

1. Aspetti microbiologici della vinificazione spontanea.

Il processo di vinificazione spontanea avviene ad opera di lieviti e batteri naturalmente presenti nei grappoli d'uva e nel mosto. I lieviti possono avere metabolismo ossidativo (non *Saccharomyces*: *Hanseniaspora* spp, *Kloekera* spp, *Candida* spp, *Metschnikowia pulcherrima*) o fermentativo.

Nel mosto i lieviti cementanti tali avviano la FA, sono variabili in funzione al clima, al grado di maturazione e pratiche agronomiche. Dopo 2-5 gg di moltiplicazione cellulare raggiungono valori massimi di 10^7 - 10^8 UFC/ml. Dopo la fase stazionaria vi è una fase di declino fino a 10^5 CFU/ml. Nella vinificazione spontanea il decorso fermentativo è diverso rispetto alla fermentazione in presenza di LSA, contando sul contributo di specie diverse da *S.cerevisiae*. L'andamento dei processi fermentativi segue il modello della curva di sviluppo microbico (fase LAG (adattamento delle cellule presenti e/o incollate all'ambiente) --> fase di moltiplicazione cellulare --> fase stazionaria (velocità di crescita=0, n cellule formate= n cellule morte, le fermentazione prosegue nelle cellule vive) --> fase di mortalità) e viene condotto, in fase iniziale, da lieviti Non-*Saccharomyces*, seguendo l'ordine *Metschnikowia Pulcherrima* (10% zuccheri fermentati), *Kloeckera Apiculata* (20% zuccheri fermentati), *Candida Stellata* (30% zuccheri fermentati). *Saccharomyces Cerevisiae*, inizialmente pressochè assente, raggiunge il massimo della sua presenza entro il 60% degli zuccheri fermentati.

2. Aspetto microbiologico della FML

È il processo immediatamente successivo alla Fermentazione Alcolica, a seguito del quale il **Malato** (Acido Malico) viene degradato in **Lattato** (Acido Lattico) e CO_2 . Il processo viene condotto dai **LAB** (Lactic Acid Bacteria), batteri lattici che possiedono enzimi malolattici (EML). Il LAB più importante nel processo fermentativo in questione è **Oenococcus Oeni** (il più adatto a tollerare le condizioni sfavorevoli caratteristiche del vino). Lungo il processo di vinificazione, partendo dal vigneto, le concentrazioni microbiche variano da valori iniziali dell'ordine di $10^2 - 10^4$ CFU/ml (*Lactobacillus Plantarum*, *Casei*, *Brevis*), a valori finali (post fermentazione alcolica) dell'ordine di 10^6 CFU/ml (*Oenococcus Oeni*, *Pediococcus* spp e *Lactobacillus* spp).

3. Aspetti microbiologici della FMA

La **fermentazione malo-alcolica** è caratteristica di alcuni lieviti, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces oviformis* e *Saccharomyces cerevisiae* e in particolare quelli del genere *Schizosaccharomyces pombe*, *malidevorans*, *Japonicus*. Questo tipo di fermentazione prevede la trasformazione diretta dell'acido malico grazie al NAD ed alla presenza dell'enzima malico Mn^{++} , in acido piruvico, rilasciando come prodotti di uscita $NADH_2$ e CO_2 (anidride carbonica). Successivamente interviene, sull'acido piruvico, il TTP, l'enzima piruvato decarbossilasi, il quale facendo fuoriuscire nuovamente anidride carbonica, andrà a formare l'acetaldeide. Infine l'acetaldeide, grazie all'intervento del $NADH_2$, formerà l'alcol etilico o più comunemente chiamato etanolo, con NAD come prodotto di scarto.

4. **Aspetti biochimici della FA**

Durante la **Fermentazione Alcolica**, il Glucosio viene convertito in Etanolo e CO₂ (prodotti primari). Dal **Glucosio**, tramite Glicolisi, si ottiene Piruvato. Il **Piruvato** viene decarbossilato (Piruvato Decarbossilasi) in **Acetaldeide**, la quale viene a sua volta ridotta (Alcol Deidrogenasi) in **Etanolo**, con ossidazione di NADH + H⁺. Tra i prodotti secondari della FA può essere menzionato il Glicerolo (conferisce morbidezza alla struttura del vino e contribuisce alla componente dolce).

Il bilancio energetico della glicolisi + FA= 2 ATP ed è una reazione spontanea con $\Delta G = -40$ kCal.

L'innalzamento termico dipende dal contenuto zuccherino:

$$C.z. / 10 \times 1.3 + T_i = T_{max}$$

5. **Aspetti biochimici della FML**

Durante la **Fermentazione Malolattica**, l'Acido Malico viene convertito in Acido Lattico e CO₂, in concomitanza con la fermentazione di carboidrati. Il processo fermentativo determina una riduzione di acidità (viene perciò sconsigliata per la produzione di vini a bassa acidità). L'enzima malolattico è prodotto dai batteri lattici che possiedono il gene melA.

6. **Lieviti e CH₃-COOH (indicare generalità e aspetti metabolici, eventualmente riferendosi a lieviti saccharomyces e non saccharomyces) oppure microrganismi o batteri vinari e CH₃COOH**

Acido Acetico (componente dell'acidità volatile), viene prodotto da tutti i lieviti coinvolti nel processo di Fermentazione Alcolica, e viene considerato negativamente per la sua influenza sulla qualità del vino. Per legge, la quantità massima viene fissata a 1,2 g/l nei vini rossi, e ad 1,08 g/l nei vini bianchi e nei rosati.

S.Cerevisie è una delle specie che forma le minori quantità del composto e la capacità di produrlo è carattere di ceppo, stabile e ereditario.

7. *Microrganismi vinari e CH₃-CH₂OH (indicare generalità e aspetti metabolici dei microrganismi vinari conosciuti)*

Etanolo, prodotto principale della Fermentazione Alcolica, deriva dalla fermentazione del residuo zuccherino ad opera dei lieviti. La componente alcolica rappresenta una delle caratteristiche fondamentali nel vino.

Il decorso della fermentazione alcolica è guidato dal contenuto in etanolo, al suo aumentare diverse specie di ceppi e di lievito susseguono.

8. *Microrganismi vinari e COOH-CHOH-CH₃ (oppure lieviti vinari o batteri vinari)*

Acido lattico, prodotto principale della Fermentazione Malolattica, determina una riduzione di acidità.

batteri lattici omofermentativi trasformano glucosio e fruttosio direttamente in 2 molecole di acido lattico con poca o nulla formazione di altri prodotti secondari ed acidità volatile in piccole dosi (massimo 0,1-0,15 g/l). La quantità di lattico ottenuto è superiore all'85%.

I batteri lattici eterofermentativi, in condizioni di pH elevato trasformano il glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio e i pentosi con la produzione di acido D-lattico ed L-lattico, acido acetico (0,10-0,25 g/l - con 1 g/l di zuccheri si può avere anche l'aumento di 0,60 g/l di ac. volatile e comparsa di spunto lattico) e numerosi altri composti secondari tra cui anidride carbonica, alcol (alcol etilico in caso di glucosio - mannitolo in caso di fruttosio), ac. succinico, glicerina, 2-3 butilenglicole, acetilmetilcarbinolo, diacetile.

Dalla degradazione del fruttosio i batteri lattici eterofermentativi possono dare origine all'agrodolce o fermentazione mannitica con produzione di mannite (mannitolo, alcol polivalente dal sapore dolciastro). L'alterazione dell'agrodolce è determinata dall'accumulo di mannitolo abbinato ad acido acetico.

Il vino affetto da spunto lattico perde in pastosità e rotondità, a volte si presenta torbido con riflessi sericei, presenta un odore che ricorda all'inizio al frutta stramatura e poi diventa spunto.

Il rischio di fermentazione malolattica impura cresce quando tutto l'acido malico è stato consumato e vengono degradati gli zuccheri e in caso di fermentazione alcolica stentata o di arresti di fermentazione in cui i batteri approfittano della scarsa vitalità dei lieviti.

9. *Generalità e aspetti biotecnologici/applicativi della LSA*

Lieviti Secchi Attivi, vengono utilizzati per condurre la Fermentazione Guidata. Si tratta di lieviti selezionati in base alle proprie caratteristiche enologiche (note e programmate) e perciò utilizzati per obiettivi specifici. Una Fermentazione condotta da LSA permette di ottenere prodotti stabili e dai caratteri più o meno costanti per ogni annata, privi di residui zuccherini fermentiscibili, a seguito di processi fermentativi più rapidi.

Impiego in azienda:

1. LSA + H₂O (1 KG di LSA in 10 L d'Acqua). T = 37 °C.
2. Mescolare delicatamente, lasciare a riposo per 20'.
3. Aggiungere un egual volume di mosto da fermentare, assicurandosi che la differenza di T non superi i 10 °C.
4. Ripetere, se necessario, i procedimenti 2 e 3.
5. Inoculare la massa da fermentare.

10. Generalità e aspetti biotecnologici/applicativi della FML

Se è desiderata vengono incoraggiati i batteri malolattici. Aumenta il corpo, la persistenza degli aromi, la morbidezza e la rotondità, inoltre in funzione del ceppo riduce aromi vegetali e erbacei. La versatilità metabolica del LAB può creare problemi e la fermentazione di quantità eccessive di fruttosio da parte degli eterolattici può portare a eccessi di ac. acetico e manipolo (favorisce quindi la crescita di lattobacilli). Meno diffusa in vini bianchi e sconsigliata in vini con bassa acidità, al fine di non ridurla troppo.

Aspetti biotecnologici

- impiego di colture starter
- Selezione ceppi indigeni
- Selezione di ceppi tecnologicamente efficienti
- Ricerca di caratteristiche enologiche diverse

11. Generalità e aspetti biotecnologici/applicativi della FMA

Nell'industria enologica, questo tipo di fermentazione può essere utilizzata per la produzione di tutti i vini, dato che è fondamentale la presenza di etanolo nei mosti dedicati alla vinificazione.

12. Classificazione del genere *saccharomyces*

Il genere **Saccharomyces** è attualmente suddiviso in 7 specie principali, tra le quali **S. Cerevisiae**, **S. Bayanus** e **S. Pastorianus** assumono maggiore importanza a livello enologico.

S. Bayanus deriva da un'ibridazione tra S. Eubayanus e S. Uvarum (anch'esso di interesse enologico, criotollerante).

Vengono classificate come **Saccharomyces Sensu Stricto** le seguenti 4 specie (non differenziabili fisiologicamente a causa dell'omologia a livello di

DNA): S. Cerevisiae, S. Bayanus, S. Pastorianus, S. Paradoxus.

13. Moltiplicazione e riproduzione in *saccharomyces spp*

Riproduzione per gemmazione multilaterale, le cellule diploidi sporificano (Meiosi).

14. Ciclo biologico di *saccharomyces cerevisie*

Il ciclo vitale dei s. comprende una fase diploide e una fase aploide. Quando una cellula diploide si trova in condizioni sfavorevoli subisce la meiosi e produce ascospore aploidi; in condizioni favorevoli, ogni spora può dare origine a una colonia di cellule aploidi. In alternativa, le cellule che si originano da due spore possono anche fondersi, formando una cellula diploide (fig. 1). Le cellule che si fondono devono avere classe di coniugazione opposta (a e α) e la fusione avviene per scambio di segnali chimici, cioè di ferormoni, secreti dai coniuganti.

La ricezione di un segnale ferormonico determina l'inizio di una serie di eventi, che permettono l'attuarsi dell'unione, quali il cambiamento della forma cellulare, l'attivazione di alcuni geni e l'arresto della crescita della cellula che riceve il segnale. Questi eventi sono di grande interesse, perché sono simili a quelli che controllano molti aspetti dello sviluppo degli organismi più complessi.

Sia nella fase aploide sia in quella diploide il processo di gemmazione è piuttosto semplice: quando la divisione sta per cominciare si forma una gemma, che si ingrandisce gradualmente, da una porzione ispessita della parete cellulare, chiamata placca. I cromosomi sono attaccati a una struttura, chiamata corpo polare del fuso o SPB (sigla di spindle pole body), che si duplica dando inizio alla divisione nucleare. Fra i due SPB fratelli si formano microtubuli che guidano i cromosomi. Appena una gemma è sufficientemente grande, in essa passa un SPB, quindi i cromosomi si separano e una parte di essi entra nella gemma per formare il corredo genetico della nuova cellula figlia (fig. 2).

15. Vantaggi e svantaggi della fermentazione spontanea

- La **Fermentazione Spontanea** può dare risultati tecnologicamente scadenti, a seguito di vari fattori quali: possibile presenza di muffe o parassiti, personale ed attrezzature inadeguate, resa alcolica bassa, possibile residuo zuccherino fermentiscibile. L'impiego dei lieviti presenti sulle uve e nell'ambiente di cantina permette ad ogni modo di ottenere un prodotto che rispetti la tipicità (conforme al luogo d'origine).

16. Vantaggi e svantaggi della fermentazione guidata

- La **Fermentazione Guidata** (condotta da LSA) è caratterizzata da una maggiore resa alcolica, dall'assenza di residuo zuccherino fermentiscibile, da una maggiore rapidità nel processo fermentativo, da una maggiore costanza nei caratteri delle varie annate e da una minor produzione di acidità volatile.

17. Ossigeno e vinificazione: effetto crabtree

Definito anche con “ repressione del glucosio” e quindi inibizione degli enzimi respiratori. In presenza di alte concentrazioni di zucchero (5-9 %) la respirazione è inibita a favore della fermentazione.

S. Cerevisie ed altri lieviti definiti Crabtree positivi subiscono la repressione catabolica da glucosio anche nei riguardi della sintesi lipidica: a concentrazioni > di 9 g/l di glucosio manifestano infatti difficoltà di sintesi e accumulo degli acidi grassi nella cellula.

Ad alte concentrazioni di glucosio in S.cerevisie la respirazione è fortemente inibita e il glucosio viene quindi utilizzato attraverso la fermentazione alcolica anche in presenza di ossigeno.

Quando la concentrazione di glucosio è elevata, anche in presenza di ossigeno, S. Cerevisie metabolizza gli zuccheri solo per via fermentativa. L'effetto Crabtree limita la crescita del lievito.

Il glucosio ad elevate concentrazioni opera una repressione della biosintesi del citocromo A. Quindi avviene:

- repressione ciclo di Krebs
- Repressione della sintesi degli enzimi mitocondriali
- Degenerazione dei mitocondri

S. Cerevisie può utilizzare il glucosio anche in anaerobiosi, per attutire l'effetto crabtree (quindi evitare la degenerazione dei mitocondri)

18. Vino e microrganismi alternativi: il ciclo di brettanomyces spp

lievito capace di alterare le caratteristiche compositive del vino, determinandone un decremento qualitativo. Il lievito in questione si diffonde soprattutto in vini a pH elevati (valori maggiori di 3,5). La presenza di Brettanomyces è agevolata dall'utilizzo del legno per l'affinamento, e dalla tendenza alla diminuzione dei processi di filtrazione, stabilizzazione e chiarifica.

L'alterazione del vino è causata da una produzione di fenoli volatili (4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo), ammine biogene, acido acetico e acidi grassi (sentori di rancido e formaggio).

19. Caratteristiche enologiche: descrivere brevemente potere fermentativo, vigore fermentativo e alcoltolleranza

Potere fermentativo, indica la quantità massima percentuale (v/v) di Etanolo prodotta al termine del processo di Fermentazione Alcolica. Il potere fermentativo è correlato all'Alcoltolleranza (lieviti poco tolleranti nei confronti dell'Etanolo non sono capaci di portare a termine la fermentazione).

Vigore fermentativo, indica la prontezza con la quale il lievito dà inizio alla fermentazione, e la rapidità con la quale la porta a termine. Si definisce in base alla quantità (in grammi) di CO₂ prodotta in 24H o in 48H.

alcoltolleranza: l'etanolo prodotto durante la fermentazione inibisce lo sviluppo cellulare portando al rallentamento o arresto della FA. La presenza di etanolo

modifica l'integrità strutturale e la permeabilità della membrana plasmatica, influendo sull'efficienza dei sistemi di trasporto di esosi, ammonio e aminoacidi. L'arresto della fermentazione da parte dei lieviti avverrebbe a seguito non tanto della concentrazione di etanolo nel mezzo quanto a quella che via via si accumula all'interno della cellula, quando l'alcool intracellulare raggiunge una determinata concentrazione massima, di molto inferiore a quella extracellulare, ci sarebbe un effetto su alcuni enzimi della via glicolitica e come conseguenza si ha l'iniezione dello sviluppo dei lieviti e il proseguimento della fermentazione.

20. Caratteristiche enologiche: descrivere brevemente le modalità di sviluppo di *Saccharomyces* spp

1. **A cellule disperse** (torbidità uniforme, le cellule in sospensione assumono aspetto polverulento)
2. **A catene cellulari o velo intatto** (le cellule figlie restano unite alla cellula madre, formando un filamento unico che può frammentarsi senza più ricostituirsi).
3. **Flocculento** (le cellule sono presenti sotto forma di aggregati di diverse dimensioni, non c'è intorbidamento del mezzo liquido, la modalità di sviluppo è di grande importanza enologica nella spumantizzazione).

21. Caratteristiche enologiche: descrivere brevemente il carattere killer

I lieviti killer (KR) producono peptidi in grado di accedersi i ceppi sensibili (S)
I ceppi neutri (kR) non producono peptidi tossici ma sono resistenti a quelli prodotti da altri ceppi

I ceppi sensibili (kS) non sintetizzano la proteina killer e sono sensibili alla sua azione

22. Caratteristiche enologiche: descrivere brevemente la capacità autolitica

descrive la capacità dei lieviti di idrolizzare biopolimeri cellulari con liberazione nel mezzo liquido di componenti citoplasmatiche (amminoacidi, nucleotidi, acidi grassi). Avviene nel caso in cui il lievito sia sospeso in una soluzione carente o priva di elementi nutritivi.

23. Criteri di selezione dei lieviti vinari: elencarli e descrivere almeno 3 a scelta

Caratteri tecnologici

- Attività fermentativa
- Alcoltolleranza
- Modalità di sviluppo
- Termotolleranza e criotolleranza

- Tolleranza ad additivi tecnologici

- Carattere killer

Caratteri di qualità

- Produzione di solfiti

- Azione sull'acido malico

- Produzione di composti secondari

- Attività enzimatiche

- Capacità autolitica

24. Criteri di selezione dei batteri malolattici

In riferimento a **Oenococcus Oeni** (la specie considerata più idonea per condurre la FML):

1. Tolleranza all'Etanolo.

2. Tolleranza alla SO₂

3. Tolleranza a valori di pH acidi.

4. Produzione di ammine biogene scarsa o nulla

5. Conferimento di buone caratteristiche organolettiche al vino (minima produzione di acido acetico).

25. Isolamenti di lieviti vinari: descrivere i metodi di laboratorio utilizzabili

.....

26. Microscopia di lieviti vinari: descrivere aspetti applicativi

Osservazione al microscopio di preparati a base di lieviti vinari (*Saccharomyces Cerevisiae*), si effettua prelevando un'aliquota del preparato (con ansa a loop o con micropipetta), ponendolo sul vetrino porta oggetto e coprendolo successivamente con vetrino copri oggetto. Passando all'osservazione, si utilizzano in ordine le lenti ad ingrandimento 4x, 10x e 40x.

27. Colorazione con blu di metilene nella microscopia dei lieviti vinari

La colorazione con blu di metilene richiama l'utilizzo di un **Mezzo Differenziale** (consente di individuare una specie rispetto ad un'altra, ad esempio tramite l'utilizzo di un colorante). Il colorante in questione permette di distinguere le cellule vive da quelle morte, basandosi sul fatto che le vive rimangono bianche, mentre le morte, a causa della perdita di assorbimento selettivo della membrana citoplasmatica, assumono il colore blu.

28. Analisi microbiologica di LSA: aspetti operativi

Vinificazione in rosso: 15-15 g/HL

Vinificazione in bianco: 20-30 g/HL

Vinificazione in rosato: 15-20 g/HL

La dose di LSA da utilizzare va calibrata in funzione dello stato delle uve e dell'obiettivo energetico

Aggiungere al mosto da fermentare

È possibile aggiungere additivi organici ma non saccarosio

Dopodiché verificare lo stato delle cellule di lievito al microscopio, stimare il numero con camera di Thoma e analizzare valore CFU mediante diluizione seriale e inoculo su mezzo agarizzato.

Metodologia d'impiego in azienda:

H₂O + LSA (500 g in 5 l) t 37°C, mescolare con cura e lasciare riposare 20 min.

Aggiungere un uguale volume al mosto da fermentare, permettendo ai lieviti di abituarsi alla temperatura del mosto ed evitando sbalzi termici > 10 °C. Ripetere se necessario in funzione della temperatura del mosto da fermentare e inoculare la massa da fermentare.

1. **Verifica dello stato delle cellule di lievito al microscopio** (confronto con cellule in normale stato di crescita su piastra).
2. **Stima del numero di cellule** mediante camera di conta Thoma o Burker.
3. **Analisi del numero di CFU/ml** con diluizione seriale ed inoculo su mezzo agarizzato.

29. Aspetti generali di almeno un lievito non saccharomyces a scelta TRA HANSENIASPORA SPP., TORULASPORA SPP., CANDIDA/STARMERELLA SPP., ZYGOSACCHAROMYCES SPP.

.....

30. ASPETTI GENERALI DI ALMENO UN LIEVITO NON-SACCHAROMYCES A SCELTA TRA METSCHNIKOWIA SPP., SACCHAROMYCODES SPP., PICHIA SPP., LACHANCEA/KLUYVEROMYCES SPP.

.....

31. Calcolare il valore di CFU, scrivendo la formula applicata, se inoculando 100 micrometri di una sospensione diluita 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ottengo il seguente numero di colonie: 53-64-58, 75-68-88, 54-68-58, 77-68-84. Se il mezzo contenuto nelle piastrina era WLagar di che microrganismi potrebbe trattarsi? Descrivere

Numero colonie: fare la media tra le terne di valori

UFC= numero colonie/ fattore di dilazione x tot ml

Es: $53 \times 10^6 \times 10/0,1 = 5,3 \times 10^8$ UFC/ml

32. Qual è la T max raggiungibile in un mosto con T_i iniziale di 15/18 °C e contenuto zuccherino di 180/220 G/l? È compatibile con la fermentazione alcolica e perchè?

$T_{max} = T_i + 1,3^\circ\text{C} + \text{contenuto zuccherino}/10$

Es: $T_i = 15^\circ\text{C}$ c.z 180 g/l $\longrightarrow T_{max} = 18 \times 1,3 + 15 = 38,4$