4,34	0,36	107	25	3,31	1,42	1,64	482
	82-3	1,6	11,42	3,65	0,33	99	14	3,41	1,56	0,3	812
	82-4	1,6	11,21	4,21	0,39	120	19	3,34	1,48	1,34	520
	82-5	1,3	11,46	3,41	0,2	101	27	3,46	1,67	0,01	974

IMMAGINE ANALISI: analisi del vino in bottiglia

4.3 ACIDO LATTICO

Le diverse modalità hanno portato a risultati differenti permettendo di valutare le caratteristiche e peculiarità dei tre ceppi di lievito di *Lachancea thermotolerans*.

Nelle modalità dove è stata eseguita la fermentazione sequenziale sono presenti elevate quantità di acido lattico e sono stati consumati tutti gli zuccheri, a conferma dell'efficacia della fermentazione sequenziale.

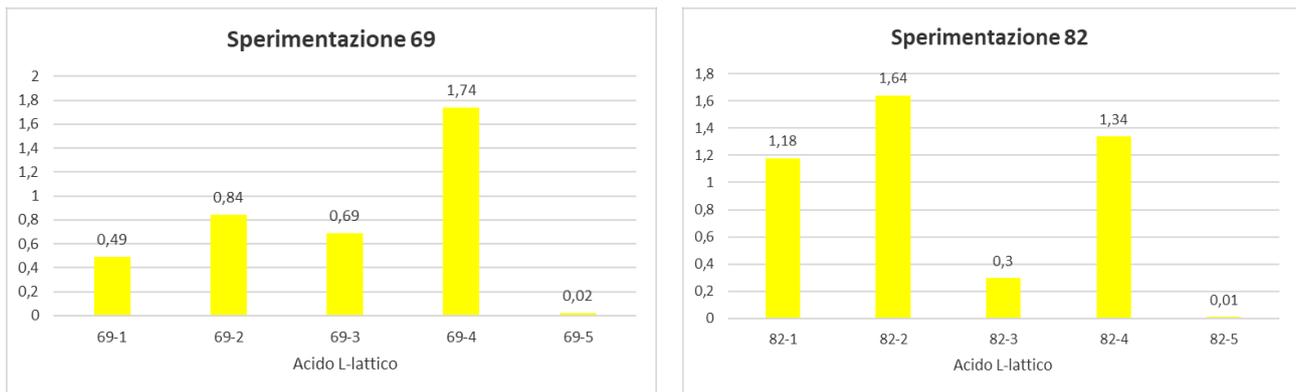


IMMAGINE ANALISI ACIDO LATTICO: analisi dei valori di acido L-lattico presente nei vini di Syrah (69) e Cinsaut (82)

Si notano differenze anche tra i medesimi lieviti come tra 69-1 e 82-1, dove *L. thermotolerans* ha fermentato per 24 ore, evidenziando differenze sostanziali probabilmente causate da una differenza del mosto di partenza. Questo può significare che i diversi lieviti abbiano performance variabili in base al substrato nel quale si trovano infatti il “lievito 1” (0,49-0,84 g/L e 1,18-1,64 g/L) e il “lievito 3” (1,74 e 1,34 g/L) mostrano importanti produzioni di acido lattico in entrambe le sperimentazioni, il “lievito 2” ne ha prodotto meno (0,69 g/L e 0,3 g/L) soprattutto nel mosto di Cinsaut. Le differenze possono anche essere date da cinetiche fermentative differenti o problemi di competizione con la flora indigena.

Sostanziale è l'assenza di acido lattico nelle modalità 5, ovvero dove è stato utilizzato esclusivamente *S. cerevisiae*, le modalità testimone non solo non presentano acido lattico, ma hanno anche una minore acidità totale e un pH più elevato come si può vedere dalle analisi.

4.4 ACIDITÀ TOTALE e pH

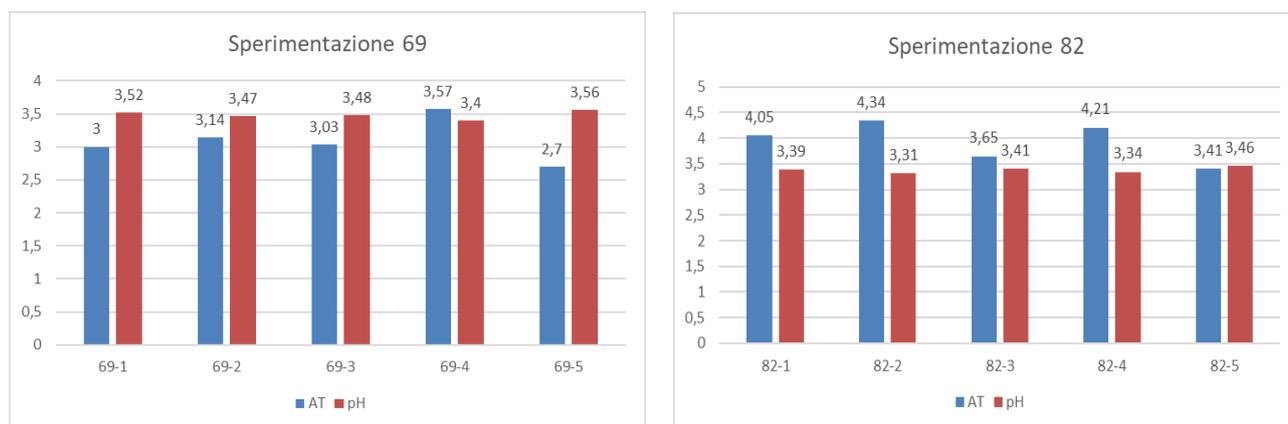


IMMAGINE ACIDITA' TOTALE E Ph: Indica la quantità di acidità totale (gH₂SO₄/L) e il valore di pH nei vini di Syrah (69) e di Cinsaut (82)

Bisogna evidenziare la relazione tra la maggiore quantità di acido lattico e le differenze di acidità totale e pH. Una complessiva maggiore acidità permette di avere un vino più fresco, con migliori caratteristiche organolettiche e più amato dal consumatore.

Le modalità 69-1 e 82-1, dove è stato utilizzato il lievito 1 per 24 ore, evidenziano una buona quantità di acido lattico in entrambe le sperimentazioni, con conseguente aumento acidità totale e pH più basso. Nella sperimentazione 82 il lievito 1 si è adattato bene e ha avviato un buon processo metabolico sia nella modalità 24 ore che in quella di 48 ore, permettendoci di avere rispettivamente il terzo e il primo valore di acidità totale e di pH più basso.

Il lievito 2 nonostante abbia svolto il suo metabolismo per 48 ore prima dell'inoculazione di So delight è quello che ha prodotto minori quantità di acido lattico, con conseguente minore acidità totale e pH più elevato, evidenziando il basso potere di trasformazione. È probabile che abbia esigenze nutritive più elevate o che non si sia adattato in maniera efficace alla soluzione.

Il lievito 3 ha prodotto elevate quantità di acido lattico con costanza, ovvero 1,74 g/L e 1,34 g/l di acido lattico nelle due sperimentazioni. Si può affermare che sia più affidabile rispetto agli altri due ceppi, data la maggiore costanza nelle due sperimentazioni. Nella sperimentazione 69 è stato il miglior ceppo fermentatore, mentre nella sperimentazione 82 il secondo migliore.

I valori di acidità totale indicano una correlazione alla produzione di acido lattico delle diverse modalità, mentre inversamente proporzionale con il pH. Se nella prima sperimentazione è il lievito 3 ad aver prodotto più acido lattico (modalità 4), allora questa modalità avrà l'acidità totale più elevata e il pH più basso. Lo stesso vale per le altre modalità, per entrambe le sperimentazioni.

4.5 ALCOL

Alcune fonti citano che l'utilizzo di *L. thermotolerans* porti a diminuzioni significative di gradi alcol, "da 0.1% a 1.6% alcol" (10). Nelle due sperimentazioni non sono percepibili le differenze alla degustazione, ma i parametri analitici evidenziano delle differenze.

	Degré acquis (% vol.)
69-1	13,73
69-2	13,67
69-3	13,66
69-4	13,58
69-5	13,76

Per quanto riguarda la prima prova (serie 69) sono state riscontrate differenze comprese tra 0,03% e 0.18% alcol rispetto al testimone, che presentava il valore più elevato. Con valori più importanti nel lievito 3 (dove è stato prodotto più acido lattico), mentre il valore più basso tra le quattro fermentazioni sequenziali è dove è stato prodotto meno acido lattico. La modalità 69-5 dove è stato utilizzato solo So delight è il vino con il più elevato grado alcolico.

	Degré acquis (% vol.)
82-1	11,29
82-2	11,27
82-3	11,42
82-4	11,21
82-5	11,46

Le differenze nella sperimentazione 82 sono state simili alla 69, con valori di riduzione compresi tra 0,04 e 0,25% alcol. Il risultato migliore si è ottenuto nella sperimentazione 82-4 e poi nella 82-2, dove i lieviti hanno prodotto la maggiore quantità di acido lattico. Come nella precedente sperimentazione il maggior grado alcolico è nella modalità 82-5, dove è stato inoculato esclusivamente *S. cerevisiae*.

La diminuzione alcolica registrata non risulta sufficiente per motivare l'utilizzo di questo lievito con il solo scopo della riduzione alcolica ma offre comunque la possibilità di analizzare l'effetto di una diminuzione alcolica biologica. *Lachancea thermotolerans* ha in effetti dimostrato di essere in grado di diminuire l'alcol in un vino, utilizzando parte degli zuccheri fermentescibili per produrre acido lattico invece che etanolo.

4.6 pH, INTENSITÀ COLORANTE E SOLFITI

Questi tre parametri sono strettamente correlati l'uno all'altro. Il pH influenza notevolmente l'intensità colorante dei vini perché modifica l'equilibrio tra le diverse strutture delle antocianine influenzando anche sulla reattività di queste, minore è il pH maggiore sarà l'intensità colorante. Anche i solfiti giocano un ruolo chiave sull'intensità colorante, infatti la solforosa può legarsi con gli antociani e renderli incolori causando una diminuzione di colore del vino. La quantità di solfiti aggiunta è stata molto simile, con l'obiettivo di arrivare a 20 mg/L di SO₂ libera in bottiglia.

Nelle due sperimentazioni nonostante la diminuzione di pH, l'intensità colorante non viene drasticamente modificata alla vista, infatti non si notano sostanziali differenze. Dal punto di vista statistico le differenze possono essere valutate perché si parla di differenze notevoli; infatti, nella

sperimentazione 69 la modalità 5 presenta circa il 28% in meno rispetto alla 69-1 (modalità con l'IC più elevata). Il processo di vinificazione, l'utilizzo di SQ e prodotti per la protezione dall'ossidazione sono stati utilizzati in modo analogo in tutte le modalità. Questo ci permette di evidenziare che le differenze sono date esclusivamente dalla diminuzione di pH, che porta ad una maggiore intensità colorante (IT= DO420+DO520).

Nella sperimentazione 82 il colore era già carente nel mosto e il processo di trasporto da CC Montagnac alla Cave Experimentale, ha causato un'ulteriore ossidazione compromettendolo ulteriormente. Nonostante l'utilizzo di Diwine SR e PVPP la componente colorante è bassa. Si possono però notare differenze dal punto di vista statistico, infatti la modalità 82-5 presenta un valore di circa 73% inferiore al migliore valore della sperimentazione 82 (82-3). Risulta importante notare che i valori della sperimentazione 82 non sono particolarmente affidabili data la scarsa colorazione. Infatti, i dati di intensità colorante sono poco superiori a quelli di un vino bianco, proprio per questo motivo non si notano sostanziali differenze alla vista.

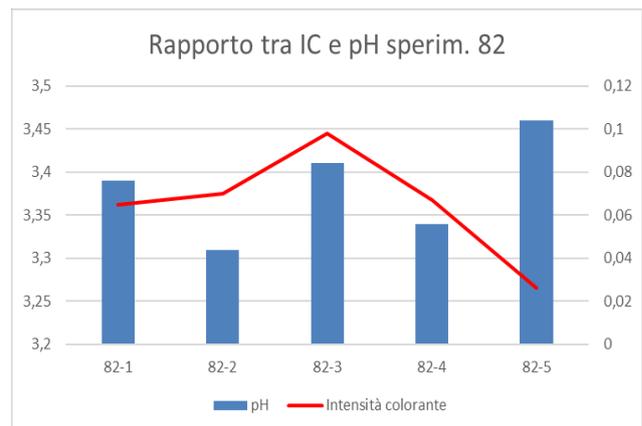
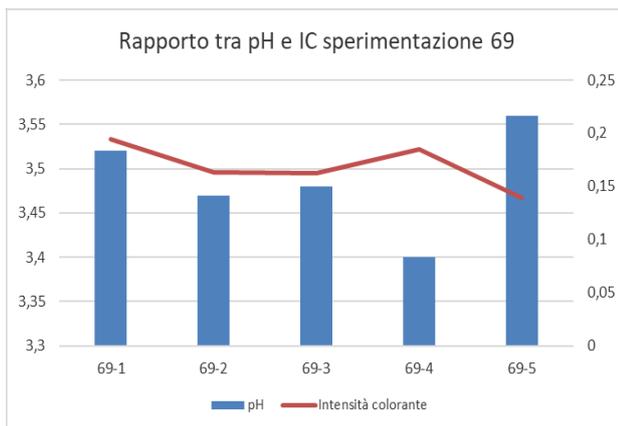


IMMAGINE CORRELAZIONE pH e IC: l'immagine evidenzia la differenza tra pH e intensità colorante

4.7 GLICEROLO

“*L. thermotolerans* ha dimostrato di aumentare il contenuto di glicerolo e 2-feniletanolo, essendo allo stesso tempo un basso produttore di acetaldeide” (11). Il glicerolo è un metabolita che contribuisce a migliorare le caratteristiche organolettiche del vino e le analisi sono state commissionate al laboratorio Océanie di Vallet (Francia).

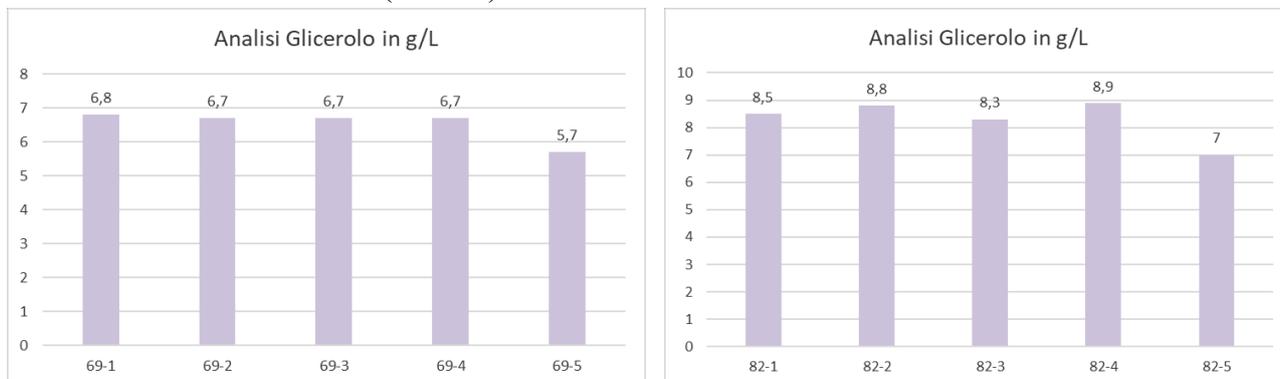


IMMAGINE GLICEROLO: sono stati analizzate le quantità di glicerolo nei diversi vini

I dati evidenziano una maggiore quantità di glicerolo nelle modalità dove è stata svolta una fermentazione sequenziale. Fondamentale diventa la differenza tra testimone e fermentazione sequenziale, infatti in tutti i casi la quantità di glicerolo è superiore. Certificando che l'utilizzo di *L. thermotolerans* permette una maggiore produzione di glicerolo, che migliora le caratteristiche di morbidezza, corpo e setosità in bocca. Nella sperimentazione 82 la quantità di glicerolo è superiore nelle modalità dove si è prodotto più acido lattico, mentre nella sperimentazione 69 non ci sono sostanziali differenze tra le modalità fermentate con *L. thermotolerans*, ma la modalità testimone presenta 1 g/L di glicerolo in meno rispetto ai vini dove è stata svolta una fermentazione sequenziale.

4.8 COMPOSIZIONE AROMATICA DEL VINO

L'aroma del vino ha un ruolo chiave nella degustazione e ne influenza la qualità. È uno dei parametri che guida il consumatore nella scelta del vino. Degustatori esperti riescono a valutare le caratteristiche del vino (vinificazione, pratiche enologiche, vitigno...) solo analizzandone l'aroma, percependo gli odori tramite il naso. Le caratteristiche aromatiche sono indispensabili per identificare eventuali contaminazioni batteriche e difetti del vino. Esistono una moltitudine di parametri che influenzano le caratteristiche del vino determinandone l'aroma, i tre principali fattori sono: vitigno, vinificazione (pratiche enologiche e lieviti) e invecchiamento. Gli aromi del vino vengono divisi in tre tipi: aromi primari, secondari e terziari. Innumerevoli sostanze aromatiche come tioli e terpeni sono già presenti nel mosto come precursori, ovvero come componenti non volatili. Solo durante il processo di vinificazione questi precursori vengono trasformati in aromi volatili grazie all'azione di enzimi o per azione chimica.

Nelle sperimentazioni 69 e 82 vogliamo valutare in particolare gli aromi secondari, ovvero gli aromi derivati dalle fermentazioni e quindi dall'azione dei microrganismi sul mosto. Diventa fondamentale scegliere il lievito giusto non solo in base al potere fermentativo, ma anche per la loro influenza sulle caratteristiche aromatiche del vino. Gli aromi fermentativi o secondari sono principalmente esteri che vengono prodotti durante la fase stazionaria della fermentazione alcolica, quando il ciclo di formazione degli acidi grassi rallenta, di conseguenza deve esserci un turnover di CoA. Gli esteri sono uno delle più importanti componenti aromatiche, la maggior parte di questi aromi sono prodotti nella fermentazione dall'attività enzimatica dei lieviti (esterasi, alcol acetiltransferasi e acil transferasi). Esistono due gruppi di esteri in base alla composizione: esteri acetici ed esteri etilici. "Queste molecole aromatiche sono date dalla combinazione di acidi organici (acidi grassi) e alcol" (12). Gli esteri acetici sono generalmente in maggior quantità rispetto a quelli etilici perché c'è una maggiore presenza di acido acetico durante la fase stazionaria rispetto agli acidi grassi a media catena. *L. thermotolerans* influenza la produzione di questi composti tramite il suo metabolismo, modificando parzialmente l'aroma del vino.

Le analisi per quantificare gli esteri sono state svolte il 12 ottobre da Nyseos a Montpellier, al fine di individuare le differenze tra le diverse modalità:

ANALYSE Fruitérs/Acétates														
		2-phényléthanol	acétate d'hexyle	acétate d'isoamyle	acétate de 2-phényléthyle	décanoate déthyle	hexanoate déthyle	octanoate d'éthyle	butanoate d'éthyle	2-hydroxypropanoate d'éthyle	3-hydroxybutanoate d'éthyle	2-méthylbutanoate d'éthyle	2-méthylpropanoate d'éthyle	2-hydroxysocaproate d'éthyle
	Date	2PHEN (µg/L)	HEAC (µg/L)	IAAC (µg/L)	2PHENAC (µg/L)	ETDEC (µg/L)	ETHEX (µg/L)	ETOCT (µg/L)	ETBU (µg/L)	2HPE (µg/L)	3HBE (µg/L)	2MBE (µg/L)	2MPPE (µg/L)	2HICE (µg/L)
2021-69-1	12-oct.-21	22935	454	12175	504	280	1348	1390	580	2155	470	nd	11	5
2021-69-2	12-oct.-21	16952	388	9259	288	302	1353	1476	637	3978	419	nd	12	5
2021-69-3	12-oct.-21	18691	323	8974	281	344	1403	1405	610	3165	537	nd	11	7
2021-69-4	12-oct.-21	18914	290	8063	251	311	1405	1420	639	11129	482	nd	11	6
2021-69-5	12-oct.-21	19880	730	12573	835	302	1080	1290	550	nd	420	nd	10	6

ANALYSE Fruitérs/Acétates														
		2-phényléthanol	acétate d'hexyle	acétate d'isoamyle	acétate de 2-phényléthyle	décanoate déthyle	hexanoate déthyle	octanoate d'éthyle	butanoate d'éthyle	2-hydroxypropanoate d'éthyle	3-hydroxybutanoate d'éthyle	2-méthylbutanoate d'éthyle	2-méthylpropanoate d'éthyle	2-hydroxysocaproate d'éthyle
	Date	2PHEN (µg/L)	HEAC (µg/L)	IAAC (µg/L)	2PHENAC (µg/L)	ETDEC (µg/L)	ETHEX (µg/L)	ETOCT (µg/L)	ETBU (µg/L)	2HPE (µg/L)	3HBE (µg/L)	2MBE (µg/L)	2MPPE (µg/L)	2HICE (µg/L)
2021-82-1	29-oct.-21	24023	25	544	108	nd	470	408	247	10560	177	nd	23	11
2021-82-2	29-oct.-21	18868	16	328	60	nd	443	410	244	15658	190	nd	24	11
2021-82-3	29-oct.-21	15274	22	390	67	177	569	566	396	2366	258	nd	22	13
2021-82-4	29-oct.-21	17979	15	284	45	nd	473	416	275	14622	164	nd	24	12
2021-82-5	29-oct.-21	39400	160	3059	823	270	810	711	302	nd	119	nd	24	9

IMMAGINE AROMI: analisi della quantità di esteri e acetati espressa in µg/L

In entrambe le sperimentazioni si nota la sostanziale differenza nelle quantità di etil lattato (2-hydroxypropanoate d'ethyle), che è assente nel testimone. Quindi correlabile con la elevata quantità di acido lattico presente nelle modalità dove è stata svolta la fermentazione sequenziale. Questo specifico estere è al di sotto della soglia di percezione (154000 µg/L), si forma solo in presenza di acido lattico e conferisce gradevoli note burrose, che però essendo sotto la soglia non vengono tendenzialmente percepite. Nella sperimentazione 69 si notano importanti differenze anche nelle quantità di esanoato di etile e ottanoato di etile, questi due esteri hanno una soglia di percezione di 200 µg/L e caratterizzano il vino con note fresche, fruttate e floreali, esaltando le note di albicocca, pesca e pera. Vengono particolarmente apprezzate dal consumatore, sono quindi desiderate e volute durante il processo di produzione e quindi, come si nota dalla tabella, le modalità dove è stato utilizzato *Lachancea thermotolerans* hanno una migliore intensità aromatica. Nella sperimentazione 82 la quantità di 3-idrossi butanoato di etile è maggiore in tutte le modalità dove è stato utilizzato il non-*Saccharomyces*, anche in questo caso però la soglia di percezione di questa molecola è superiore alla quantità presente nei vini (1800 µg/L), di conseguenza non verrà percepito nel vino.

La quantità di esteri totali varia al variare delle modalità, ma non esistono sostanziali differenze, la loro concentrazione è influenzata soprattutto da So delight che ha svolto la fermentazione alcolica, determinando la presenza di queste componenti aromatiche. Mentre *Lachancea thermotolerans* producendo un'elevata quantità di acido lattico ha favorito la specifica formazione di lattato di etile. Le differenze delle caratteristiche aromatiche non sono tendenzialmente importanti, permettendoci di produrre vini rosati con una maggiore acidità senza compromettere il bouquet floreale e fruttato che si desidera in un vino rosato. Infatti l'estere che ha una maggiore differenza con il testimone è proprio l'etil lattato che non essendo sopra la soglia di percezione non viene generalmente percepito.

4.9 DISCUSSIONE

La sperimentazione ha permesso di valutare le caratteristiche di *Lachancea thermotolerans*, lievito non-*Saccharomyces* capace di trasformare parte degli zuccheri fermentescibili in acido lattico. I vini prodotti con questo nuovo ceppo di lievito sono stati stoccati nella cantina che colleziona tutte le sperimentazioni svolte, al fine di valutarne le caratteristiche con i clienti.

Dal lavoro di tesi e dalle analisi effettuate è emerso che le vinificazioni sequenziali hanno permesso al lievito di esprimersi al meglio, senza competizione da parte di *S. cerevisiae*, permettendo un migliore processo metabolico dando così ottimi risultati. Infatti, abbiamo potuto notare la maggiore quantità di acido lattico in tutti i vini dove è stata eseguita la sperimentazione. I migliori ceppi fermentatori risultano essere il “lievito 1” e “lievito 3” che hanno portato a una maggiore quantità di acido lattico. In particolare il “lievito 1” ha prodotto 0,49 g/L nella modalità 69-1 e 0,84 g/L nella modalità 82-1, le modalità 69-2 e 82-2 hanno evidenziato 1,18-1,64 g/L di acido lattico; mentre il “lievito 3” ha prodotto 1,74 g/L e 1,34 g/L rispettivamente nelle sperimentazioni 69-4 e 82-4, mostrando importanti produzioni di acido lattico in entrambe le sperimentazioni. Importante è la differenza tra le modalità dove è stata eseguita una fermentazione sequenziale e le modalità “testimone” nelle quali è assente l’acido lattico. L’aumento di acidità totale e la diminuzione del pH, sono risultati tendenzialmente dipendenti dalla presenza di acido lattico e quindi dall’acidificazione biologica di *L. thermotolerans*. Il pH è un valore particolarmente importante, perché il repentino cambiamento climatico ne determinerà un incremento, proprio per questo motivo *L. thermotolerans* può diminuire i valori da 0,04 a 0,16 nella sperimentazione 69 e 0,05 a 0,15 nella sperimentazione 82. L’alcol è stato diminuito in valori che vanno dallo 0,03 a 0,18% alcol nella sperimentazione 69 e 0,04 a 0,25% alcol nella sperimentazione 82, sono valori interessanti ma non particolarmente soddisfacenti. Il livello alcolimetrico rimane elevato ed è destinato a subire un incremento nei prossimi anni, dato il continuo e non controllato cambiamento climatico, di conseguenza questi valori diventeranno presto insufficienti.

Le modalità 69-5 e 82-5 sono le vinificazioni testimone, ovvero dove è stata svolta una fermentazione alcolica classica, al fine di produrre un vino rosato di stampo provenzale. Sono state fondamentali perché ci hanno permesso di notare ed evidenziare le differenze con la tesi sperimentale. Questi vini non presentano acido lattico, data l’assenza di *L. thermotolerans*, oltre ad avere valori di pH più elevati e acidità totale più bassa. Anche il grado alcolico, seppur non di molto, risulta essere più alto rispetto alle modalità dove è stato utilizzato il lievito sperimentale.

Per quanto riguarda l’intensità colorante si possono notare delle differenze, che però andrebbero approfondite con ulteriori studi e sperimentazioni. Infatti, il mosto di Cinsaut (sperimentazione 82)

risultava ossidato già dopo la pressatura e non è stato possibile aggiungere solforosa per permettere lo sviluppo del non-*Saccharomyces*, dato che ne è poco resistente. Quindi abbiamo ottenuto un mosto ossidato con intensità coloranti molto basse, poco superiori ad un vino bianco, impedendo una valutazione dal punto di vista colorante. Al contrario la sperimentazione 69 era molto più colorata, dato dalle proprietà coloranti della Syrah. Grazie l'ausilio di coadiuvanti enologici per ridurre la quantità di polifenoli ossidati e sostanze ossidate si è riusciti ad ottenere una colorazione rosa tenue.

Un altro importante fattore da considerare è la quantità di glicerolo, metabolita particolarmente gradito dai consumatori perché conferisce morbidezza e setosità al vino. Tutte le modalità dove è stato inoculato *L. thermotolerans* presentano una maggiore quantità di glicerolo di almeno 1 g/L. Questa molecola viene prodotta per bilanciare l'equilibrio osmotico e per riossidare il NADH, di conseguenza i lieviti utilizzano questa via metabolica per ottenere le condizioni adeguate ad avviare il loro metabolismo. Questo suggerisce che il lievito sperimentato abbia una maggiore necessità di produzione di glicerolo tramite la fermentazione glicero-piruvica, rendendolo un mezzo per produrre vini più delicati e gradevoli.

Gli aromi di un vino ne determinano la qualità, infatti vengono analizzati minuziosamente dai critici al fine di individuare le diverse sfumature e dettagli. La maggiore presenza di etil lattato, evidenziata nei vini prodotti tramite la vinificazione sequenziale, contribuisce al bouquet aromatico del vino; ma non essendo sopra la soglia di percezione non viene riconosciuto o percepito. Di conseguenza il lievito sperimentale non influenza notevolmente le note aromatiche del vino, ma piuttosto le modifica parzialmente. Cambia la quantità di alcuni esteri nelle diverse modalità, in particolare nella sperimentazione 69 dove le quantità di esanoato di etile e ottanoato di etile sono maggiori nelle modalità dove è stato utilizzato *L. thermotolerans*, mentre minori nella sperimentazione 82.

Lachancea thermotolerans è un lievito con duplici impieghi e può rappresentare una soluzione enologica alle problematiche correlate al cambiamento climatico.

Sarebbe interessante eseguire altri studi e sperimentazioni riguardanti questo ceppo di lievito che offre differenti e più valide caratteristiche rispetto ad altri lieviti non-*Saccharomyces* impiegati a livello enologico. Un esempio dell'impiego di altri lieviti viene riportato in (13).

Date le poche sperimentazioni e la poca letteratura su questo ceppo, attualmente risultano più consigliabili altre strade per l'acidificazione dal punto di vista enologico. Vengono preferiti l'utilizzo di acidi di origine chimica, tagli con mosti più acidi, l'utilizzo di resine a scambio ionico ed elettrodialisi. Mentre per la diminuzione del tenore alcolico si consiglia: permettere un residuo zuccherino, eseguire tagli con mosti meno zuccherini o tramite la nanofiltrazione. Infine le pratiche

della gestione del verde e l'epoca di vendemmia risultano soluzioni più semplici, attuabili ed adattabili in tutti gli areali, senza eseguire importanti investimenti per l'acquisto di specifici macchinari.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno permesso di svolgere la sperimentazione e la tesi che ne è seguita. In particolare il professore Simone Vincenzi, mio relatore di tesi, che mi ha dato la possibilità di svolgere il tirocinio da SOFRALAB.

Je tiens à remercier l'œnologue de la Cave Expérimentale, Olivier Fonade, pour le précieux enseignement, les compétences, le savoir-faire transmises et la gentillesse de chaque jour.

Merci beaucoup Céline Sparrow, Chef R&D, pour la disponibilité de partager des données pour la thèse expérimentale et aussi toute l'équipe Sofralab.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha sempre sostenuto, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jones, G.V., 2007. *Climate Change: Observations, Projections and General Implications for Viticulture and Wine Production, Working Paper No. 7*
- (2) *Trattato di enologia 1*; P. Ribèrau-Gayon, D. Dubourieu, B. Donèche, A. Lonvaud
- (3) Benito, S. *Combined Use of Lachancea thermotolerans and Schizosaccharomyces pombe in Winemaking: A Review. Microorganisms* 2020, 8, 655
- (4) Osborne & Edwards, 2005; Boulton, Singleton, Bisson & Kunkee, 1999
- (5) *An Integrative View of the Role of Lachancea thermotolerans in Wine Technology*; Javier Vicente, Eva Navascués, Fernando Calderón, Antonio Santos, Domingo Marquina and Santiago Benito
- (6) *Lachancea thermotolerans Applications in Wine Technology* Antonio Morata, Iris Loira, Wendu Tesfaye, María Antonia Bañuelos Carmen González 1 and José Antonio Suárez Lepe
- (7) Mora et al., 1990; Kapsopoulou et al., 2005, 2007; Gobbi et al., 2013; Zara et al., 2014; Benito et al., 2015
- (8) Ciani and Maccarelli 1998; Romano et al. 2003
- (9) *Responses of Saccharomyces cerevisiae to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation* Catherine Tesnière & Claire Brice & Bruno Blondin
- (10) *An Integrative View of the Role of Lachancea thermotolerans in Wine Technology*; Javier Vicente, Eva Navascués, Fernando Calderón, Antonio Santos, Domingo Marquina and Santiago Benito
- (11) Ciani and Comitini 2010b; Ciani et al. 2006; Comitini et al. 2011; Cordero-Bueso et al. 2012; Kapsopoulou et al. 2006
- (12) Mina & Tsaltas, 2017; Ferreira, 2010
- (13) *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae* di Francesca Comitini a , Mirko Gobbi a , Paola Domizio b , Cristina Romani b,c , Livio Lencioni b , Ilaria Mannazzu d , Maurizio Ciani a

SITOGRAFIA

(I) <https://www.enelgreenpower.com/it/learning-hub/transizione-energetica/cambiamento-climatico-cause-conseguenze>

(II) https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2984_allegato.pdf

(III) <https://www.istat.it/it/archivio/244222>