

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN
VITICOLTURA ED ENOLOGIA

TITOLO DELLA TESI

Recenti sviluppi e innovazioni biotecnologiche applicate nel processo di produzione
dei vini Champagne e Spumanti

Tesi in
MICROBIOLOGIA ENOLOGICA

Relatore:

Chiar.mo Prof. Rosalba Lanciotti

Correlatore:

Dott. Lorenzo Siroli

Dott. Giacomo Braschi

Candidato: Balboni Nicolò

Matricola N° 873349

Anno Accademico 2021/2022
Sessione unica

“ Dedicata a tutte le persone che hanno sempre creduto al raggiungimento di questo obiettivo ”

Sommario

1. Introduzione	4
2. Obbiettivi generali.....	5
3. Produzione vino Champagne	5
3.1.1. Presa di spuma nel metodo champenoise	7
4. Produzione vino Spumante	12
4.1. Presa di spuma nel metodo charmat	13
5. Modalità inoculo lieviti nelle rifermentazioni	16
5.1. Autolisi lievito.....	19
6. Selezione di lieviti di interesse per il settore enologico con particolare riferimento ai processi di rifermentazione	22
6.1. Potere fermentativo e purezza fermentativa	24
6.2. Vigore fermentativo	24
6.3. Modalità sviluppo.....	25
6.4. Resistenza anidride solforosa (SO ₂).....	26
6.5. Produzione di anidride solforosa (SO ₂) e produzione di acido solfidrico (H ₂ S)	26
6.6. Capacità schiumogena	28
6.7. Carattere Flor	28
6.8. Carattere killer.....	29
6.9. Sviluppo a basse temperature.....	30
6.10. Sviluppo alte temperature.....	30
6.11. Ceppi auto litici.....	30
6.12. Caratteri di qualità	31
7. Approcci Biotecnologici Innovativi nella produzione di spumanti	32
8. Conclusioni	37
9. Bibliografia	39
10. Ringraziamenti.....	47

1. INTRODUZIONE

<< ed egli si presentò con una coppa d'oro colma e senza indugiare un istante vuoto il calice spumeggiante>>così la storia dei vini spumanti arriva a noi, con una citazione di Virgilio della metà del 70 Ac, ma per come sono conosciuti oggi, bisogna aspettare ancora qualche secolo. La storia degli spumanti parte nel sedicesimo secolo con l'introduzione nel mondo enologico, a seguito di una innovazione nella lavorazione del vetro delle prime bottiglie per spumanti, in grado di reggere la pressione; contemporaneamente si sviluppò l'uso di tappi in sughero, permettendo così di evitare la dispersione di CO₂.

Dai documenti storici risulta il merito dell'invenzione del primo vino spumante al mondo al monaco benedettino Dom Pierre Perignon invitato, dalla corte reale di Versailles, per realizzare e sviluppare nuovi metodi di realizzazione per questo nuovo tipo di vino. La zona in cui si iniziarono le prime produzioni di uva, ancora oggi una delle località a latitudine più estreme dove si coltivano uve in Europa, è situata a 150 km da Parigi ed è la regione dello Champagne.

Dom Pierre Perignon riuscì ad assolvere gli incarichi per la realizzazione di questi vini spumanti richiesti dalla corte reale grazie ad un'accurata selezione dei vitigni più consoni e alle tecniche da lui utilizzate. Con il passare dei secoli le tecniche si sono perfezionate, fino ad arrivare alla messa a punto del metodo conosciuto tutt'oggi: il metodo champenoise.

Lo champagne riuscì a conquistare negli anni sempre più notorietà mondiale, facendo sì che altri paesi leader vitivinicoli del vecchio continente, come Spagna, Italia e Germania iniziassero a sperimentare sul loro territorio la produzione di questi vini utilizzando e importando i vitigni, Francesi, ma anche quelli autoctoni e utilizzando le tecniche di coltivazione impiegate in Champagne.

Una volta raggiunte produzioni sempre più elevate a livello Europeo, si iniziarono a denominare tutti questi vini spumanti con il nome unico di champagne, ma successivamente alla Seconda guerra mondiale, la Francia rivendicò l'esclusività del nome alla zona natale di nascita di questo vino, appunto la Champagne. Fu grazie a questa rivendicazione che gli spumanti esterni alla Champagne ne giovarono acquistando dignità propria e un posto nel mercato del mondo spumantistico Europeo e successivamente mondiale, creando nuove appellazioni di origine come: Vini spumanti, Sparklingwines, Cava, Sekt, Espumante.

2. OBIETTIVI GENERALI

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di comparare, soprattutto da un punto di vista microbiologico, la produzione di vini spumante con metodo Champenoise e quella con il metodo charmat, descrivendo le caratteristiche, i processi di produzione di questi due metodi portando alla luce le differenze di metodo che si verificano nei processi di produzione. Successivamente sono stati descritti i caratteri e i criteri per la selezione di lieviti da utilizzare nel settore enologico con particolare riferimento ai processi di spumantizzazione. Infine, sono stati affrontati gli aspetti biotecnologici innovativi nel settore dei vini spumante.

3. PRODUZIONE VINO CHAMPAGNE

Lo Champagne è considerato a livello mondiale uno dei vini spumanti più rinomati. Prodotto secondo rigidi protocolli descritti dal disciplinare francese << l'appellation d'origine contrôlée >> (AOC), lo champagne è caratterizzato da qualità sensoriali uniche dovute alla lunga maturazione che avviene a contatto dei lieviti esausti a seguito della fermentazione.

Il processo tecnologico di produzione dello champagne, tuttora utilizzato, è basato sulle tecniche di vinificazione concepite allo scopo nel diciassettesimo secolo e consiste di due fasi: 1) produzione vino base; 2) presa di spuma (prise de mousse in francese).

La prima fase consiste nella produzione di un vino base, dalle specifiche caratteristiche tecniche, e dalla successiva seconda fermentazione detta presa di spuma, svolta direttamente all'interno della bottiglia che verrà messa successivamente al degorgement (sboccatura).

Il vino base nella vinificazione raggiunge una gradazione alcolica attorno agli 11% vol, poiché con la successiva presa di spuma, si avrà una piccola produzione di etanolo fino al raggiungimento di 13% vol. I vitigni maggiormente utilizzati per la produzione dei vini base champenoise sono lo Chardonnay, tipico vitigno internazionale a bacca bianca, il Pinot Nero, anche questo vitigni di grande uso a livello internazionale a bacca nera e infine il Pinot Meunier, vitigno meno impiegato dei tre, possiede anche questo vitigni bacche di colore nero. Essendo questi vini dotati di buona freschezza, per avere le condizioni migliori di equilibrio e longevità nel prodotto finale, risulta fondamentale l'acidità delle uve in ingresso nella cantina per la vinificazione. L'acidità spiccata delle uve viene ricercata in vigneto attraverso l'impiego di specifiche pratiche agronomiche che prevedono inoltre una vendemmia programmata ottimale e manuale: eseguendo la cernita manuale

dei grappoli, eliminando eventuali acini alterati o danneggiati da patogeni (evitando così problemi di qualità nei mosti), raccogliendo il vendemmiato in recipienti da 40-50 kg ben aerati e traforati al fine di evitare fenomeni di macerazione e precoci avvii di fermentazione che inficerebbero la qualità del prodotto.



Figura 1. Sintesi del processo di produzione del metodo classico.

Conclusa la pressatura delle uve, il mosto viene poi sottoposto prima di essere trasferito nei tini di fermentazione a processi di chiarifica. Il processo di chiarifica ha lo scopo di allontanare le fecce grossolane sospese senza alterare le caratteristiche chimico fisiche del mosto in particolare la componente azotata e la frazione proteica quest'ultima fondamentale per la tenuta della spuma. A seguito della solfitazione del mosto, la chiarifica viene effettuata per sedimentazione statica, decantazione con la possibilità di aggiungere enzimi pectinolitici (pectinasi) o di tannini. Quest'ultimi hanno lo scopo di favorire la flocculazione di aggregati proteici instabili che potrebbero portare alla instabilità del prodotto finale. A chiarifica ultimata, il mosto viene trasferito nei tini di fermentazione dove avverrà la fermentazione alcolica.

La fermentazione alcolica si esegue a temperature controllate e relativamente basse, 15-20 gradi, poi in base all'idea enologica del produttore cambia l'uso dei tini vinificatori. Questi possono essere usati sia in legno (controllo temperatura tramite cantine craie), sia in acciaio inossidabile, non facendo mai superare i 20° C alla massa in fermentazione tramite sistemi di controllo della temperatura. Nella produzione dei vini base dello Champagne (e degli spumanti) è importante l'uso di lieviti selezionati, anche se con il procedere degli anni si sta cercando di tornare ad utilizzare

lieviti indigeni per variegare le note olfattive e non standardizzare i prodotti. La specie maggiormente usata in enologia è *Saccharomyces cerevisiae* con caratteristiche tradizionali come il vigore fermentativo, purezza fermentativa, resistenza all'anidride solforosa (SO₂) e tolleranza all'alcol. A questi caratteri si aggiungono poi specifiche attività enzimatiche in grado di esaltare le qualità aromatiche di questi vini come l'auto-lisi cellulare e caratteristiche utili ai fini tecnologici il potere flocculante. Il potere flocculante consiste nella capacità del lievito di formare durante lo sviluppo e la fermentazione aggregati, flocculi, in modo da facilitare le operazioni di remuage e la sboccatura aumentando la velocità di sedimentazione. Tali caratteristiche verranno dettagliatamente discusse nei paragrafi successivi del presente elaborato.

La fermentazione alcolica si protrae, in condizioni normali fino al raggiungimento di un contenuto in zuccheri riducenti pari a 2g/L e di un titolo alcolometrico di circa 10-11% (alcol svolto).

Durante la fermentazione alcolica può essere svolta la fermentazione malolattica per ottenere la stabilità microbiologica ed evitare fermentazioni malolattiche non volute durante la presa di spuma o direttamente in bottiglia, effettuando l'eliminazione dell'acido malico (*Oenococcus Oeni* principale batterio che scompone l'acido malico in acido lattico e altri sottoprodotti).

Oltre all'eliminazione dell'acido malico e all'inibizione tramite l'utilizzo di piccole dosi di SO₂, vengono sempre più utilizzati metodi non invasivi dal punto di vista chimico come le microfiltrazioni ed enzimi come il lisozima, anche se ritenuto un allergene.

3.1.1. Presa di spuma nel metodo champenoise

Ultimata la fermentazione alcolica, il vino base destinato alla produzione dello Champagne viene preparato per la presa di spuma tramite il seguente processo.

La presa di spuma nel metodo champenoise parte dal vino base fermentato privo o semi privo di zuccheri residui in quanto esauriti nella prima fermentazione. Inoltre, il vino base essendo chiarificato e/o filtrato nelle fasi precedenti risulta privo di sedimenti.

Il primo passaggio consiste in un'aggiunta di zuccheri tale da sviluppare una pressione di anidride carbonica adeguata al vino, in questo caso di 6 atmosfere, semplificando per ogni atmosfera desiderata si richiedono 4g/L di zucchero.

L'aggiunta di zucchero in gergo tecnico viene chiamata liquer de tirage, in champagne ogni maison possiede la propria "ricetta" anche se generalmente è composta da acqua e zucchero. Una volta addizionata la liquer de tirage, si può procedere con modalità differenti a seconda della scelta aziendale. La presa di spuma, quindi, può essere avviata attraverso l'inoculo di lieviti selezionati

oppure utilizzando i residui di lieviti, presenti già dalla fermentazione alcolica, di un vino base non chiarificato e non filtrato.

Dopodiché si procede all'imbottigliamento con bottiglie resistenti alle alte pressioni, che si sviluppano durante il processo di rifermentazione. Vengono tappate con tappi di sughero a fungo e fissate con gabbiette metalliche oppure, per semplificare il procedimento, sono utilizzati tappi a corona. Successivamente alla tappatura avviene lo stoccaggio delle bottiglie in locali con temperature stabili, solitamente comprese fra i 12 e i 18°C, posizionandole orizzontalmente su appositi listelli di legno.

La seconda fermentazione alcolica, più lenta della prima a causa del livello di etanolo e della temperatura più bassa, impiega complessivamente diversi mesi per giungere al termine a differenza della prima che, in condizioni standard, impiega circa 10-14 giorni. Durante la fase della seconda fermentazione viene effettuata un'inversione di posizione delle bottiglie stoccate così da evitare il deposito dei lieviti in rifermentazione (coup de poignet).



Figura 2. Sedimento di lieviti in corso di formazione nella produzione di Champagne.

Una volta completata la seconda fermentazione, i lieviti presenti all'interno della bottiglia continuano ad affinare e maturare all'interno del vino decomponendosi attraverso il processo dell'autolisi.

Terminato il periodo di stoccaggio in base alla tipologia di vino, ad esempio in Champagne si ha un affinamento minimo di 3 anni da disciplinare, vi è la necessità di convogliare il deposito dei lieviti sul tappo della bottiglia per essere espulso; questo procedimento tradizionale viene effettuato

tramite le pupitres: cavalletti inclinati, caratterizzati da fori, nei quali sono riposte le bottiglie per effettuare il remuage.

Le bottiglie vengono quindi inserite all'interno delle pupitres, inizialmente in posizione orizzontale, fino a portarle in posizione verticale con il tappo rivolto verso il terreno.

Ciò avviene attraverso una serie di piccoli spostamenti circolari chiamati remuage giornalieri, andando così ad aumentare il grado di inclinazione ad ogni giro completato.

La durata del remuage è di circa 1 mese, a questo punto troviamo i lieviti depositati all'estremità del collo della bottiglia sul tappo.

Il metodo tradizionale per l'espulsione di questo deposito è denominato degorgement à la volée, in italiano sboccatura. Questo avviene attraverso l'estrazione delle bottiglie dalle pupitres, mantenendole nella stessa inclinazione; si procede poi con la stappatura e contemporaneamente con il raddrizzamento della bottiglia cercando così di ridurre al minimo la perdita di prodotto.

Per colmare il livello delle bottiglie appena sboccate si aggiunge la liquer d'expédition, uno sciroppo, la cui composizione dipende dalle scelte aziendali, ma di base è composto da vin de réserve, cognac, mosti parzialmente fermentati o addizionati di zucchero di canna. Questa operazione conclusiva risulta estremamente importante per il riempimento delle bottiglie, per il dosaggio zuccherino finale del metodo classico e per migliorare la qualità olfattiva del vino.

Nel corso degli anni sono stati applicati, grazie alle nuove tecnologie in campo enologico, sistemi per la semplificazione dei procedimenti dei tempi di lavoro e soprattutto della riduzione dei costi, essendo questo processo estremamente dispendioso.



Figura 3. Personale di cantina durante la fase di remuage manuale su pupitres.

Il dosaggio zuccherino, o *liquer de tirage*, è la parte aggiunta ai vini base privi di zucchero. Queste aggiunte di prodotti sono regolate da leggi ben definite. Infatti, sono ammesse dalla legge solamente le seguenti sostanze:

- Mosto di uve avente un titolo alcolometrico effettivo pari o inferiore a 1% v/v.
- Mosto di uve parzialmente fermentato avente titolo alcolometrico totale maggiore di 1% v/v ma inferiore ai 3/5 del suo titolo alcolometrico volumico totale, dipendente dal momento in cui viene fermata la fermentazione.
- Mosto di uve concentrato (MC) ottenuto tramite la disidratazione parziale del mosto tramite i metodi autorizzati. Il grado rifratto metrico minore è 50,9% contenente al massimo 1% v/v.
- Mosto di uve concentrato rettificato (MCR) ottenuto tramite la concentrazione attraverso due resine a scambio ionico venendo così spogliato dalle molecole. Deve possedere un grado rifratto metrico minimo di 61,7%, pH 5 e alcol inferiore a 1% v/v.
- Saccarosio e zucchero di canna in Italia sono ammessi solo in spumantizzazione e sotto stretto controllo degli uffici repressione frodi.

Il mantenimento di queste sostanze all' interno della cantina richiede un lavoro scrupoloso per evitare lo sviluppo indesiderato e deleterio di microrganismi ossidativi e fermentativi quali batteri, lieviti e muffe.

Uno degli accorgimenti apportato nel mondo del metodo Champenoise fu l'utilizzo della meccanizzazione del remuage. Questo procedimento meccanico ha sostituito l'antico metodo usato tradizionalmente, che richiedeva un alto numero di mano d'opera e costi elevati, riducendo la diffusione e aumentando il costo degli spumanti metodo classico.

Da qui si svilupparono i cosiddetti giri pallet, formati da cassoni in maglia di ferro impiegati già durante lo stoccaggio delle bottiglie e durante le lavorazioni successive, sostituendo così le cataste e soprattutto le pupitre.

Una volta collegati i cassoni all'apposita struttura, il macchinario tramite determinati programmi muoverà i cassoni modificandone l'inclinazione.

Queste macchine riescono a portare i lieviti in punta alla bottiglia in modo equivalente al remuage sulle pupitre fatto a mano, contribuendo così a limitare i costi e a rendere i processi più veloci.

Ultimate le operazioni per portare i lieviti in punta sia con il metodo tradizionale che con il metodo meccanizzato, si procede con il degorgement o sboccatura.



Figura 4. 1) (sinistra) Fase di sboccatura a lavoleè. 2) (in alto a destra) Fase di congelamento del sedimento di lieviti. 3) (In basso a destra) Fase di aggiunta della liquer d'expedition.

Le bottiglie ancora ad oggi sono sboccate in piccole quantità tramite il metodo tradizionale à la volèè, mentre nella maggior parte delle aziende, sempre per limitare i costi, si utilizza il degorgement à la glace. Questo procedimento consiste nell'inserimento del collo della bottiglia da sboccare in contenitori contenenti glicole fino al congelamento di questa parte; successivamente tramite l'aiuto di macchinari specifici si esegue la stappatura.

Una volta stappata la bottiglia si ha l'espulsione del tappo ghiacciato contenente il deposito di lieviti; espulsione dovuta alla sovrappressione presente in bottiglia e formatasi durante la presa di spuma. Completata la sboccatura viene rabboccato il livello mancante di vino perso con la liquer d'expedition.

La liquer d'expedition, o sciroppo di dosaggio, è l'ultima aggiunta che viene fatta alla bottiglia prima della messa in commercio. La sua composizione risulta complessa così da migliorare la qualità del vino caratterizzando la parte sensoriale. Ogni maison o produttore di spumanti custodisce il proprio segreto per la composizione di questo sciroppo, ma per legge è permesso l'uso di saccarosio, mosto d'uva, mosto d'uva parzialmente fermentato, MC, MCR, vino o miscele di questi prodotti anche miscelati con distillati (esclusi vini a denominazione).

4. PRODUZIONE VINO SPUMANTE

La produzione degli VSQ (vino spumante di qualità), si sviluppa in linea generale come nel metodo champenoise: piccole differenze si possono notare nelle rese di produzione, leggermente superiori alla media della Champagne. Tipicamente la produzione degli spumanti avviene attraverso il metodo Charmat ideato da Federico Martinotti nel 1895 e brevettato dal francese Eugène Charmat.

Come nel caso della produzione dello champagne a seguito della vendemmia le uve vengono trasportate il più celermente possibile nella cantina e sottoposte alle operazioni di pigiatura e chiarifica. Al termine di tali operazioni, per le quali valgono le medesime considerazioni precedentemente descritte, il mosto viene trasferito in tini d'acciaio ermetici (autoclave), inoculato con ceppi selezionati di *S.cerevisiae*, e fermentato alla temperatura di 15-20°C per un periodo di circa 20 gironi.

L'utilizzo di autoclavi permette di conservare l'anidride carbonica che viene generata durante la fermentazione alcolica, contrariamente da quanto accade nei processi di produzione del vino base champagne.



Figura 5. Sintesi del processo per la produzione del metodo Charmat.

Aspetto da non sottovalutare nella fermentazione in autoclave è l'uso di ceppi specifici per l'avvio della fermentazione, avendo vini più poveri da un punto di vista organolettico rispetto al metodo champenoise e masse molto più elevate è cruciale un inoculo ottimale, nell'ordine di $1,5 \times 10^6$ cellule di lievito per ml, in modo da permettere un avvio regolare e non troppo rapido causato da un eccessivo inoculo da parte del tecnico di cantina per una fermentazione completa e senza interruzioni. Altro punto fondamentale è soprattutto la scelta del ceppo di lievito secco attivato (LSA) corretto vista la vastità di proposte sul mercato odierno.

4.1.Presa di spuma nel metodo charmat

Ultimata la fermentazione del vino base spumante viene trasferito in una seconda autoclave attraverso un sistema isobarico.

Le rifermentazioni tramite il metodo Charmat o Martinotti vengono effettuate tramite i vini base ottenuti dalle vinificazioni precedenti e portate a compimento con la presa di spuma tramite le autoclavi: grandi vinificatori in acciaio in grado di resistere alle alte pressioni di CO_2 che si andranno a sviluppare durante la rifermentazione.

Il vino base viene dolcificato con circa 25g/L di zucchero raggiungendo così la pressione desiderata.

Successivamente l'autoclave viene portata a 18°C permettendo uno sviluppo immediato dei lieviti starter addizionati, selezionati tramite le caratteristiche ricercate, reidratati e fatti acclimatare in un serbatoio minore chiamato nutrice; addizionato poi all'autoclave, permettendo così un decorso corretto della rifermentazione terminandola in massimo 30 giorni.

Le condizioni che si sviluppano all'interno dell'autoclave non sono le migliori per lo sviluppo dei lieviti a causa del livello di etanolo presente, della temperatura non del tutto ottimale, ma soprattutto per il grande volume che possiede un'autoclave rispetto ad una bottiglia.

Una volta avviata la fermentazione in autoclave è mantenuta sotto controllo mediante l'utilizzo dei manometri preinstallati sulle autoclavi per la lettura dei livelli di pressione e tramite la determinazione degli zuccheri residui attraverso prelievi di campioni dai rubinetti, operazione impossibile da effettuare nei metodi classici. In queste rifermentazioni il fattore più importante da tener in considerazione è la temperatura: completando le rifermentazioni a 12-13°C si ottengono prodotti qualitativamente migliori, soprattutto per gli aromi in grado di sprigionarsi. Queste però risultano temperature basse per i ceppi di *S.cerevisiae* che hanno optimum più elevati, attorno ai 30-33°C.

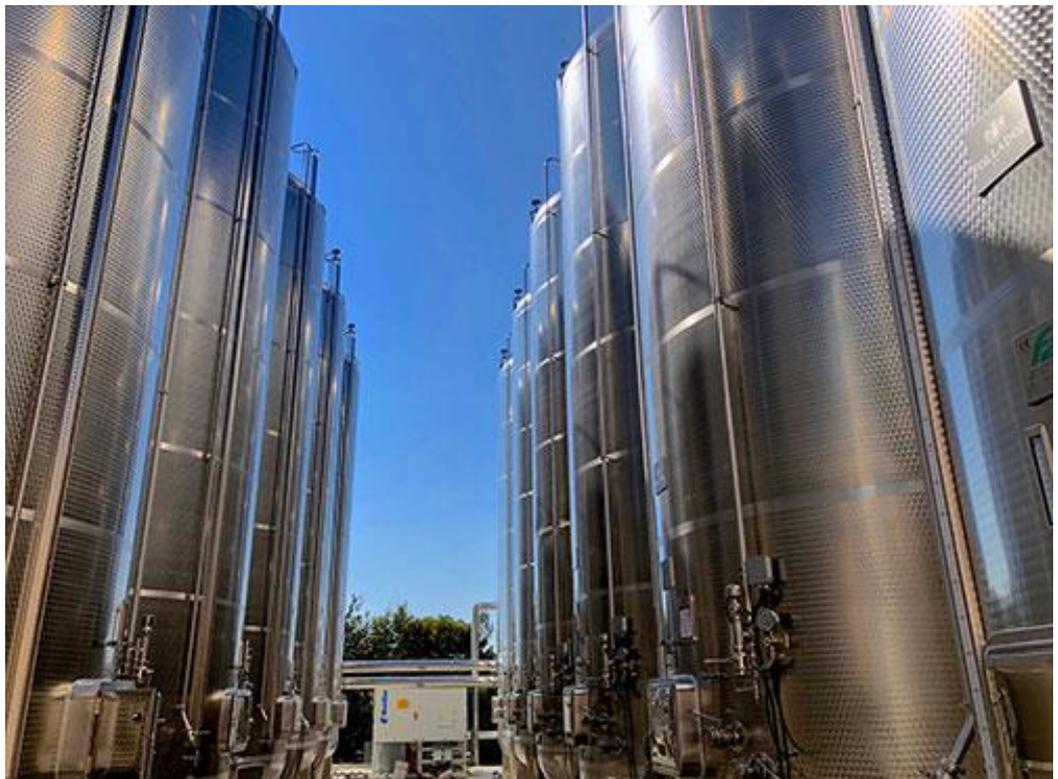


Figura 6. Autoclavi in cui avviene la presa di spuma.

Per ottenere la conclusione della rifermentazione a queste temperature basse si ha la necessità di utilizzare ceppi con un'elevata vigoria e preparare le precolture in modo accurato. Nel caso si riscontrino delle rifermentazioni stentate si può effettuare un aumento di temperatura dell'autoclave fino a 18°C.

Durante la rifermentazione è necessario l'utilizzo di un agitatore, presente nell'autoclave, che consenta l'agitazione del vino 1-2 volte al giorno, evitando il deposito prematuro della feccia. In base alla temperatura di rifermentazione dell'autoclave si avrà un tempo inferiore a temperature maggiori, circa 30 giorni a 18°C, e un tempo maggiore a temperature minori, circa 50 giorni a temperature comprese tra 12-13°C.

Una volta completata la rifermentazione si facilita il deposito della feccia per poterla separare successivamente dal vino, diminuendo la temperatura dell'autoclave fino al raggiungimento di 4°C. L'eliminazione delle fecce, nel metodo Charmat, avviene principalmente per travaso da un'autoclave all'altro, avendo la feccia depositata sul fondo del primo autoclave. Il primo procedimento da effettuare è la chiusura ermetica dell'autoclave poi si passa alla messa a pressione, uguale per entrambe le autoclavi, tramite gas inerti come l'azoto in modo da evitare la perdita di pressione generata dalla rifermentazione.

Una volta collegate si effettua il travaso compensando l'entrata di liquido nell'autoclave carica di azoto facendola sfiatare tramite una valvola, così facendo si ha uno spostamento di liquido senza utilizzo di pompe, evitando possibili maltrattamenti sul vino.

Le altre operazioni possibili oltre al travaso prevedono l'utilizzo di filtri a cartoni o di centrifughe. Terminata la rifermentazione e sfecciato il vino si dovrà stabilizzare, dal punto di vista fisico, chimico e microbiologico, il vino spumante. Uno dei primi procedimenti per la stabilizzazione tartarica è l'utilizzo del freddo per permettere all'acido tartarico di depositarsi; il tempo di trattamento dipende dalle modalità con cui è stato trattato il vino base. Questo procedimento viene effettuato attraverso il controllo delle temperature, se possibile, delle autoclavi tramite coibentazioni e canaline a glicole predisposte per il raffreddamento e il riscaldamento delle autoclavi.

La seguente stabilizzazione è la microfiltrazione, importante in quanto nel metodo Charmat la fermentazione viene arrestata tramite l'utilizzo del freddo per produrre il vino con il grado zuccherino desiderato; a differenza del metodo Champenoise dove al termine della rifermentazione viene aggiunto il grado di residuo zuccherino da esporre in etichetta.

Questa differenza fondamentale implica che i lieviti potenzialmente sono ancora in grado di fermentare e portare a completo svolgimento gli zuccheri residui, mentre nei metodi classici i lieviti sono disattivati dalla lunga permanenza in bottiglia e successivamente eliminati tramite la sboccatura.

Per questo motivo la filtrazione si esegue nei metodi Charmat.

Questo procedimento però può non comportare la completa eliminazione delle cellule dei lieviti, neanche tramite l'utilizzo di una piccola dose di SO₂ si ha l'inibizione dei lieviti rimasti. Per ottenere la completa stabilità del vino è necessario quindi l'utilizzo di micro-filtri in grado di assicurare la completa pulizia del vino da lieviti ed evitare possibili continui di fermentazione non desiderati. Ciò porta all'eliminazione non voluta di alcuni colloidali e polisaccaridi contribuendo all'impoverimento delle qualità del vino spumante. Risultando così come uno dei motivi per i quali gli spumanti metodo classico sono ritenuti qualitativamente migliori.

Terminata la fase di stabilizzazione microbiologica il vino spumante viene imbottigliato tramite l'utilizzo di apposite macchine imbottigliatrici isobariche che mantengono la stessa pressione dall'autoclave alla bottiglia finale, permettendo il mantenimento della CO₂ all'interno del vino.

5. MODALITÀ DI INOCULO DEI LIEVITI NELLE RIFERMENTAZIONI

La seconda fermentazione avviene dopo la prima fermentazione base del vino spumante in particolari condizioni. La prima di queste è che il mezzo da rifermentare, il vino base, possiede già un titolo alcolometrico volumico totale abbastanza elevato, raggiungendo in alcuni casi il 10% v/v; questo livello di etanolo elevato porta ai lieviti impiegati uno stress maggiore rispetto alla fermentazione alcolica.

La rifermentazione avviene anche sotto crescita costante della pressione, in quanto uno dei fattori portanti del processo. La pressurizzazione può arrivare fino ad un massimo di 6 atmosfere, ed essendo svolta in recipienti chiusi ermeticamente, non si ha dispersione nell'atmosfera di prodotti volatili. La solforosa si trova in forma combinata, quindi non è in grado di esercitare un'azione inibitoria nei confronti dei lieviti; i quali una volta completato il processo di rifermentazione si depositano sul fondo mentre la temperatura è mantenuta stazionaria evitando problemi di auto riscaldamento. La presenza iniziale di un'elevata quantità di etanolo nella seconda rifermentazione potrebbe risultare un ostacolo, ma esistono ceppi di *S.cerevisiae* in grado di tollerare 18% v/v di etanolo (vini di porto) quindi abili a terminare le rifermentazioni; problemi causati da sovrappressioni si verificano sulle cellule dei lieviti con pressioni superiori alle 9 atmosfere.

Il problema più ricorrente nelle rifermentazioni è il deposito sul fondo delle cellule di lievito in fermentazione, con conseguente difficoltà nel completamento della rifermentazione. Il deposito dei lieviti sul fondo della bottiglia o dell'autoclave è un effetto positivo per questo tipo di processo in quanto facilita la pulizia e l'illimpidimento dello spumante allontanando il sedimento senza perdita di pressione. La presa di spuma, infatti, si distingue in due metodi simili: il metodo classico o Champenoise e il metodo Martinotti o metodo Charmat.

La fase di inoculo dei lieviti starter selezionati nel metodo Champenoise è l'operazione che precede la messa in bottiglia ed è eseguita con l'intera massa da imbottigliare.

Poiché nel vino in fase di rifermentazione è quasi sempre presente una piccola carica di lieviti provenienti dalla fermentazione alcolica, è opportuno evitare qualsiasi competizione tra lieviti che pregiudicherebbe la buona riuscita della presa di spuma. Per questo motivo si inocula un carico minimo di 10000 cellule di lievito per ml, assicurandosi l'avvio immediato della rifermentazione e il suo completamento; anche se normalmente vengono utilizzate cariche di inoculo maggiorate di 10-100 volte così da evitare qualsiasi problema di rifermentazioni stentate.

Prima di essere aggiunti, i lieviti starter selezionati sono sotto forma disidratata; per questo motivo è necessaria la fase di reidratazione in una soluzione di acqua a 40°C leggermente dolcificata. Questa fase procede per alcune ore in volumi ridotti di soluzioni, successivamente viene inserita una piccola parte di vino base così da consentire l'acclimatamento alle condizioni del vino, questa fase risulta critica per la buona riuscita della rifermentazione

L'aggiunta dei lieviti reidratati avviene direttamente nel mezzo prima dell'imbottigliamento, solo in casi di microvinificazioni sperimentali questa avviene direttamente in bottiglia.

Una volta inoculato il lievito si procede all'imbottigliamento del vino addizionato con i lieviti così da permettere la rifermentazione.

I lieviti maggiormente utilizzati in spumantizzazione presentano il carattere di sviluppo delle cellule disperse: il carattere polverulento. Per facilitare la raccolta dei lieviti in punta durante la fase di remuage, vengono utilizzati ceppi di *S.cerevisiae* con caratteristiche flocculanti; durante il processo meccanizzato viene meno l'utilizzo di questo lievito.

La spumantizzazione tramite il metodo classico trova la sua peculiarità durante la fase di affinamento dei lieviti all'interno della bottiglia, migliorando e caratterizzando le qualità organolettiche ed olfattive dei vini prodotti secondo questo antico metodo. Il protagonista di questo processo è *S.cerevisiae*, in grado non solo di convertire gli zuccheri in alcol ma anche di produrre e modificare altri componenti secondari migliorando la qualità dei vini. Questi miglioramenti, che rimangono all'interno della bottiglia, possono essere di tipo fermentativo o post fermentativo.

I primi sviluppati durante la rifermentazione e i secondi invece, dovuti al rilascio di composti da cellule non più vitali.

Partendo dal vino base di titolo alcolometrico 10 %v/v e dolcificato al 2,5% quindi con 25g/L di zuccherosi ottiene uno spumante a 11,5 %v/v e 6 atmosfere di pressione, quindi si produce etanolo e CO₂, in seguito alla formazione di questi due composti si ha la produzione di circa 1g/L di glicerolo, fondamentale per aumentare la corposità di un vino.

Durante le fasi di rifermentazione i lieviti non hanno alcuna azione diretta sugli aromi del vino, anche se ceppi come quelli freddo fermentanti, ad esempio *S. avarum* riescono a produrre quantità importanti di 2 fenil-etanolo, aumentando il rapporto dei composti aromatici.

Aspetto da tenere controllato è la produzione di composti solforati, percettibili a bassissime quantità, *S. cerevisiae* possiede il carattere di produzione di H₂S nella quasi totalità dei ceppi. Nei casi di alta produzione di H₂S in rifermentazione si trova un retrogusto amaro, sgradevole o non sgradevole in base al prodotto finale desiderato.

Per i motivi sopracitati i lieviti di maggiore interesse in fase di rifermentazione generalmente devono avere le seguenti caratteristiche: appartenere al genere *S. cerevisiae*, possedere un carattere molto vigoroso, con qualità a livelli minimi medi e la produzione minima possibile di H₂S.

Con ceppi selezionati aventi queste caratteristiche si produrrà un vino spumante in grado di rispettare gli aromi varietali prodotti durante la fermentazione principale: la fermentazione alcolica. La preparazione e l'inoculo delle colture starter nel metodo Charmat parte dalla selezione del lievito commerciale disidratato, giudicato migliore per le caratteristiche ricercate.

Il procedimento di reidratazione antecedente all'inoculo del lievito alla massa da rifermentare si svolge tramite il riempimento di una bacinella da 300L con soluzione zuccherina al 3% e a 45°C così da permettere l'idratazione di LSA (lieviti secchi attivati). Passati 30 minuti dall'aggiunta dei lieviti si agita la sospensione e si raddoppia il volume della soluzione utilizzando vino base già dolcificato, così da permettere al lievito di adattarsi alle condizioni di stress che incontrerà una volta immesso nella massa da rifermentare. Una volta verificato il corretto avvio della rifermentazione nella bacinella si provvede a trasferire la soluzione fermentante in un'autoclave di piccole dimensioni denominato nutrice, così facendo si facilita l'inoculo della coltura starter reidratata nelle autoclavi.



Figura 7. Nutrice utilizzata per l'inoculo dei LSA nelle autoclavi.

5.1. Autolisi dei lieviti

Ultimata la rifermentazione, con la conseguente terminazione degli zuccheri le cellule di lievito entrano in uno stato di quiescenza. La durata di questo stato dormiente dipende da fattori quali la temperatura, l'idratazione, la disidratazione che, in base al livello, portano ad una morte più o meno rapida. La causa di morte delle cellule dei lieviti è dovuta all'effetto dell'autolisi che compiono, determinando l'auto sterilizzazione del prodotto e creando l'affinamento tipico del metodo classico. L'autolisi è il processo nel quale le cellule di lievito subiscono l'idrolisi di biopolimeri per azione di enzimi idrolitici, che liberano nel vino composti citoplasmatici, e della parete cellulare. I lieviti una volta entrati in stato dormiente continuano a consumare le proprie riserve interne come il glicogeno fino a terminare questi composti di scorta; la cellula inizia la sua degenerazione, scomponendosi avviandoci così l'autolisi.

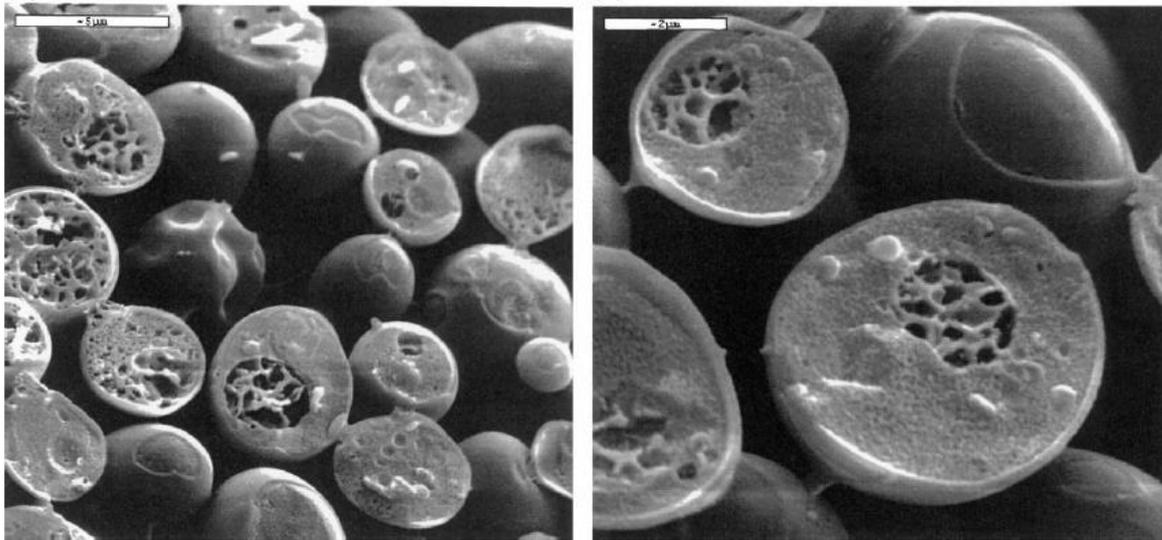


Figura 8. Immagini LTSEM di lieviti in fase di autolisi

L'autolisi avviene attraverso i seguenti passaggi:

1. disorganizzazione della membrana e la liberazione di enzimi idrolitici.
2. disattivazione di specifici inibitori citoplasmatici di enzimi o loro attivazione.
3. accumulo di prodotti d'idrolisi delle macromolecole intracellulari.
4. liberazione nell' ambiente extracellulare dei prodotti dell'idrolisi quando i pori della parete ne permetteranno il passaggio.
5. degradazione esterna dell'autolisato.

Le condizioni in cui avviene il processo dell'autolisi negli spumanti sono il pH 3-3,5, la bassa temperatura, l'alta pressione, e concentrazioni di etanolo superiori al 10-11% v/v.

Per questi motivi risulta un processo che richiede molto tempo. La parete cellulare in questo processo ha un ruolo marginale nelle prime fasi in quanto, con il procedere del processo intervengono enzimi quali esoenzoglucanasi che degradano il glucano parietale solubilizzando le mannoproteine.

Tabella 1) Principali composti rilasciati durante l'autolisi

Composti	mg/L	Effetti
Proteine, peptidi e amminoacidi	Proteine: 5-10 Peptidi: <10 Amminoacidi: 0,8	Aroma e qualità della spuma
Mannoproteine	Circa 200	Flocculazione. qualità della spuma e stabilità del vino
Lipidi e derivati	Circa 10	Qualità della spuma e aroma
Acidi nucleici	Circa 1,76	Aroma
Composti volatili	Circa 700	Aroma

I composti presenti nella tabella risultano essere i principali composti rilasciati durante l'autolisi, nello specifico le proteine vengono idrolizzate in composti di minor peso molecolare tramite l'enzima maggiormente coinvolto nel processo: la proteasi.

I principali prodotti rilasciati durante l'autolisi sono i peptidi idrolizzati a basso peso molecolare, che ricoprono il ruolo di tensioattivi.

La concentrazione degli amminoacidi decresce durante la rifermentazione, nonostante ciò, nell'affinamento ricoprono un ruolo fondamentale in quanto precursori dei composti aromatici.

I polisaccaridi presenti nel vino spumante provengono dall'uva e dal lievito, l'arabinosio è il più presente, seguito dal mannosio e dal glucosio. Sono le attività enzimatiche della proteasi e della glucanasi a provocare la degradazione della parete cellulare dei lieviti con liberazione delle mannoproteine. La concentrazione di queste ultime è variabile in base al ceppo di lievito, alla temperatura e alla durata dell'affinamento. I composti secondari e prodotti in minor quantità durante l'autolisi sono i lipidi e gli acidi nucleici, importanti da un punto di vista aromatico.

Alcuni esempi di lipidi rilasciati sono esteri di steroli, steroli, acidi grassi liberi, mentre per quanto riguarda gli acidi nucleici la loro quantità diminuisce durante l'invecchiamento, DNA e RNA vengono degradati e si generano nucleotidi come guanosina monofosfato, importanti agenti aromatici. Durante l'autolisi parecchi composti volatili, come alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni e pirazine, sono liberati. Da questi composti derivano infatti i tre tipi di aroma presenti nei vini: gli aromi primari detti aromi varietali specifici per la varietà di uva utilizzata, gli aromi secondari ovvero quelli sviluppati durante la fermentazione alcolica e infine i terziari ovvero gli aromi che si originano durante l'invecchiamento del vino per trasformazione dei composti prodotti durante la fermentazione. Si ha infatti una correlazione fra il tempo di permanenza del vino sulle fecce di lievito e il potenziale aromatico del vino spumante.

6. SELEZIONE DI LIEVITI DI INTERESSE PER IL SETTORE ENOLOGICO CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AI PROCESSI DI RIFERMENTAZIONE

Saccharomyces cerevisiae è fin dall'antichità il presunto responsabile di tutte le fermentazioni. Con lo sviluppo della tassonomia a inizio '900 venne scoperto che esistevano altri lieviti caratterizzanti la specie, sempre in grado di fermentare. Alcuni di queste nuove specie come *S.uvarum*, *S.pastorianus*, *S.carlsbergensis*, *S.bayanus*, vengono utilizzati tutt'oggi sia nell'industria enologica ma anche in altre industrie alimentari come in quella birraia. Dalla scoperta di questa differenziazione all'interno del genere *Saccharomyces* vennero scoperte nuove caratteristiche di specie, come per esempio *S.bayanus* più vigoroso di *S.cerevisiae* e particolarmente adatto alla produzione di spumanti. Come lieviti selezionati o culture starter si intende la biomassa microbica che guiderà il processo fermentativo, fornendo vantaggi come la maggiore rapidità, diminuendo il rischio di fermentazioni stentate e/o arresti, ma producendo un prodotto standardizzato con caratteristiche sensoriali e organolettiche costanti. Questa standardizzazione tramite l'utilizzo di colture starter ha aiutato le vinificazioni nelle grandi aziende permettendo una continuità di prodotto, mentre gioca a sfavore di chi vuole improntare il proprio vino su caratteristiche organolettiche ma soprattutto sensoriali affini al proprio territorio di produzione territoriale. La microbiologia enologica e il suo sviluppo a partire dalla fine del '800 ha determinato un enorme miglioramento sulla qualità dei vini e sull'uso adeguato dei lieviti sia *Saccharomyces* che non *Saccharomyces*. Negli anni '60 in Italia si iniziò a produrre industrialmente i lieviti selezionati per poi commercializzarli, ma fu solo 4 anni dopo che si riuscì ad espandere in maniera significativa questo processo quando venne introdotto sul mercato sotto forma di LSA, lievito secco attivato.

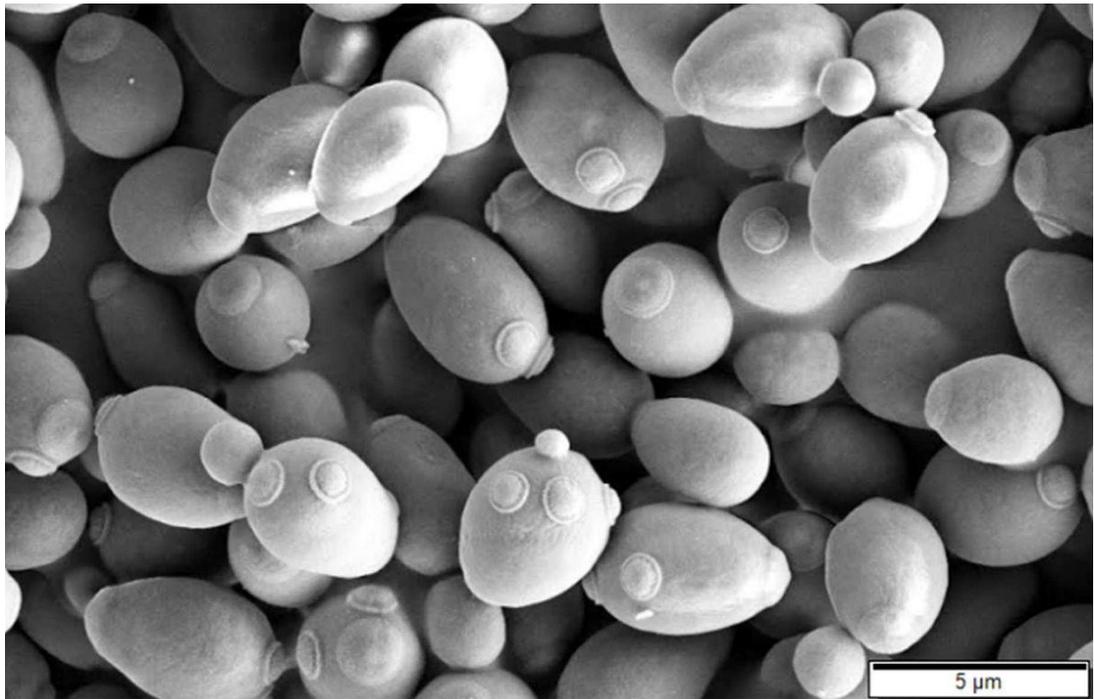


Figura 9. Immagine a microscopio elettronico di *S.cerevisiae*.

Le principali caratteristiche generali dei lieviti *S.cerevisiae* sono: l'aspetto a forma globosa ed ellittica, presentano una moltiplicazione per gemmazione multipolare e non necessitano di grosse esigenze nutritive utilizzando composti azotati come ammoniaca e peptidi, presenti nel mosto. Le cellule di *S.cerevisiae* si sviluppano bene a pH compresi fra 3 e 6 essendo principalmente acidofili, allo stesso tempo presentano una buona alcol tolleranza, riuscendo così a fermentare in ambienti difficili come i mosti in fermentazione, con concentrazioni sempre più elevate di etanolo. Oltre alle due caratteristiche appena descritte i lieviti *S.cerevisiae* presentano in generale un'elevata vitalità.

Tabella 2. Principali caratteri tecnologici di *S. cerevisiae* (L.Castellari, V.Tini, F.Coloretti, C.Zambonelli, Vini spumanti e frizzanti, 2013, p.92).

Principali caratteri tecnologici <i>S.cerevisiae</i>
Vigore fermentativo
Resistenza e produzione di SO ₂ e produzione di H ₂ S
Potere fermentativo e purezza fermentativa
Alcol tolleranza
Basse temperature
Alte temperature
Carattere killer

6.1. *Potere fermentativo e purezza fermentativa*

Con il termine potere fermentativo si identifica la quantità massima di etanolo formabile per fermentazione di un mezzo contenente zuccheri; quindi, la massima quantità di zucchero in grado di essere fermentata da parte del ceppo di lievito (*S.cerevisiae*) in considerazione questo carattere è in rapporto stretto con l'alcol tolleranza che verrà descritto successivamente. L'intensità con cui si manifesta il carattere è strettamente legata alla membrana citoplasmatica della cellula di lievito, regolando appunto il rapporto tra cellula e mezzo nutritivo. Questo blocco avviene tramite il trasporto dell'etanolo verso l'esterno che subisce un rallentamento, accumulandosi dentro la cellula e bloccando l'attività cellulare del lievito.

Il potere fermentativo varia tra 7% v/v e 18% v/v. La maggior parte dei lieviti del genere *S.cerevisiae* ha potere fermentativo superiore a 14% v/v, questo permette di capire come questi lieviti riescano a completare la fermentazione, a differenza dei lieviti non *Saccharomyces* che, con potere fermentativo minore di 14% v/v, hanno attività fermentativa qualora presenti solo nelle fasi iniziali della fermentazione alcolica. Nel caso delle vinificazioni di vini spumanti è importante la scelta di un lievito con elevato potere fermentativo, non tanto per la necessità di fermentare mosti con elevati gradi zuccherini e un elevato quantitativo di etanolo, ma per il loro sviluppo durante la fase di rifermentazione. Per purezza fermentativa si intende il rapporto tra l'acidità volatile e l'etanolo alla fine del processo fermentativo.

Nel caso specifico delle rifermentazioni è assolutamente fondamentale che la produzione di acidità volatile sia a basso livello.

6.2. *Vigore fermentativo*

Il vigore fermentativo consiste nella prontezza di un ceppo di dare inizio alla fermentazione e con quanta rapidità riesce a portarla a termine, il vigore fermentativo viene espresso in grammi di CO₂ che si sviluppano in 2-3 giorni successivi all'avvio di fermentazione. Ogni ceppo di *S.cerevisiae*, così come altre specie, si moltiplica con diversi tempi di generazione, al fine di non avere mai uno sviluppo sincronizzato e un'inibizione a vicenda. Altro fattore diversificativo del vigore fermentativo è dato dalla diversa grandezza delle cellule, indicatore di cinetiche di fermentazione diverse.

Il vigore fermentativo è un carattere indipendente, non può essere confrontato con il metabolismo delle cellule di lievito o con relazioni enzimatiche. Per capire quale dei due abbia più vigore si confrontano due ceppi di lievito. *S.cerevisiae* ha un alto grado di variabilità ma non

necessariamente in rapporto con il potere fermentativo, essendo due caratteri indipendenti, il carattere fermentativo viene trovato già in natura a livelli accettabili.

Nel caso delle rifermentazioni, un elevato vigore fermentativo assicura una fermentazione rapida anche a basse temperature, per cui rappresenta un importante carattere di selezione

6.3. Modalità di sviluppo

Nell'industria enologica, come in altre industrie, *S.cerevisiae* si sviluppa in mezzi liquidi, anche se le modalità di sviluppo sono in funzione delle caratteristiche delle cellule. Queste differenti modalità di sviluppo vengono in aiuto in alcuni processi tecnologici come la spumantizzazione agevolandone le operazioni.

La prima modalità di sviluppo è a cellule disperse o polverulento, la cellula madre, post gemmazione, si divide formando cellule figlie che si disperdono nel mezzo provocando torbidità di tipo polverulento, con decantazione lenta sul fondo nel caso di agitazione della massa. Questo carattere è il più presente nella maggioranza dei ceppi di *S.cerevisiae*.

La seconda modalità di sviluppo è a catene di cellule, una volta completata la gemmazione, le cellule figlie non si distaccano dalla cellula madre ma restano attaccate, con mezzo statico si forma un velo sul fondo del recipiente. In caso di agitazione del mezzo, può frammentarsi il velo sul fondo del recipiente senza mai più ricostituirsi. Questo carattere si riscontra difficilmente in *S.cerevisiae*.

La terza modalità di sviluppo è la flocculazione, ultimata la gemmazione, le cellule si separano ma successivamente si attaccano fra di loro formando grumi e aggregati compatti che si depositano rapidamente. Sotto agitazione si risolleivano dal deposito fiocchi tornando in sospensione nel mezzo e riunendosi nuovamente. Il motivo per cui i ceppi flocculanti si uniscono è dovuto alla presenza di proteine di superficie che formano ponti cellula-cellula attraverso ioni Ca^{++} .

In caso di rifermentazioni, sono più adatti i ceppi a sviluppo polverulento in quanto sono più vigorosi ed hanno cellule che si risospendono uniformemente nel liquido.

La flocculazione è un carattere di grande importanza, soprattutto per la spumantizzazione in bottiglia, facilitando la rimozione del deposito nelle rifermentazioni. Questo carattere è ereditario e stabile ma si manifesta con diversa entità da ceppo a ceppo, meno dell'1% di *S.cerevisiae* presenta questo carattere nel modo più intenso.

6.4. Resistenza alla anidride solforosa (SO_2)

La resistenza all'anidride solforosa da parte dei lieviti selezionati, soprattutto *S.cerevisiae*, è fondamentale in quanto durante la fermentazione alcolica lo stesso lievito produce solfiti.

L'anidride solforosa svolge tra i tanti ruoli quello da antisettico nei mosti, agendo con molta reattività e combinandosi con molti costituenti del mosto e all'interno delle cellule legandosi a composti fondamentali. L'anidride solforosa attiva sulle cellule è la frazione indissociata, presente in minor quantità nel mezzo, tanto che la sua intensità di azione è legata al pH del mosto, tanto questo valore è basso tanto più alta sarà la sua azione.

Durante una fermentazione, con una presenza di 100mg/L di SO_2 e pH 3, si ha circa che il 30% dei ceppi di *S.cerevisiae* origina una fermentazione e riesce a completarla senza risentire della presenza di anidride solforosa, essendo resistente fino a certi livelli. Questa resistenza è dovuta principalmente a due fattori: il primo dipende dalla composizione della membrana citoplasmatica, non consentendone l'ingresso, così da avere, al termine della fermentazione, la stessa quantità aggiunta.

Il secondo fattore è la presenza all'interno delle cellule di quantità elevate di composti, come il glutatione, che vanno a neutralizzare l'azione dell' SO_2 . Al termine del processo fermentativo si ritroverà una quantità minore dell' SO_2 aggiunta.

Per queste ragioni, nel caso delle rifermentazioni la resistenza all' SO_2 non è un carattere necessario.

6.5. Produzione di anidride solforosa (SO_2) e di acido solfidrico (H_2S)

I solfiti prodotti dai lieviti non derivano tutti da un unico meccanismo biochimico come la ridotta funzionalità della solfito reduttasi, ma anche dalla più veloce riduzione dei solfati.

S.cerevisiae ha la caratteristica comune di produrre SO_2 per riduzione dei solfati, mentre non sono conosciuti ceppi privi di questa capacità. Nella maggior parte dei ceppi utilizzati in campo enologico, la produzione di SO_2 è inferiore a 10 mg/L oppure compresa tra 10-20 mg/L mentre, in alcuni ceppi si riscontra questo carattere in maniera decisamente eccessiva, arrivando a produzioni fino a 200-300 mg/L, decisamente oltre i limiti consentiti dalla legge.

I ceppi produttori idrogeno solfato, lo producono per difetto di un enzima, la solfito reduttasi, accumulando e rilasciando il solfito in quantità maggiori, attorno ai 50 mg/L.

Questo carattere produttivo di anidride solforosa è presente in tutti i mezzi fermentescibili, tra cui il mosto, per questo motivo qualsiasi bevanda naturale, anche se non è stato aggiunto, presenta tracce di solfito, tracce in base al ceppo e al grado di produzione che presenta.

Per questo motivo la legge permette di indicare in etichetta solo per contenuti minori ai 10 mg/L esenzione dai solfiti, questo perché minime tracce saranno sempre prodotte e presenti nel mosto. mentre durante le fasi di produzione la solforosa biologica si somma alla già presente, aggiunta per procedimenti enologici, come la stabilizzazione; quindi la solforosa biologica si va a sommare alla già presente avendo le stesse azioni. Durante le fasi di FA tumultuosa, una parte svolge e passa in atmosfera, così da lasciare un contenuto minore a quella impiegata. La produzione di idrogeno solforato deriva come prodotto finale della biosintesi della metionina. L'idrogeno solforato si forma solitamente in quantità superiori rispetto al normale fabbisogno cellulare e la parte eccedente viene rilasciata. Risulta quindi normale il rilascio e la produzione di H₂S durante la fermentazione *S.cerevisiae*. La produzione di idrogeno solforato ad opera di *S.cerevisiae* varia sotto il profilo qualitativo e quantitativo in funzione del ceppo considerato. Alcuni ceppi ne producono piccolissime quantità; pochi microgrammi per litro mentre in altri casi, la produzione è molto maggiore arrivando a 4-5mg/L. Il carattere di produzione di idrogeno solforato è stabile, ma influenzato dal mezzo nutritivo arrivando a produzioni elevate in mezzi nutritivi molto ricchi di zuccheri, con quantità superiori i 300 g/L come in alcuni mosti.

La produzione di altissime quantità di idrogeno solforato, durante la fermentazione dei mosti, non appartiene solamente alla presenza del carattere specifico nei ceppi di *S.cerevisiae*, ma alla riduzione dello zolfo elementare, presente nel mosto come residuo dei trattamenti. Lo zolfo crea sentori sgradevoli all'olfatto ma senza compromettere la qualità del vino, perché essendo insolubile in acqua l'idrogeno solforato si dissolve totalmente. Durante la biosintesi degli amminoacidi solforati, i ceppi di *S.cerevisiae* con carattere spiccato alla produzione di H₂S producono altri composti come marcaptani e disolfuri, solubili in acqua, che rilasciano sentori sgradevoli nel mosto in fermentazione. Nel genere *S.cerevisiae* risultano piccolissime quantità di ceppi privi del carattere; quindi, non presentano la capacità di formare idrogeno solforato.

Questo carattere non esiste in questi ceppi a causa di un difetto genetico: l'enzima solfito reductasi non viene sintetizzato. Mancando questo enzima non avviene la riduzione dei solfiti a idrogeno solforato, mentre nel caso della presenza dell'enzima con efficienza difettosa, la produzione di idrogeno solforato è appena sufficiente al fabbisogno cellulare del lievito producendo grosse quantità di solfiti. Il carattere di produzione di H₂S è un carattere stabile, di origine ereditaria e di fondamentale importanza nell'enologia moderna, essendo usati ceppi con questa prerogativa, si riescono a produrre vini a vantaggio della qualità senza formazione di composti solforati.

Parlando specificatamente di rifermentazioni, L'SO₂ che si forma in rifermentazione è generalmente poca; tuttavia, essa si aggiunge senza perdite a quella preesistente nel vino. Inoltre, occorre tenere conto che molti ceppi ottimi per la rifermentazione sono alti produttori di SO₂.

Circa la produzione di idrogeno solforato, La presenza di idrogeno solforato nel corso della rifermentazione non è mai stata osservata.

6.6.Capacità schiumogena

Il potere schiumogeno si manifesta sia nei ceppi flocculanti, che nei polverulenti, ed è legato alla idrofobicità di membrana. Per effetto del perlage (bollicine dei vini) le cellule di lievito vengono trasportate sulla superficie dei vasi vinari dove aderiscono tra loro per effetto delle interazioni idrofobiche delle interazioni idrofobiche delle strutture di membrana e parete cellulare. Conseguenza di questo fenomeno è la comparsa nella schiuma persistente e caratterizzata da una colorazione bruna.

La capacità schiumogena è un carattere ereditario, stabile e molto frequente nel genere *S.cerevisiae*,soprattutto nei ceppi con sviluppo polverulento. La capacità di formazione di schiume alte e persistenti, si può presentare in ogni substrato di fermentazione. Questo fenomeno non essendo legato alla composizione del mezzo, comporta svantaggi nelle fermentazioni di grandi volumi creando il traboccamento delle vasche se non è stato lasciato abbastanza spazio di testa.

Questo carattere assume un valore importantissimo durante i processi di spumantizzazione in autoclave, portando le cellule dei ceppi schiumogeni al galleggiamento, originando sospensioni più stabili rispetto ad altri ceppi. Ciò conferisce un maggior vigore fermentativo causato dalla miglior distribuzione nel mezzo liquido delle cellule di lievito. Queste schiume alte e persistenti, presenti solo durante la fermentazione dei mosti con le relative cellule dei lieviti non pregiudicano, una volta resi limpidi e privati delle cellule di lievito (chiarificati), la persistenza della schiuma nel vino, in quanto normale.

6.7.Carattere flor

Il carattere flor, anche se non rilevante a fini spumantistici, appartiene ad alcuni ceppi di *S.cerevisiae* polverulenti. Portata a termine la fermentazione, hanno la tendenza di portarsi sulla superficie del mezzo fermentato galleggiando.

Una volta formatosi il cosiddetto velo (flor) a contatto con l'aria, il metabolismo di questi lieviti comincia a sviluppare tramite una via metabolica ossidativa l'etanolo formatosi nella fermentazione alcolica appena conclusa modificando la composizione del vino. Viene soprattutto modificando l'aspetto sensoriale rendendolo particolare e gradevole.

Il carattere flor risulta non essere un interessante carattere nella spumantizzazione perché a differenza della capacità schiumogena, lo strato di lieviti che si forma sulla superficie del mezzo

ossidando il vino e riducendo la quantità di etanolo, pregiudicando una minor qualità del prodotto finale.

6.8. Carattere killer

Il carattere killer è legato alla produzione ceppo dipendente di una tossina killer in grado di inibire selettivamente la crescita e sviluppo dei ceppi ad essa sensibili. Il carattere killer è riscontrato soprattutto nel genere *S.cerevisiae*, ma anche in altri generi come *Pichia*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*.

- Killer (K), questi ceppi sono produttori della tossina killer, ma ne sono immuni;
- Sensibile (S), non producono la tossina killer, ma sono ad essa sensibili;
- Neutro (N), non producono e non sono sensibili alla tossina killer;
- Killer sensibile (K-S), producono la tossina killer e sono sensibili ad altre tossine killer prodotte da specie o ceppi differenti.

Le tossine di *S.cerevisiae* sono letali ai ceppi della stessa specie, mentre le tossine prodotte da lieviti killer non *Saccharomyces*, sono tossiche ad un ampio numero di lieviti.

Alcune di queste tossine agiscono alterando la permeabilità della membrana oppure inibendo la sintesi di DNA. Nel campo enologico questo fattore è utilizzato per dominare fermentazioni. Inoculando ad inizio fermentazione lieviti starter killer, aiuta l'eliminazione di lieviti indesiderati migliorando la qualità dei vini. Le tossine killer non risentono dell'etanolo o della presenza di SO₂, ma sono molto sensibili a valori di pH bassi. Tali proteine presentano un optimum compreso tra 4,6 - 4,8. L'attività killer può essere rimossa dai vini mediante le operazioni di stabilizzazione proteica e chiarificazione, effettuata con bentonite, oppure tramite i tannini che, reagendo complessandosi con la tossina riescono a diminuirne la concentrazione.

Infine, la perdita del fattore può avvenire per carenze nutritive come l'azoto o eccessivi sbalzi termici.

La capacità di eliminazione di altri lieviti da parte di lieviti killer dipende dalla proporzione iniziale tra lieviti killer e lieviti sensibili nel mosto sotto esame. In ultimo, non è ancora chiaro se popolazioni indigene di lieviti killer possano ritardare o arrestare la fermentazione.

6.9. *Sviluppo a basse temperature*

I lieviti vengono definiti mesofili, appartenendo alla categoria di microorganismi con optimum di temperatura tra i 20° e i 40° C, indicando come temperatura ottimale la massima velocità di moltiplicazione nel minor tempo possibile, mentre a temperature minori o maggiori di quelle indicate le cellule cessano di moltiplicarsi entrando in quiescenza. *S.cerevisiae* ha optimum a 32°-33°C, la minima intorno a circa 2°C, non superando mai di massima i 40°C.

In fermentazioni effettuate a temperature elevate, si ha una maggiore vitalità delle cellule ma anche una morte più rapida, rischiando di bloccare fermentazioni non ancora del tutto terminate e lasciare nel mezzo un grado zuccherino non voluto. A temperature comprese dai 5° ai 12°C le fermentazioni hanno un inizio ritardato e nella maggior parte dei casi non completano la fermentazione. Per questo si considera come temperatura bassa in enologia, per sviluppare una fermentazione completa i 18°C, fino a un massimo di 24°C, rincorrendo così a un solo prolungamento della fermentazione ma nessun arresto, provocando ottime fermentazioni equilibrate. In campo enologico si usano ceppi dotati di alta energia fermentativa se si vogliono effettuare fermentazioni a livelli di temperatura più estremi, 12°-18°C, mentre per temperature più alte, sopra i 24°C si preferisce usare lieviti termo tolleranti.

6.10. *Sviluppo ad alte temperature*

I ceppi termo tolleranti fermentano bene anche a temperature più elevate rispetto agli altri lieviti *S.cerevisiae* raggiungendo temperature fino a 36° con massima vitalità, per poi arrivare a vitalità decrescente fino ad un massimo di 42°C. Subiscono un'inibizione sotto i 10°C mentre a temperature inferiori ai 30°C subiscono dei rallentamenti.

Una particolarità dei ceppi termo tolleranti è la produzione elevata di glicerolo, circa 10g ogni 100ml di etanolo. Sviluppano spore con limitata capacità di germinazione. Questi ceppi termo tolleranti possiedono carattere di basso vigore a temperature ordinarie in cantina, questo implica la loro esclusione durante le fermentazioni dei mosti standard e nelle rifermentazioni, mentre sono utilizzati in fermentazioni spontanee e non di grosse masse di vini, soprattutto rossi con temperature che superano i 30°-35°C.

6.11. *Ceppi autolitici*

Come ceppi Autolitici (o Autolisogeni), si intendono quei ceppi in grado di effettuare autolisi cellulare al termine della fermentazione alcolica. L'autolisi è un parametro fondamentale per migliorare le proprietà organolettiche e sensoriali dei vini, anche a basse temperature (fino a 6°C).

L'autolisi è spesso accompagnata dalla produzione da parte del ceppo di isobutanolo durante la fermentazione. Questo carattere è fondamentale nel processo della spumantizzazione in bottiglia, sia per il metodo Champenoise che per il metodo Charmat, in quanto l'autolisi contribuisce al miglioramento qualitativo e al carattere tipico di questa tipologia di vini rifermentati.

6.12. *Caratteri di qualità*

Come caratteri di qualità nel mondo enologico e microbiologico, si intende qualsiasi caratteristica che influisce positivamente o negativamente sulla qualità dei vini. Queste qualità si presentano tramite composti secondari della fermentazione o derivanti da modificazioni di costituenti dei mosti.

Il primo di questi caratteri è la produzione di glicerolo e acido succinico. Il glicerolo è presente nei vini in quantità comprese fra 4 e 10 g/L, creando rilevante qualità sul prodotto finale, alte concentrazioni sono importanti nell' invecchiamento dei vini rossi, aumentando la corposità e la morbidezza, aumentando la sensazione di aroma maturo, mentre non è gradita una concentrazione più elevata di glicerolo nei vini bianchi, dovendo conservare la freschezza. Il glicerolo è il terzo componente principale della fermentazione dopo etanolo e CO₂.

Ceppi di *S.cerevisiae* ne producono quantità comprese tra 3 e 6 g ogni 100ml di etanolo, mentre i ceppi termotolleranti , ne producono quantità superiori, fino a 10g. la produzione di etanolo influenza sia l'entità della produzione del glicerolo che la qualità del vino. Infine, la produzione dell'acido succinico è strettamente collegata a quella del glicerolo, raggiungendo quantità comprese fra 0,4 e 0,6 g/L.

Il secondo carattere di qualità è la produzione di acido acetico, detto anche purezza fermentativa, questo carattere dipende da quanto un ceppo di lievito durante la fermentazione produce acido acetico. La produzione di acido acetico ad opera di *S.cerevisiae* è un carattere ceppo dipendente e generalmente la sua produzione varia tra 0,1 e 1 g ogni 100ml di etanolo prodotto. Nella maggior parte dei casi la purezza fermentativa dei ceppi impiegati ad uso enologico si attesta tra 0,25 – 0,35 g/L, valori molto ben al di sotto dei limiti di legge e pari 1,08 g/L di acido acetico nei vini bianchi e rosati, mentre 1,2 g/L per i vini rossi.

Il terzo carattere di qualità è la produzione di aldeide acetica (acetaldeide), sempre presente nei vini in quantità differenti, da pochi milligrammi a oltre 70 mg/L, la quale gioca un ruolo negativo sulla qualità dei vini, per questo si cerca di averne la minor produzione possibile. *S.cerevisiae* possiede il carattere per la produzione di acetaldeide, è di difficile controllo, poiché la sua presenza è fortemente legata alla presenza di anidride solforosa, creando così una forte affinità.

Il quarto e ultimo carattere di qualità è la produzione di alcoli superiori, principalmente di n-propanolo, isobutanolo, alcoli amilico ed isoamilico, prodotti tutti nel corso della fermentazione alcolica. La concentrazione massima di questi alcoli superiori varia da un minimo di 100 mg/L ad un massimo di 500 mg/L, rendendo questi composti impercettibile all'olfatto umano fino al non superamento della soglia percettibile e quindi influenzando poco la qualità sensoriale del vino. La produzione di n-propanolo dipende dal ceppo utilizzato raggiungendo concentrazioni fra 10 e 30 mg/L, mentre raggiungono concentrazioni maggiori, superando anche i 100 mg/L i ceppi di *S.cerevisiae* non produttori H₂S. L'isobutanolo deriva sia dalla natura del ceppo sia da precursori presenti nel mosto, mentre alcoli amilico ed isoamilico provengono da composti precursori nel mosto e sono poco influenzati dal tipo di ceppo di lievito utilizzato.

7. APPROCCI BIOTECNOLOGICI INNOVATIVI NELLA PRODUZIONE DI SPUMANTI

Tra i differenti approcci biotecnologici perseguibili, di particolare interesse per i processi di spumantizzazione al fine di migliorare la qualità dei vini, vi sono la selezione di ceppi di lievito idonei ai processi di rifermentazione, i processi di immobilizzazione delle cellule e l'utilizzo di trattamenti enzimatici. Se da un lato, infatti, il processo di produzione del vino base è consolidato il processo di rifermentazione è un campo per lo sviluppo di approcci biotecnologici innovativi, che da un lato permettano di velocizzare tale fenomeno dall'altro di facilitare le operazioni tecnologiche che lo caratterizzano.

Selezione di ceppi di lievito idonei ai processi di rifermentazione.

Per quanto concerne la selezione dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* come starter di rifermentazione, questi devono da un lato esaltare le caratteristiche peculiari degli stessi vini, dall'altro di sopravvivere alle avverse condizioni che si vengono a creare durante la rifermentazione. Le caratteristiche, del vino base unitamente alle condizioni tecnologiche di processo rappresentano un ostacolo ai processi metabolici delle cellule di lievito. Tra le caratteristiche del vino base che maggiormente influenzano la crescita vi sono l'alto tenore di etanolo (circa 10% v/v), bassi valori di pH e la scarsità di nutrienti, mentre tra le caratteristiche tecnologiche la temperatura di rifermentazione rappresenta il principale ostacolo. Per questa ragione negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata nella selezione da un lato di ceppi di *S. cerevisiae* che fossero in grado di sviluppare compatibilmente con le sopracitate caratteristiche del vino base, e

dall'altro che possedessero caratteri genetici e fenotipici di interesse nel processo in particolare l'autolisi e il potere flocculante.

L'attitudine flocculante descrive la capacità delle cellule di lievito di aggregarsi formando flocculi che possono essere facilmente eliminati al termine del processo fermentativo e facilitare in questo modo le operazioni di chiarifica (Bidan, Feuillat, & Moulin, 1986; Bartrà, 1995). Lo sviluppo flocculento è un carattere frequente nei ceppi di *S. cerevisiae*, mentre meno frequente nei ceppi di *Saccharomyces uvarum* (Suzzi, Romano, & Zambonelli, 1984; Castellari et al., 1994). Tale tratto è legato alla presenza di una serie di geni di flocculazione denominati *FLO* il cui prodotto genico è rappresentato dalle proteine di adesione flocculine che mediano l'interazione cellula in *S. cerevisiae* portando alla formazione di aggregati pluricellulari (Van Mulders et al. 2009). La formazione di questi aggregati facilita la sedimentazione del lievito nelle bidule facilitando in questo modo le operazioni di chiarifica.

Le flocculine agiscono nel provocare la flocculazione attraverso due meccanismi distinti e complementari: interazione idrofobica proteina-proteina; interazione proteina-oligosaccaridi.

In quest'ultima interazione il legame cellula-cellula viene mediato dalla interazione di domini lecitina-like che caratterizzano le flocculine con specifici residui oligosaccaridici che presenti negli strati più esterni delle membrane e pareti delle cellule di lievito (Van Mulders et al. 2009).

Il secondo carattere di selezione considerato nella ricerca di ceppi idonei ai processi di rifermentazione è l'attitudine autolitica. Con l'autolisi le cellule di lievito vanno incontro a processi di rottura cellulare con conseguente rilascio nel vino di precursori di aroma e non solo, che impattano direttamente nella definizione nel definire le caratteristiche organolettiche e d'aroma del prodotto finale (Martínez-Rodríguez, Polo, & Carrascosa, 2001; Martínez-Rodríguez, Carrascosa, & Polo, 2001). I processi di autolisi, tuttavia avvengono con cinetiche estremamente lente ed iniziano solo nel momento in cui tutti gli zuccheri e i nutrienti sono stati consumati dalle cellule di lievito. Il processo può infatti richiedere da alcune settimane, fino a diversi mesi. I fenomeni autolitici consistono nella degradazione del citoplasma e degli organelli del vacuolo, il processo viene indotto nelle cellule di *S. cerevisiae* quando si verificano carenze nutrizionali. L'induzione dell'autofagia coinvolge vescicole a doppia membrana denominate autofagosomi che sequestrano porzioni del citoplasma. La membrana dell'autofagosoma e quella del vacuolo si fondono liberando all'interno del vacuolo il contenuto dell'autofagosoma che viene poi attaccato da enzimi idrolitici.

I prodotti di questa degradazione vengono riutilizzati dalla cellula, pertanto l'autofagia sembra migliorare le proprietà autolitiche dei ceppi enologici.

Durante il processo autolitico vengono rilasciati numerosi composti associati alla degradazione autolitica di diverse strutture cellulari quali:

- Composti ammoniacali degradazione proteolitica delle proteine e amminoacidi;
- Polisaccaridi degradazione delle mannoproteine;
- Lipidi e composti derivati degradazione di acidi grassi, esteri, chetoni e aldeidi;
- Basi azotate degradazione degli acidi nucleici;

La degradazione della frazione proteica e il rilascio di peptidi e amminoacidi si ripercuote direttamente proprietà schiumogene del prodotto finale e sul profilo aromatico. Sebbene infatti la frazione proteica risulti minoritaria nella composizione del vino attraverso i processi autolitici questi sono responsabili della così definita corposità del prodotto finale migliorando la ritenzione di composti d'aroma volatili e contribuendo positivamente alla stabilità della schiuma. (Brissonnet&Maujean, 1991; Luguera et al., 1998)

Le basi molecolari della degradazione proteica durante i fenomeni autolitici non è tuttavia stata ancora compresa appieno anche uno degli effettori più rilevanti è la proteasi A endoproteasi prodotta da *S. cerevisiae*. Alexandre et al. (2001), ha evidenziato infatti come questo enzima fosse responsabile per oltre il 60% dell'azoto rilasciato nel vino a seguito della autolisi.

Per quanto concerne la frazione polisaccaridica, durante i processi autolitici la degradazione delle strutture di parete determina un rilascio di macromolecole ad alto contenuto di mannosio (43%) e di glucosio (31%) le mannoproteine. Le mannoproteine sono una classe di proteine di membrana glicosilate caratterizzate da un alto contenuto in mannosio che contribuiscono positivamente alla formazione del perlage nei vini spumate.

Sebbene i lipidi durante l'autolisi vengano rilasciati a partire dalle membrane cellulari solo in piccole quantità, il loro impatto sulle proprietà aromatiche dei vini è estremamente importante. La degradazione lipidica operata dalle lipasi, infatti, determina un rilascio nel vino di acidi grassi liberi, esteri e aldeidi (Charpentier and Feuillat, 1993; Martínez-Rodríguez and Pueyo, 2009). Gli effetti della degradazione lipidica possono essere contrastanti, infatti come evidenziato da Gallart, López-Tamames, Suberbiola, and Buxaderas (2002), un aumento della concentrazione di acidi grassi C8, C18 e C10 causa effetti negativi sulla formazione e stabilità della schiuma, viceversa l'aumento degli esteri etilici degli acidi grassi a corta catena (C6, C8 e C10) si ripercuote positivamente sulle note sensoriali del prodotto finale e sulla struttura della schiuma.

Anche la concentrazione di acidi nucleici viene modificata durante l'affinamento a seguito dei processi autolitici. Tale degradazione, porta ad un incremento dei nucleotidi e dei nucleosidi liberi. Evidenze anche se non del tutto confermate suggeriscono come un aumento della presenza di questi

composti possa fungere da segnale extracellulare inducendo nelle cellule di lievito una accelerazione dei fenomeni di lisi (Zhao and Fleet (2005).

Allo scopo di ottenere ceppi con spiccate attitudini autolitiche, Gonzalez, Martínez-Rodríguez, and Carrascosa (2003), hanno utilizzato con successo la radiazione UV per l'ottenimento di ceppi di *S. cerevisiae* mutanti termosensibili. Questi ceppi infatti presentavano alterazioni alle strutture di membrana, nelle cinetiche di crescita risultanti in un'accelerazione dei processi autolitici a fine fermentazione in sistemi modello Gonzalez, Martínez-Rodríguez, and Carrascosa (2003).

Oltre alle sopracitate strategie mutageniche, una accelerazione dei processi autolitici è stata ottenuta con successo attraverso l'impiego delle alte pressioni di omogenizzazione. Patrignani et al., 2013 ha evidenziato come un pretrattamento del liquer de tirage alla pressione di 90 MPa ha indotto una accelerazione dei processi autolici a carico di *S. cerevisiae* e *S. bayanus* in processi di rifermentazione portando inoltre ad una diversificazione olfattiva dei vini spumanti.

Impiego di lieviti immobilizzati nei processi di rifermentazione

L'immobilizzazione delle cellule di lievito consiste nella inclusione di cellule vitali di lievito all'interno di capsule polimeriche porose, che consentano lo scambio di nutrienti con l'ambiente senza permettere alle cellule di lievito in esse contenute di fuoriuscire.

In campo enologico e nella fattispecie nel processo di rifermentazione dei vini spumante l'utilizzo di queste capsule permetterebbe l'affinamento in bottiglia dei vini base, preservandone la limpidezza e permettendo un facile recupero del lievito (Zambonelli, 2006b).

I supporti polimerici per l'immobilizzazione delle cellule di lievito devono soddisfare diversi requisiti: devono essere sicuri per la salute umana, non devono alterare le proprietà organolettiche del prodotto finale (non devono cedere al vino composti d'aroma o precursori), non devono degradarsi e resistere al tenore alcolico del prodotto finale e alle basse temperature di rifermentazione.

Le strategie di immobilizzazione di cellule vive di lievito per la rifermentazione vede l'impiego più frequente di carragenani, agar e alginati di calcio come matrici di inclusione. Colagrande et al., 1994 ha dimostrato come sfere di alginato di calcio potessero essere efficacemente impiegate per immobilizzare cellule di *S. cerevisiae* al fine di permettere un facile recupero della biomassa al termine della fermentazione alcolica anche nell'ottica di un riciclo della biomassa dello stesso lievito (Colagrande et al., 1994).

Diviès, Cachon, Cavin, and Prévost (1994), hanno dimostrato come l'impiego di cellule di *S. cerevisiae* immobilizzate nei processi di rifermentazione faciliti le operazioni di remuage, senza impatti significativi sulla qualità del prodotto finale sebbene le cellule immobilizzate presentassero attività metaboliche differenti rispetto alle cellule di *S. cerevisiae* non immobilizzate. L'immobilizzazione delle cellule di lievito infatti può provocare delle alterazioni metaboliche legate, ad esempio, da un minore scambio di nutrienti con l'ambiente circostante (Scheper et al., 2000).

Trattamenti enzimatici

Il processo di produzione del vino indipendentemente dal prodotto finale è un processo biotecnologico che coinvolge una molteplicità di enzimi prodotti dalla attività metabolica dell'agente fermentate tipicamente *S. cerevisiae*.

L'aggiunzione di enzimi durante le fasi della vinificazione può permettere la risoluzione di fermentazioni problematiche legate ad una insufficiente attività o produzione di enzimi endogeni.

L'attività enzimatica dei lieviti è infatti fortemente influenzata dalle condizioni ambientali del mosto (elevato tenore alcolico, bassi valori di pH alto contenuto in polifenoli) e che si ripercuotono direttamente sul metabolismo cellulare.

Le preparazioni enzimatiche da aggiungere ai vini vengono generalmente ottenute mediante processi biotecnologici fermentativi che vedono l'impiego di ceppi selezionati di colture fungine come *A. niger*, *T. hanzianum*, colture batteriche quali *L. fermentum* questa ultima utilizzata ad esempio per la produzione di lisozima.

L'utilizzo di tali composti è tuttavia sottoposto a normativa come descritto dai regolamenti 1493/1999 e 423/2008.

Nella produzione dei vini spumanti interessante è l'impiego di beta-glucanasi e pectinasi che vengono utilizzate con lo scopo di facilitare e velocizzare i processi autolitici durante l'invecchiamento e affinamento sulle fecce.

Questi enzimi hanno infatti lo scopo di agire direttamente sui polisaccaridi aumentando considerevolmente la concentrazione di saccardi liberi sia nei vini bianchi, che nei vini rossi Pellerin & Tessarolo, 2001; Trione & Martínez, 2001. Le beta-glucanasi, durante il processo di autolisi facilitano la disgregazione delle strutture di parete e membrana delle cellule di *S. cerevisiae*.

Le Beta-glucanasi mediano la rottura dei legami beta-O-glicosidici determinando il rilascio a partire dai glucani di glucosio e oligosaccaridi. Come conseguenza la parete cellulare delle cellule perde in rigidità e le mannoproteine, importanti per la formazione del perlage e nei fenomeni di flocculazione vengono rilasciate (Palomero et al. (2007).

8. CONCLUSIONI

Questo elaborato si è focalizzato sullo studio delle principali differenze, soprattutto da un punto di vista microbiologico, nella produzione di vini spumante con metodo Champenoise e quella con il metodo charmat, descrivendo le caratteristiche, i processi di produzione di questi due metodi portando alla luce le differenze principali che si verificano nei processi di produzione.

La produzione di vini spumante è un processo molto delicato, che richiede esperienza e lunghi tempi di produzione. Nel corso degli anni, i ricercatori in tutto il mondo hanno lavorato intensamente per comprendere e migliorare questa tecnologia di vinificazione, per ridurre i costi e migliorare la qualità.

Se infatti da un lato il processo per la produzione del vino base è consolidato e ben noto, i processi di rifermentazione presentano interessanti spunti di innovazione di carattere biotecnologico per la ricerca di ceppi che consentano di esaltare le qualità del prodotto finale.

Nello specifico la ricerca negli ultimi anni si è concentrata nella ricerca e nella comprensione dei processi autolitici dei lieviti al fine di velocizzarli e nei meccanismi alla base dei fenomeni di adesione cellula-cellula che conferiscono all'agente fermentante il carattere flocculento.

Diverse strategie come la mutagenesi UV indotta, oppure l'applicazione di stress meccanici alle cellule di lievito mediante alta pressione di omogenizzazione, si sono rivelate interessanti allo scopo di ottenere da un lato ceppi mutanti con marcata attitudine autolitica, dall'altro accelerare il processo litico in colture starter dalle comprovate caratteristiche enologiche.

Nonostante gli sforzi tuttavia, il meccanismo molecolare alla base dell'induzione dell'autolisi nelle cellule lievito durante l'invecchiamento del vino, la cinetica dell'attività della glucanasi e il meccanismo di rilascio di nucleotidi, nucleosidi e lipidi a seguito della autolisi non è ancora stato del tutto chiarito.

Per quanto concerne il carattere flocculento la comprensione della struttura e composizione chimica degli effettori molecolari, le proteine denominate flocculine ha fornito le basi per la creazione di nuove strategie allo scopo di aumentare tale carattere. L'inclusione delle cellule dello starter all'interno di matrici polimeriche ne sono un esempio. L'utilizzo di matrici di inclusione come l'alginato di calcio permette di creare uno starter di fermentazione dotato sia di capacità di fermentare e dall'altro lato di sedimentare velocemente facilitando notevolmente le operazioni di chiarificazione. Nonostante i notevoli sforzi della ricerca in questo settore diversi aspetti devono ancora essere compresi appieno. Tra questi si annoverano il rapporto tra autofagia e autolisi dei lieviti durante l'affinamento in bottiglia, così come la comprensione delle dinamiche di immobilizzazione cellulare in sistemi reali allo scopo di comprendere come l'inclusione delle cellule influenzi anche l'autolisi. Infine, i progressi e le innovazioni biotecnologiche introdotte dovranno necessariamente essere correlati delle opportune analisi sensoriali in modo da verificare che le innovazioni introdotte siano alla altezza delle caratteristiche sensoriali e qualitative che questi vini di altissima qualità devono possedere.

9. BIBLIOGRAFIA

- ALCAIDE-HIDALGO J.M., PUEYO E., POLO M. C., MARTINEZ-RODRIGUEZ A.J. (2007) – Bioactive peptides released from *Saccharomyces cerevisiae* under accelerated autolysis in a wine model system. *J.Food Sci.*, 72(7), 276.
- ALEXANDRE H., GUILLOUX-BENATIER M. (2006) – Yeast autolysis in sparkling wine: a review. *Aust.J.Grape Wine Res.*, 12(2), 119.
- ALEXANDRE, H., & GUILLOUX-BENATIER, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 119–127.
- ALEXANDRE, H., HEINTZ, D., CHASSAGNE, D., GUILLOUX-BENATIER, M., CHARPENTIER, C., & FEUILLAT, M. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 235–240.
- BABAYAN T.L., BEZERNIKOV M.G., LATOV V.K., BELIKOV VM., BELATSEVA E.M., TITOVA E.F (1981) – induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. *Curr.Microbiol.*, 5,163.
- BABAYAN, T. L., & BEZRUKOV, M. G. (1985). Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnologica*, 2,129–136.
- BAUER F.F., GOVENDER P., BESTER M.C (2010) – Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88:31-39
- BELY M., STOECKLE P., MASNEUF-POMAREDE I., DUBOURDIEU D. (2008) – Impact of mixed *Torulaspordelbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 122: 312-320.
- BENITO ´A, CADERO´ N.F., BENITO, S. (2019). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation* 2019, 5:54.
- BERTOLINI L., ZAMBONELLI C., GIUDICI P., CASTELLARI L. (1996) – *Higher alcohol production by cryotolerant Saccharomyces strains*. *Am.J.Enol.Vitic.*, 47,343.
- BISSON L.F. (2005) – Stuck and Sluggish Fermentations. *Internet Journal of Viticulture and Enology*, 9: 1-14.
- BLASCO L., VEIGA-CRESPO P., VILLA T.G. (2011) – FPGI, a gene involved in foam formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28:437-451.
- BRISSONET F., MAUJEAN A. (1993) – Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *Am.J.Enol.Vitic.*, 44, 297-301.

- BRISSONNET, F., & MAUJEAN, A. (1991). Identification of some foam active compounds in champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44,97–102.
- CARIDI, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Atonie van Leeuwenhoek*, 89, 417–422.
- CARPENE A. (1981) – Principali aspetti tecnologici della moderna spumantistica italiana. *Atti Simp. Int. Vini spumanti*, Salice Terme, Chiriotti ed., Pinerolo.
- CARRASCOSA A.V., MUNOZ R ., GONZALEZ R. (2011)- *Molecular wine microbiology*. Elsevier, Amsterdam.
- CASTELLARI L., FERRUZZI M., MAGRINI A., GIUDICI P., PASSARELLI P., ZAMBONELLI C. (1999) – *Unbalancedwinefermentation by cryotolerant vs non cryotolerantSaccharomyces strains*. *Vitis*, 33, 49.
- CASTELLARI L., RAINIERI S., ZAMBONELLI C. (1998) – Caratteristiche enologiche dei ceppi di *Saccharomycescerevisiae* termo tolleranti. *L’enotecnico*, 34, 91.
- CASTELLARI, L., TINI, V., COLORETTI, F., ZAMBONELLI., C. (2013) - *Vini spumanti e frizzanti.*, Edagricole, Bologna.
- CASTELLI T. (1955) – Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. *American Journal Enology Viticulture*, 6: 18-20.
- CASTELLI T. (1954) – Les agents de la fermentationvinaire. *Arch. Mikrobiol.*, 20, 223.
- CASTELLI T. (1960) – Lieviti e fermentazioni in enologia. L.Scialpi, Roma.
- CAVAZZANI N. (1985) – Come fare un ottimo spumante. Edagricole, Bologna.
- CAVAZZANI N. (1985) – Come fare un ottimo spumante. Edagricole, Bologna.
- CEBOLLERO E.,GONZALEZ R. (2006) –Induction of autophagy by second fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4121-4127.
- CEBOLLERO, E., & GONZALEZ, R. (2007). Autophagy: From basic research to itsapplication in food biotechnology. *Biotechnology Advances*, 25, 396–409.
- CHARPENTIER C., FREYSSINET M. (1989) – The mechanism of autolisi in wine. *Yeast*, 5, 181.
- CHARPENTIER, C., FEUILLAT, M. (1993). Yeast autolysis. In Graham G. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology*, pp. 225–242.

- CIANI M., COMITINI F., MANNAZZU I., DOMIZIO P., (2010) – Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non *Saccharomyces* yeast in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10: 123-133.
- COLAGARNDI O. (COORD.) (1990) – *Sviluppi della biotecnologia nella produzione dello spumante classico*. Pavia, 16 maggio 1990. ChiriottiEditori, Pinerolo (TO).
- COLAGRANDE, O., SILVA, A., & FUMI, M. D. (1994). Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnology Progress*, 10, 2–18.
- COMITINI F., GOBBI M., DOMIZIO P., ROMANI C., LENCIONI L., CIANI M. (2011) – Selected non *Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarted fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28: 873-882.
- DE LA PRESA- OWENS C., SCHLICH P., DAVIES H.D., NOBLE A.C. (1998) – Effect of methode champenoise process on aroma of four *V. vinifera* varieties. *Am.J. Enol.Vitic.*, 49, 289.
- DE ROSA T. (1987) – *Tecnologia dei vini spumanti-2 edizione*. Ed. AEB, Brescia.
- DELFINI C., CONTERNO L., GAIAP., COCITO C., PAGLIARA A. (1995) – Biological and technological factors controlling acetaldehyde production in wine yeast during alcoholic fermentation. *Oenologie 95. Atti del Symp.Int. Oenol. (Bordeaux)*, 176.
- DIVIÈS, C., CACHON, R., CAVIN, J. F., & PRÉVOST, H. (1994). Theme 4: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14(2), 135–153.
- ESCHENBRUCH R. (1974) – Sulfide and sulfite formation during wine making. *Am. J.Enol. Vitic.*, 25, 157.
- ESTEVE-ZARZOSO B., MANZANARES P., RAMON D., QUEROL A. (1998) – The role of non *Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*, 1: 143-148.
- FEUILLAT M., CHARPENTIER C. (1982) – Autolysis of yeast in Champagne. *Am.J.Enol.Vitic.*, 33(1), 6.
- FEUILLAT, M. (1998). *Autolyse de levures. OEnologie: Fondements Scientifiques et Technologiques*. Paris: Lavosier.
- FEUILLAT, M. (2003). Yeast macromolecules: Origin, composition, and enological interest. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 211–213.
- FLEET G.H. (2008) – Wine yeasts for the future. *FEMS yeast Research*, 8: 979-995.

- FORNAIRON-BONNEFOND C., CAMARASA C., MOUTOUNET M., SALMON J.M. (2002) – New trends on yeast autolysis and wine aging on lees: a bibliographic review. *J.Int.Sci.Vigne Vin.*, 36(2), 49.
- FREGONI M. (1999) – Chi ha inventato lo spumante? *Il Sommelier*, F.I.S.A.R., n°9.
- FUMI M.D., TRIOLI G., COLOMBI M.G., COLAGRANDE O. (1988) – Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium arginate gel and its application to bottle fermented sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 267.
- FUMI, M. D., TRIOLI, G., COLOMBI, M. G., & COLAGRANDE, O. (1988). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle fermented sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 267.
- GALLART, M., LÓPEZ-TAMAMES, E., SUBERBIOLA, G., & BUXADERAS, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7042–7045.
- GAROGLIO P.G. (1981) – *Nuova Enologia*, AEB, Brescia.
- GIOVANI, G., & ROSI, I. (2007). Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 19–24.
- GIUDICI P. (1990) – La produzione di glicerolo come carattere di selezione dei lieviti da vino. *Ind. Bevande*, 19, 507.
- GIUDICI P., ROMANO P., ZAMBONELLI C. (1990) – A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can.J:Enol.Vitic.*, 43,370.
- GIUDICI P., ZAMBONELLI C. (1992) – Criteri di selezione dei lieviti per enologia. *Vignevini*, 19, 29.
- GONZALEZ-RAMOS, D., CEBOLLERO, E., & GONZALEZ, R. (2008). A re-combinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17),5533–5540.
- HERNAWAN T., FLEET G.H. (1995) – Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J.Industr. Microbiol.*, 14, 440.
- HOPE E.A., AMOROSI C.J., MILLER A.W., DANG K., SMUKOWSKI HEIL C., DUNHAM M.J. (2017) – Experimental evolution reveals favored adaptive routes to cell aggregation in yeast. *Genetics*, 206: 1153-1167.

- HU X.H., WANG M.H., TAN T., LI J.R., YANG H., LEACH L., ZHANG R.M., LUO Z.W. (2007) – Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175: 1479-1487.
- JOHNSON H. (2003) – Il vino. Storia tradizioni cultura. Franco Muzzio Editore, Padova.
- JOLLY N.P., VARELA C., PRETORIUS I.S. (2014) – Not your ordinary yeast: non *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14: 215-237.
- KOURKOUTAS, Y., MANOJLOVIC´, V., NEDOVIC´, V. A. (2010). Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider. In N.J. Zuidam,
- LEROY M.J., CHARPENTIER M., DUTEURTRE B., FEUILLAT M., CHARPENTIER C. (1990) – Yeast autolysis during champagne aging. *Am.J.Enol.Vitic.*, 41, 21.
- LIGER-BELAIR, G. (2005) – Bollicine: la scienza e lo champagne. Einaudi, Torino.
- LOPANDIC K: *Saccharomyces* interspecies hybrids as model organisms for studying yeast adaptation to stressful environments. *Yeast* 2018, 35:21-38.
- LOYLAUX D., ROGER S., ADDA J. (1981)- The evolution of champagne volatiles during aging. *J.Sci.Food Agric.*, 32(12), 1254.
- LUGUERA, C., MORENO-ARRIBAS, M. V., PUEYO, E., BARTOLOMÉ, B., & POLO, M. C. (1998). Fractionation and partial characterization of protein fractions present at different stages of the production of sparkling wines. *Food Chemistry*, 63(4), 465–471.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J., & POLO, M. C. (2000). Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 1081–1085.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J., CARRASCOSA, A. V., BARCENILLA, J. M., POZO-BAYON, M. A., & POLO, M. C. (2001). Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wines production. *Food Microbiology*, 18, 183–191.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J., GONZALEZ, R., & CARRASCOSA, A. V. (2004). Morphological changes in autolytic wine yeast during ageing in two model systems. *Journal of Food Science*, 69(8), 233–239.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.J., PUEYO, E. (2009). Sparkling wines and yeast autolysis. In Springer (Ed.), *Wine chemistry and biochemistry*, pp. 61–80.
- MOET ET CHANDON (1996) – Dizionario del vino Moet et Chandon Edagricole internazionale. Il Sole 24 Ore – Edagricole, Bologna.

- NEDOVIC´ V.A. (Eds.), Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing, p. 327.
- ORIGONE AC, RODRI´GUEZ ME, OTEIZA JM, QUEROL A, LOPES CA: *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast* 2018, 35:157-171.
- PALOMERO, F., MORATA, A., BENITO, S., GONZÁLEZ, M. C., & SUÁREZ-LEPE, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105, 838–846.
- PELLERIN, P., & TESSAROLO, L. (2001). Optimizing the ageing of wine on lees. *Australia Grapegrower Winemaker*, 444, 14–15.
- PELLERIN, P., & TESSAROLO, L. (2001). Optimizing the ageing of wine on lees. *Australia Grapegrower Winemaker*, 444, 14–15.
- RAINERI S., ZAMBONELLI C., CASTELLARI L., GIUDICI P. (1998) – The enological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. *Am.J.Enol.Vitic.*, 49, 319.
- RIBEREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D. DONECHE, B. LONVAUD, A. (2020) – *Trattato di enologia, microbiologia del vino e vinificazioni.*, Edagricole, Bologna.
- SCHEPER, T., HENZLER, H.J., KIERAN, P.M., KRETZMER, G., MACLOUGHLIN, P.F., MALONE, D.M., SCHUMANN, W. (2000). Influence of stress on cell growth and product formation. Springer–Verlag Telos 1st ed., 190.
- SICHERI G. (2008) – *Spumanti e Champagne: il libro completo.* De Agostini, Novara.
- SIMON A.L. (1971) – *The history of champagne.* Octopus Books, London.
- SIPCZKI M: Interspecies hybridisation and genome chimerisation in *Saccharomyces*: combining of gene pools of species and its biotechnological perspectives. *Front Microbiol* 2018, 9:3071.
- SIPCZKI, M. (2019): Yeast two- and three-species hybrids and high-sugar fermentation. *MicrobBiotechnol*, 12:1101-1108.
- SUZZI G., ROMANO P. (1978) – Characteristics of high foam producing strains of *Saccharomyces*. *Ann.Microbiol.*, 28, 127.
- SUZZI, G., ROMANO, P., & ZAMBONELLI, C. (1984). Flocculation of wine yeasts: Frequency, differences, and stability of the character. *Canadian Journal of Microbiology*, 30, 36–39.
- SUZZI, G., TOFALO, R. (2018) – *Microbiologia enologica.*, Edagricole, Bologna.

- TORRESI S., FRANGIPANE M.T., ANELLI G. (2011) – Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement : A review. *Food Chemistry*, 129: 1232-1241.
- TRIONE, D., & MARTÍNEZ, A. (2001). Elevage sur lies des vins rouges: La voie enzymatique. *Review Oenology*, 101, 19–21.
- VAN MULDER, S.E., CHRISTIANEN, E., SAERENS, S.M.G., DAENEN, L., VERBELEN, P.J., WILLAERT, R. VERSTREPEN, K.J., DELVAUX, F.R. (2009). Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2009 Mar;9(2):178-90.
- VINCENZINI M., ROMANO P., FARRIS G.A. (2005) – *Microbiologia del vino*. Casa editrice Ambrosiana, Milano.
- VINCENZINI M., ROMANO P., FARRIS G.A. (2005) – *Microbiologia del vino*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- YOKOTSUKA, K., YAJIMA, M., & MATSUDO, T. (1997). Production of bottle fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 471–481.
- ZAMBONELLI C. (1998) – *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, Bologna.
- ZAMBONELLI C. (2003) – *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Terza edizione, Edagricole, Bologna.
- ZAMBONELLI C., GUERZONI M. E., NANNI M., GIANSTEFANI G. (1971) Selezione genetica dei lieviti della fermentazione vinaria. Studio dei caratteri. 1) l'energia di fermentazione. *Riv. Vitic. Enol.*, 24, 373.
- ZAMBONELLI C., TINI V. (1980) – I lieviti per vini spumanti e frizzanti – ricerca dei criteri di selezione. *Vitivinicoltura*, 12.
- ZAMBONELLI, C. (2006a). Influenza del lievito sulla qualità degli spumanti. Azione del ceppo. In: Edagricole (Ed.) *Microbiologia e biotecnologia dei vini. I processi biologici e le tecnologie della vinificazione*, pp. 207–208.
- ZAMBONELLI, C. (2006b). Le caratteristiche enologiche dei lieviti. Le modalità di sviluppo nei mezzi liquidi. In: Edagricole (Ed.) *Microbiologia e biotecnologia dei vini. I processi biologici e le tecnologie della vinificazione*, pp. 144–151.
- ZAMBONELLI, C. (2006c). La rifermentazione in bottiglia. In: Edagricole (Ed.) *Microbiologia e biotecnologia dei vini. I processi biologici e le tecnologie della vinificazione*, p. 207.

- ZAMBONELLI, C., RAINIERI, S., CHIAVARI, C., MONTANARI, G., BENEVELLI, M., & GRAZIA, L. (2000). Autolysis of yeasts and bacteria in fermented foods. *Italian Journal of Food Science*, 1(12), 9–21.
- ZHAO, J., & FLEET, G. H. (2005). Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 8, 415–423.
- ZIRONI R., ROMANO P., SUZZI G., BATTISTUTA F., COMI G., (1993) – Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniosporaguillermundii* or *Kloeckeraapiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 15: 235-238.

10. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali non saprei se fossi arrivato a questo importante traguardo.

Ringrazio di cuore in primis i miei genitori Fabio e Luisa e mia sorella Carlotta, per avermi sempre sostenuto durante questi anni e avermi sempre spronato nel migliorarmi di giorno in giorno, permettendomi di crescere e maturare.

Grazie alle nonne e ai nonni per l'affetto e l'appoggio che mi hanno sempre dimostrato quando parlo con loro dei miei futuri obbiettivi, ma soprattutto per il cibo preparato da portare a Cesena e le mance ricevute.

Un ringraziamento anche a tutti i parenti, zie, zii e cugini.

Ringrazio la mia compagna di vita Sara per starmi sempre vicino e su(o)pportarmi come poche persone riuscirebbero, un grazie speciale per la correzione Italiana di questa tesi, so di averti creato qualche capello bianco in più.

Un ringraziamento speciale lo dedico alla banda di Cesena Lodi, Seba, Marco e Malavasi, due anni a Cesena con voi indimenticabili sotto tutti i punti di vista.

Ringrazio tutti i ragazzi e le ragazze della feccia di Renazzo per tutti i momenti di spensieratezza passati con voi.

Infine, vorrei dedicare questo piccolo primo traguardo a me stesso, che sia il primo di una lunga e brillante carriera.