



*UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO*

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, FORESTALI E ALIMENTARI*

*CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI*

*RELAZIONE FINALE*

# **Lieviti non-*Saccharomyces* ad uso enologico**

Relatore: Prof.ssa Kalliopi Rantsiou

Candidato: Anna Muni

Anno Accademico 2014-2015

## Indice

1. Introduzione .....	1
2. Cenni storici .....	4
3. Contributi dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i> .....	5
4. Ecologia dei lieviti non- <i>Saccharomyces</i> .....	9
5. Fermentazioni miste .....	11
6. Principali specie non- <i>Saccharomyces</i> .....	16
6.1. <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	16
6.2. <i>Candida pulcherrima</i> .....	18
6.3. <i>Starmerella bacillaris</i> .....	19
6.4. <i>Hanseniaspora</i> spp .....	21
6.5. <i>Zygosaccharomyces</i> spp .....	22
6.6. <i>Schizosaccharomyces</i> spp .....	24
6.7. <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	25
6.8. <i>Pichia</i> spp .....	26
7. Conclusioni .....	28
Bibliografia .....	29

# 1. Introduzione

La competizione internazionale all'interno del mercato del vino, la richiesta da parte dei consumatori di vini con nuove caratteristiche, le crescenti preoccupazioni riguardo alla sostenibilità ambientale del processo enologico stanno fornendo nuove sfide per l'innovazione nell'ambito delle fermentazioni vinarie. La fermentazione alcolica del mosto d'uva da parte dei lieviti rappresenta una fase cruciale, attraverso la quale i produttori possono modulare in modo creativo la qualità del vino, e al tempo stesso possono “modellare” strategicamente i vini in base ai cambiamenti del mercato (Fleet, 2008).

I lieviti rivestono un ruolo di primaria importanza nell'antico e complesso processo di vinificazione. Le fermentazioni spontanee seguono un modello che vede uno sviluppo iniziale di lieviti autoctoni e le fasi finali costantemente dominate dai ceppi alcol-tolleranti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000).

Per questo motivo tale specie, spesso definita semplicemente come “lievito del vino”, è quella che ha ricevuto maggiori attenzioni. Questo lievito non è solo responsabile del metabolismo degli zuccheri del succo d'uva in alcol e anidride carbonica, ma svolge un ruolo altrettanto importante nella formazione di metaboliti secondari, così come nella conversione dei precursori degli aromi in aromi varietali del vino (N. P. Jolly, Varela, & Pretorius, 2014).

Negli ultimi anni, però, c'è stata una crescente domanda per nuovi e migliori ceppi di lievito, che possano essere impiegati nella produzione di differenti tipologie di vini, caratterizzati da una forte distinzione stilistica, frutto di una maggiore complessità di aroma, sapore e struttura, rispetto ai prodotti ottenuti mediante inoculo di ceppi selezionati di *S. cerevisiae* che, viceversa, sarebbero responsabili di un “effetto appiattimento” (Gobbi, 2011).

L'inoculo di un ceppo di *S. cerevisiae* selezionato, infatti, non solo può comportare l'inibizione di lieviti potenzialmente dannosi, ma anche di altre specie di lievito, la cui presenza nel processo di fermentazione in quantità definite e per tempi definiti può contribuire positivamente all'aroma del vino (M. Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010).

Una delle proposte fornite dalla comunità scientifica per rispondere a queste pressanti richieste è rappresentata dall'impiego, sotto forma di inoculi misti o sequenziali, di una o più specie appartenenti alla vasta categoria dei lieviti non-*Saccharomyces*.

I lieviti non-*Saccharomyces*, come suggerisce il nome, includono tutte le specie di lievito coinvolte nella produzione di vino eccetto quella di *S. cerevisiae*, a patto che queste giochino un ruolo positivo nella vinificazione. I lieviti riconosciuti come alteranti, quali *Dekkera/Brettanomyces*, sono normalmente esclusi da questa definizione.

Questi lieviti, che possono essere ascomiceti o basidiomiceti, possiedono stati vegetativi che prevalentemente si riproducono per gemmazione o fissione, senza dar luogo a forme sessuali all'interno o su di un corpo fruttifero. Le tassonomie attuali riconoscono 149 generi di lieviti, che comprendono quasi 1500 specie (C. Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011). Di queste, oltre 40 specie sono state isolate dal mosto d'uva (M. Ciani et al., 2010)

I lieviti possono essere indicati da due nomi validi: il nome teleomorfico (Tabella 1), riferito allo stato sessuale, in grado di produrre le ascospore, e il nome anamorfico, riferito allo stato asessuato, che non produce ascospore (C. Kurtzman et al., 2011).

**Tabella 1** Nomi anamorfici, teleomorfici e sinonimi di alcuni lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti al phylum *Ascomycetes* incontrati in fermentazioni vinarie (C. P. Kurtzman & Fell, 1998b)

Anamorphic form	Teleomorphic form	Synonyms <sup>1</sup>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Saccharomyces rosei</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
<i>Candida globosa</i>	<i>Citeromyces matritensis</i>	
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	
<i>Candida hellenica</i>	<i>Zygoascus hellenicus</i>	
<i>Candida lambica</i>	<i>Pichia fermentans</i>	
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Torulopsis pulcherrima</i>
<i>Candida reukaufii</i>	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	
<i>Candida sorbosa</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	
<i>Candida stellata</i>	<sup>2</sup>	<i>Torulopsis stellata</i>
<i>Candida valida</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	
<i>Kloeckera africana</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<i>Kloeckera apis</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	
<i>Kloeckera corticis</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>	
<i>Kloeckera javanica</i>	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	
<sup>3</sup>	<i>Issatchenkia terricola</i>	<i>Pichia terricola</i>
<sup>3</sup>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	
<sup>3</sup>	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	
<sup>3</sup>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	
<sup>3</sup>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Saccharomyces bailii</i>
<sup>3</sup>	<i>Pichia farinosa</i>	

<sup>1</sup> Names sometimes found in older literature.

<sup>2</sup> No teleomorphic form.

<sup>3</sup> No anamorphic form.

La presente relazione ha l'obiettivo di presentare le informazioni di base riguardanti le specie di lieviti non-*Saccharomyces* associate al comparto enologico, di esporre i principali

contributi che le stesse possono apportare nell'ambito di una vinificazione e, infine, di riportare i risultati di alcune delle numerose sperimentazioni che sono state effettuate riguardo al loro impiego in enologia.

## 2. Cenni storici

Nel 1863, Louis Pasteur, basando il proprio lavoro sulla prima osservazione microscopica di Antonie van Leeuwenhoek risalente al 1680, dimostrò in modo conclusivo che il lievito è il catalizzatore primario della fermentazione alcolica del vino. In seguito, furono selezionati lieviti con caratteristiche migliorate e, nel 1890, Müller-Thurgau introdusse il concetto di inoculo del mosto d'uva con colture pure di lieviti. Come risultato, la qualità e la quantità di produzione di vino subirono un notevole miglioramento (Pretorius, 2000).

Sulla base dei primi studi dell'ecologia, *S. cerevisiae* e la specie affine *Saccharomyces bayanus* sono stati considerati i lieviti di maggiore rilevanza all'interno del processo e, di conseguenza, sono diventati le specie intorno alle quali è stata sviluppata la tecnologia delle colture starter (Degre, 1993). Queste specie derivano principalmente dall'attrezzatura di cantina, ma si possono anche trovare sull'uva, anche se a livelli di carica molto bassa, per poi essere trasmessi al mosto durante la pigiatura. Una terza fonte di lieviti *Saccharomyces* è rappresentata dalle colture starter prodotte dall'industria e aggiunte dal produttore (N. Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2003a).

I lieviti non-*Saccharomyces*, invece, furono inizialmente considerati i microrganismi responsabili dei principali problemi di carattere microbiologico legati al processo di vinificazione. Questa cattiva reputazione fu dovuta al fatto che essi fossero stati spesso isolati da vini alterati. Nonostante si sapesse che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* fossero in grado di formare metaboliti favorevoli per la qualità del vino, gli elevati livelli di acidità volatile e di altri composti negativi prodotti compensarono questo aspetto benefico. Ciò ha causato, nel tempo, un'avversione generale ed indiscriminata nei confronti di tutti i lieviti non-*Saccharomyces* (N. P. Jolly et al., 2014).

In contrapposizione a questo atteggiamento, i viticoltori, specialmente quelli appartenenti al Vecchio Continente, vedevano i lieviti autoctoni come parte integrante dell'autenticità dei loro vini, ritenendoli in grado di conferire loro proprietà desiderate e caratteristiche tipiche della regione d'origine (Amerine, 1980).

### 3. Contributi dei lieviti non-*Saccharomyces*

Nel corso degli ultimi 30 anni, si sono verificati importanti progressi nella comprensione dell'ecologia, della biochimica, della fisiologia e della biologia molecolare dei lieviti coinvolti nella produzione di vino, e di come questi lieviti abbiano un impatto sulla chimica del vino, sulle sue proprietà sensoriali e sul gradimento del prodotto finale (Fleet, 2008).

Questi studi hanno dimostrato che le specie non-*Saccharomyces* raggiungono popolazioni di massimo  $10^6$ - $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> o più nelle fasi iniziali della fermentazione, prima di morire (Heard & Fleet, 1988). Si è concluso che tale quantità di biomassa fosse sufficiente per influire sulla composizione chimica del vino e che il contributo di tali lieviti al carattere generale del vino fosse molto più significativo di quanto si pensasse in precedenza (Heard & Fleet, 1986).

Oltre al semplice metabolismo fermentativo che fa sì che gli zuccheri del mosto vengano convertiti in alcol, i lieviti intervengono sul carattere del vino per mezzo dei seguenti meccanismi:

- Metabolismo degli zuccheri del succo d'uva e dei composti azotati.
- Idrolisi enzimatica delle molecole, che determina l'aroma, il flavour, il colore e la limpidezza del vino.
- Autolisi delle cellule di lievito al termine del processo fermentativo.
- Capacità di bioadsorbimento da parte del lievito (Fleet, 2008).

Dall'attività fermentativa svolta dai lieviti non si ottengono soltanto etanolo e anidride carbonica, ma anche una vasta serie di composti minori, che rivestono una grande importanza dal punto di vista sensoriale. Questi metaboliti volatili, infatti, conferiscono al vino il suo carattere vinoso e derivano dal metabolismo degli zuccheri e dei composti azotati, soprattutto degli amminoacidi. Tali composti comprendono esteri, alcoli superiori, aldeidi, chetoni, acidi organici, glicerolo, acidi grassi volatili e composti solforati (Swiegers, Bartowsky, Henschke, & Pretorius, 2005). Diversi studi hanno dimostrato che il tipo e le concentrazioni di metaboliti volatili prodotti variano molto non solo da specie a specie ma anche tra ceppi di lievito appartenenti alla stessa specie. Questo aspetto rende necessario uno screening approfondito per la selezione di quei ceppi con caratteri enologici positivi e l'esclusione di quelli con definite influenze negative (Gobbi, 2011).

Recenti studi hanno proposto il metabolismo respiratorio di alcuni lieviti non-*Saccharomyces* come mezzo per la riduzione del grado alcolico del vino (Quirós, Rojas, Gonzalez, & Morales, 2014). È crescente, infatti, l'interesse a produrre vini con ridotto contenuto di alcol. I motivi che suscitano questa tendenza sono molto diversi tra loro e sono essenzialmente due. Da un lato, si cerca di compensare gli effetti dell'aumento della temperatura media globale sulla viticoltura. Questi comportano nei vini una minore acidità, lo sfasamento della maturazione fenolica e livelli di zuccheri più alti, soprattutto nei climi caldi (Jones, White, Cooper, & Storchmann, 2005). Dall'altro, è sorta una netta richiesta di vini a bassa gradazione alcolica da parte dei consumatori, sempre maggiormente attenti all'aspetto salutistico e soggetti alle restrizioni imposte dalla sicurezza stradale, dalle barriere commerciali e fiscali.

L'idrolisi enzimatica delle molecole del mosto d'uva è un processo biochimico estremamente importante per il carattere organolettico del vino. Esso permette di trasformare molecole derivate dall'uva che sono aromaticamente inattive in molecole aromaticamente attive, cioè percepibili sensorialmente. La trasformazione biochimica dei costituenti base del mosto d'uva in composti aromatici rappresenta un meccanismo importante, attraverso il quale i lieviti possono influenzare significativamente l'aroma ed il flavour del vino e facilitare una migliore espressione del carattere varietale del vitigno. Il ruolo fondamentale dei lieviti è espletato dal fatto che questi producono gli enzimi necessari alla liberazione degli aromi varietali. La gamma di enzimi prodotti è molto ampia, quelli maggiormente studiati intervengono sui terpeni e sui tioli volatili (Fleet, 2008).

I monoterpeni sono composti aromatici di natura lipidica non idrosolubili presenti in elevate concentrazioni nelle uve aromatiche e semi aromatiche. Essi conferiscono sentori di rosa, di limone ed, in generale, dei sentori caratterizzanti le uve Moscato. Inizialmente questi sentori non sono percepibili in quanto le molecole terpeniche sono legate covalentemente ad una molecola di zucchero. La rottura del legame da parte delle glicosidasi comporta la liberazione del composto aromatico e la sua percezione olfattiva (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2007). Le glicosidasi sono prodotte da diverse specie di lievito e da diversi ceppi, in particolare da quelli non-*Saccharomyces*.

In modo simile, i lieviti possono aumentare significativamente la concentrazione di tioli volatili nel vino, che conferiscono caratteri aromatici desiderabili, come note di frutto della

passione, di pompelmo e di cedro. Questi tioli si trovano nelle uve sotto forma di molecole non volatili coniugate alla cisteina; durante la fermentazione, i lieviti *S. cerevisiae* e *S. bayanus* producono l'enzima cistein-liasi che libera questi tioli trasformandoli nella loro forma volatile aromaticamente attiva. Questa capacità idrolitica nel rilasciare i tioli volatili dipende dal ceppo di *Saccharomyces*. Comunque, finora si sa ancora poco sulla produzione di questi tioli volatili da parte dei lieviti non-*Saccharomyces* (Gobbi, 2011).

I lieviti producono molti altri enzimi quali esterasi, decarbossilasi, solfito reduttasi, proteasi e pectinasi che, in diversi modi, possono influire sul flavour del vino e su altre proprietà. I lieviti coinvolti nella vinificazione potrebbero rappresentare importanti produttori di questi altri enzimi. *S. cerevisiae*, il lievito enologico per eccellenza, non è tuttavia riconosciuto come un significativo produttore di proteasi extracellulari, lipasi o enzimi proteolitici. È invece stato dimostrato che alcune specie non-*Saccharomyces* contribuiscono a tali reazioni enzimatiche nel mosto e che avvengono nelle prime fasi della vinificazione (Esteve-Zaroso, Manzanares, Ramón, & Querol, 2010).

Il processo di autolisi dei lieviti ha influenze rilevanti sul vino anche se, in passato, questo aspetto non è stato esaurientemente tenuto in considerazione e richiederebbe ricerche più accurate. Durante la fermentazione alcolica il lievito cresce fino a produrre livelli significativi di biomassa cellulare ( $10^8$ -  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), costituita da una miscela di cellule morte e vitali di differenti specie e di differenti ceppi. Queste cellule, che comprendono lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*, sedimentano verso la fine della fermentazione andando a costituire la maggior parte delle fecce. Tale biomassa non è inerte. L'autolisi delle cellule morte di lievito è caratterizzata dalla degradazione enzimatica delle proteine cellulari, degli acidi nucleici e dei lipidi con formazione di prodotti come aminoacidi, peptidi, acidi grassi e nucleotidi, e con il conseguente rilascio delle mannoproteine solubili della parete cellulare (Gobbi, 2011).

Le mannoproteine rappresentano uno dei maggiori polisaccaridi presenti nel vino. Sono state identificate come le responsabili di molte proprietà enologiche positive, quali il miglioramento della sensazione gustativa e della complessità del vino, la diminuzione della sensazione di astringenza, l'aumento della persistenza e della complessità aromatica, l'incremento della morbidezza e della rotondità del vino, nonché proprietà tecnologiche quali la riduzione dell'instabilità proteica e tartarica. Recentemente è stato dimostrato che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* presenti nell'uva e negli ambienti di vinificazione

possiedono una spiccata capacità di rilasciare polisaccaridi, tra cui le mannoproteine, nel vino durante la fermentazione alcolica. In questo modo, l'uso dei lieviti non-*Saccharomyces* al fine di incrementare il contenuto di mannoproteine in modo naturale potrebbe divenire un valore aggiunto al già grande interesse nei confronti di questi lieviti (P. Domizio, Liu, Bisson, & Barile, 2014).

Un altro studio di ricerca è stato condotto specificatamente sul fenomeno dell'autolisi dei lieviti durante la seconda fermentazione dello Champagne e di altri spumanti prodotti mediante il metodo classico. Esso riporta come, durante l'autolisi, il lievito rilascia diversi composti che modificano le caratteristiche organolettiche e le proprietà del vino. Il periodo di affinamento a cui sono sottoposti gli spumanti è tenuto a dare a questi vini la loro rotondità ed i caratteristici aromi e sapori. Inoltre, i prodotti derivati dall'autolisi influenzano anche le proprietà schiumogene degli spumanti (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006).

Il bioadsorbimento dei lieviti è una proprietà che varia molto da lievito a lievito e che è data dalla capacità da parte della parete cellulare di adsorbire varie componenti del vino, tra cui micotossine, composti antocianici e metaboliti microbici. L'influenza dei lieviti non-*Saccharomyces* sul colore del vino è un argomento relativamente inesplorato; anche se è noto che possono influenzare il colore dei vini. Ad esempio, i polisaccaridi della parete cellulare del lievito possono adsorbire le antocianine, provocando la conseguente diminuzione del colore. D'altro canto, tramite la produzione di acetaldeide e di acido piruvico, i lieviti contribuiscono alla stabilizzazione del colore del vino. L'attività di bioadsorbimento parietale è un aspetto relativamente nuovo, che deve essere tenuto in considerazione in fase di selezione e di sviluppo di nuovi lieviti enologici (Caridi, 2007). Un esempio rilevante in cui ciò è stato fatto è rappresentato dal lavoro svolto dall'Università di Torino in collaborazione con l'Enoteca Regionale del Barolo e la ditta Lallemand. Questi hanno selezionato il lievito commerciale BRL97, un ceppo appartenente alla specie *S. cerevisiae* la cui caratteristica principale è la massima salvaguardia del colore in termini di intensità, stabilità ed evoluzione. Questa caratteristica è resa possibile dal mancato bioadsorbimento degli antociani sulla parete cellulare e da una migliore combinazione con i tannini estratti (EB s.r.l.).

## 4. Ecologia dei lieviti non-*Saccharomyces*

Ad oggi è noto come l'ecologia dei lieviti coinvolti nel processo fermentativo risulti essere molto più complessa di quella rappresentata dalla dominanza del ceppo di *S. cerevisiae*, autoctono o inoculato che sia, e come l'impronta metabolica dei lieviti sul carattere del vino sia molto diversa dalla semplice fermentazione degli zuccheri del mosto d'uva (Fleet, 2008).

Sull'uva non matura si riscontra un basso numero di lieviti ( $10\text{-}10^3$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) ma con la maturazione questo dato aumenta fino a  $10^4\text{-}10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  (Fleet, 2003). Ciò è dovuto agli zuccheri che lisciviano o si diffondono fuori dal tessuto interno alle superfici cutanee dell'uva, fornendo un substrato nutritivo per i lieviti e per altri microrganismi. Lo stato sanitario delle uve è il fattore che influenza maggiormente l'ecologia microbica delle bacche, agendo sia sul numero sia sulla varietà delle specie presenti. La cuticola degli acini apparentemente intatti può recare microfessure e ammaccamenti che incrementano, con la maturazione, la disponibilità dei nutrienti e che spiegano la possibile dominanza dei lieviti a carattere ossidativo o debolmente fermentativo (*Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp.) in prossimità del momento della vendemmia. Quando la cuticola è visibilmente danneggiata, l'elevata disponibilità di zuccheri sulla superficie favorisce l'incremento di ascomiceti caratterizzati da elevata attività fermentativa come *Pichia* spp. e *Zigoascus hellenicus*, inclusi i lieviti considerati alteranti (*Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspota* spp.). La specie per eccellenza fermentante, *S. cerevisiae*, raramente si trova sulle bacche intatte, in quanto favorita dal danneggiamento (Barata, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2012). Molti altri fattori intrinseci ed estrinseci influenzano l'ecologia dell'uva. Tra questi troviamo la temperatura, le precipitazioni e altri fattori climatici, lo stato di maturazione delle bacche, il suolo, le pratiche colturali, gli agrofarmaci utilizzati e i danni fisici causati dalle muffe, dagli insetti e dagli uccelli (Combina et al., 2005).

Le fermentazioni inoculate, cioè all'inizio delle quali il produttore aggiunge una coltura starter di lieviti selezionati, vedono un'iniziale coesistenza dei lieviti indigeni, solitamente non-*Saccharomyces*, con quelli della coltura starter, generalmente *S. cerevisiae* (Rantsiou et al., 2013). In passato si riteneva che tutti i lieviti non-*Saccharomyces* morissero poco dopo l'inizio della fermentazione alcolica a causa della concentrazione di etanolo crescente

e dell'aggiunta di anidride solforosa. Tuttavia, le ricerche più recenti hanno dimostrato che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* possono addirittura sopravvivere durante tutto il processo fermentativo nonostante l'inoculo di colture di lieviti *Saccharomyces* (Zott, Miot-Sertier, Claisse, Lonvaud-Funel, & Masneuf-Pomarede, 2008).

Nelle fermentazioni spontanee, cioè prive di inoculo iniziale di colture starter, vi è una successione sequenziale di specie di lieviti. Nelle fasi iniziali, le specie caratterizzate da una bassa attività fermentativa come i lieviti apiculati appartenenti ai generi *Hanseniaspora*, *Candida* e *Metschnikowia* sono dominanti (Longo, Cansado, Agrelo, & Villa, 1991). A volte, possono anche crescere in questa fase specie di *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. Le popolazioni di questi lieviti crescono fino a valori di circa  $10^6$ - $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> per poi decrescere fino a morire durante le fasi più vigorose della fermentazione principalmente a causa della presenza di etanolo. In queste condizioni, i ceppi di *S. cerevisiae* e delle specie affini, che sono maggiormente alcol tolleranti, prendono il sopravvento e portano a termine la fermentazione. Tuttavia, le basse temperature diminuiscono la sensibilità di queste specie nei confronti dell'etanolo e, di conseguenza, fermentazioni condotte a temperature inferiori a 15-20 °C possono avvalersi di un maggior contributo da parte delle specie appartenenti ai generi *Hanseniaspora* e *Candida*. In tali occasioni, queste specie possono codominare con *S. cerevisiae* fino alla fine della fermentazione (Di Maro, Ercolini, & Coppola, 2007).

I lieviti non-*Saccharomyces* presenti nel vino sono solitamente associati alle botti e ad alterazioni post-fermentative. Queste includono *Brettanomyces* spp. (*Dekkera* spp.), *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens*, *Candida krusei* e *Candida valida*. Tuttavia, solo un ristretto numero di specie è in grado di tollerare le condizioni avverse del vino, e di moltiplicarsi. Alcune di queste specie, ad esempio *Brettanomyces* spp. e *Zygosaccharomyces* spp. sono tolleranti all'etanolo come *S. cerevisiae* e possono essere trovati anche in vino imbottigliato. La loro presenza è influenzata dal grado di filtrazione che precede l'imbottigliamento e l'igiene della cantina durante l'imbottigliamento (J. Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2006).

## 5. Fermentazioni miste

Uno dei più importanti progressi tecnologici nell'ambito delle vinificazioni è stato sicuramente l'inoculo del mosto con colture selezionate di lieviti di *S. cerevisiae*. Esso, infatti, ha permesso un controllo microbiologico del processo fermentativo ed una sua migliore gestione.

Già da tempo, è stato suggerito l'impiego come colture starter di alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces* associate alla vinificazione, per le loro specifiche caratteristiche metaboliche. È quindi possibile promuovere l'attività dei lieviti non-*Saccharomyces* nella vinificazione, limitando o ritardando l'inoculo di colture starter selezionate di *S. cerevisiae*. Questo concetto dunque non è nuovo, in quanto già molti anni fa è stato incoraggiato l'inoculo sequenziale di *Torulaspota delbrueckii* e *S. cerevisiae* (Castelli, 1955).

L'impiego di colture pure di lieviti enologici non-*Saccharomyces* come starter di fermentazione può conferire al vino caratteristiche positive ma, al contempo, diversi caratteri fermentativi negativi. Tra questi ultimi vi è la produzione di acido acetico, di acetato di etile, di acetaldeide e di acetoino ad elevate concentrazioni. Questo aspetto è rilevante ed impedisce l'uso di tali ceppi come colture starter. Inoltre, la maggior parte delle specie di non-*Saccharomyces* proveniente dall'ambiente enologico ha un potenziale di fermentazione limitato, nonché una scarsa resistenza all'anidride solforosa (Sun, Gong, Jiang, & Zhao, 2014).

Tuttavia, negli ultimi dieci anni, diversi studi hanno rivalutato il coinvolgimento dei lieviti non-*Saccharomyces* durante la fermentazione alcolica e il loro ruolo sulla determinazione della complessità e dell'aroma del prodotto finale. Sembra, infatti, che i lieviti *Saccharomyces* e quelli non-*Saccharomyces* presenti nel mosto in fermentazione non coesistano passivamente ma che, al contrario interagiscano. In queste condizioni, alcuni caratteri enologici tipici dei lieviti non-*Saccharomyces* non vengono espressi, oppure sono modulati dalle colture di lievito *S. cerevisiae* (Varela et al., 2009).

In questo contesto, è stato proposto l'uso di fermentazioni miste controllate attraverso l'impiego di specie di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* isolate dall'ambiente enologico. Infatti, l'uso di lieviti enologici non-*Saccharomyces* combinati a ceppi di *S. cerevisiae* in fermentazioni miste può diventare uno strumento per ottenere i vantaggi della fermentazione spontanea, evitando i rischi tipici della fermentazione incontrollata.

Inoltre, i lieviti non-*Saccharomyces* hanno alcune caratteristiche enologiche specifiche, che non si ritrovano nella specie *S. cerevisiae*, e che possono avere effetti aggiuntivi sul sapore e sull'aroma del vino (Comitini et al., 2011).

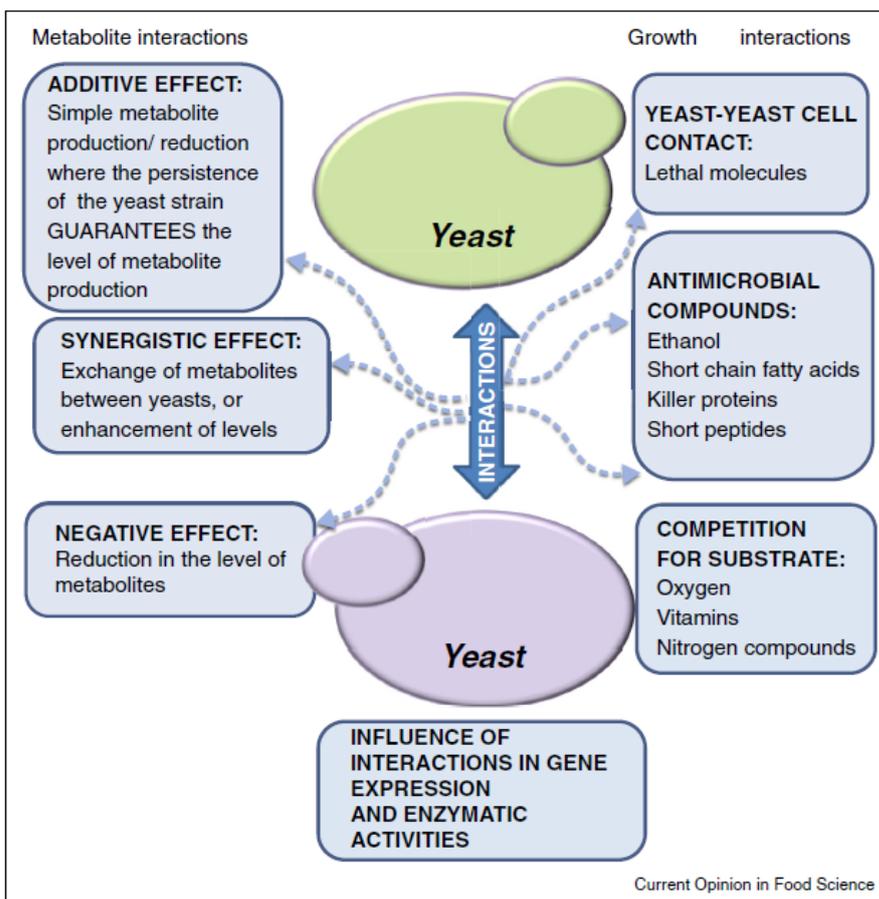
Le fermentazioni miste controllate mirano a migliorare la complessità e alcuni caratteri particolari dei vini. L'impiego di fermentazioni miste in enologia è supportato da diversi aspetti positivi (Tabella 2), i principali sono: modificazione di alcuni composti specifici, quali l'incremento del contenuto di glicerolo, una maggiore acidità totale o un ridotto contenuto di acido acetico nel vino; aumento del profilo aromatico del vino (esteri, terpeni, tioli volatili); riduzione del contenuto di etanolo del vino; controllo del microbiota responsabile dell'alterazione del vino; miglioramento della qualità generale e della complessità.

**Tabella 2** Processi fermentativi proposti nella vinificazione, impiegando lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* (M. Ciani et al., 2010)

Species used	Aim	Process	References
<i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i>	Reduction of acetic acid production	Sequential cultures	Castelli (1969); Herraiz et al. (1990); Ciani et al. (2006); Salmon et al. (2007); Bely et al. (2008)
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i>	Malic acid degradation	Sequential cultures Immobilized cells (batch process) Immobilized cells (continuous process)	Snow & Gallender (1979); Magyar & Panyik (1989); Yokotsuka et al. (1993); Ciani (1995)
<i>S. cerevisiae</i> <i>C. stellata</i>	Enhancement of glycerol content	Immobilized cells (pretreatment or sequential cultures)	Ciani & Ferraro (1996); Ciani & Ferraro (1998); Ferraro et al. (2000)
<i>S. cerevisiae</i> <i>C. cantarellii</i>	Enhancement of glycerol content	Mixed or sequential cultures	Toro & Vazquez (2002)
<i>S. cerevisiae</i> <i>C. stellata</i>	Improve wine aroma profile	Mixed or sequential cultures	Soden et al. (2000)
<i>S. cerevisiae</i> <i>H. uvarum</i> ( <i>K. apiculata</i> )	Simulation of natural fermentation (improvement of aroma complexity)	Mixed or sequential cultures	Herraiz et al. (1990); Zironi et al. (1993); Moreira (2005); Ciani et al. (2006); Moreira et al. (2008); Mendoza et al. (2007)
<i>S. cerevisiae</i> <i>K. thermotolerans</i>	Reduction of acetic acid production Enhancement of titratable acidity	Sequential cultures	Mora et al. (1990); Ciani et al. (2006); Kapsopoulou et al. (2007)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Issatchenkia orientalis</i>	Reduction of malic acid content	Mixed fermentation	Kim et al. (2008)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Pichia fermentans</i>	Increased and more complex aroma	Sequential cultures	Clemente-Jimenez et al. (2005)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Pichia kluyveri</i>	Increased varietal thiol	Mixed fermentation	Anfang et al. (2009)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Candida pulcherrima</i>	Improve wine aroma profile	Mixed fermentation	Zohre & Erten (2002); Jolly et al. (2003)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Increase in geraniol concentration	Mixed fermentation	Garcia et al. (2002)
<i>S. cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces</i> spp. <i>Saccharomycodes</i> spp. <i>Pichia</i> spp.	Influence on sensorial and physico-chemical properties of wines	Ageing over the lees during wine maturation	Palomero et al. (2009)

Su tutti questi aspetti, le interazioni tra i lieviti risultano avere un ruolo determinante. Le interazioni tra lieviti hanno conseguenze sia sulla crescita della popolazione sia sulla

produzione dei metaboliti da parte dei microrganismi (Figura 1). Al fine di controllare e ottimizzare la fermentazione mista, ulteriori conoscenze di entrambi questi aspetti sono necessarie (Maurizio Ciani & Comitini, 2015).



**Figura 1** Interazioni tra lieviti in fermentazioni miste (Maurizio Ciani & Comitini, 2015)

La produzione di composti tossici, così come la competizione per i nutrienti, sono interazioni che possono coinvolgere specie diverse di lievito o addirittura ceppi diversi della stessa specie.

Per quanto riguarda le interazioni inibitorie mediate da metaboliti tossici, l'esempio più evidente è rappresentato dalla produzione di etanolo da parte di *S. cerevisiae*. Infatti, l'effetto selettivo di alti livelli di alcol è stato individuato come il fattore maggiormente responsabile per la dominanza di *S. cerevisiae* nei confronti di altri non-*Saccharomyces* (Pretorius, 2000). Insieme all'etanolo, altri composti esercitano marcati effetti selettivi nelle fermentazioni miste. In particolare, la produzione di acidi grassi a media catena ed elevati tenori di acido acetico possono inibire la crescita di specie co-fermentanti (Holm Hansen, Nissen, Sommer, Nielsen, & Arneborg, 2001). Da tempo è nota la capacità di

alcuni ceppi di lievito di produrre peptidi inibitori, proteine o glicoproteine, come le tossine killer, che hanno effetti letali sulle cellule sensibili presenti. Uno studio ha identificato e parzialmente caratterizzato nuove tossine killer prodotte dalla specie di lievito non-*Saccharomyces Candida pyralidae*, le quali hanno mostrato effetti inibitori sul lievito alterante *Brettanomyces bruxellensis*. In questo caso, l'inoculo misto di specie di lievito potrebbe rappresentare un metodo biologico alternativo all'anidride solforosa per il controllo della crescita di *B. bruxellensis* (Mehlomakulu, Setati, & Divol, 2014). Anche il contatto cellula-cellula risulta coinvolto nell'interazione tra *S. cerevisiae* ed altre specie di lieviti non-*Saccharomyces*, quali *T. delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Lachancea thermotolerans* (Arneborg et al., 2005).

La disponibilità e la limitazione dei nutrienti possono rappresentare dei fattori che modulano l'ecologia dei lieviti durante la fermentazione. Una specie o un ceppo di lievito, ad esempio, può produrre o utilizzare una determinata sostanza fondamentale per il metabolismo di altre specie o di altri ceppi di lievito. I lieviti non-*Saccharomyces* sembrano essere meno tolleranti rispetto al *S. cerevisiae* per quanto riguarda la scarsa disponibilità di ossigeno. Per questo, la riduzione progressiva dell'ossigeno disponibile nel mosto durante la fermentazione rappresenta un altro parametro selettivo che fa sì che venga instaurata una competizione tra lieviti. Specie di lieviti non-*Saccharomyces* poco tolleranti a bassi tenori di ossigeno possono competere e poi rapidamente soccombere in presenza di *S. cerevisiae* (Holm Hansen et al., 2001). Al contrario, interazioni sinergiche tra i diversi lieviti che potrebbero rappresentare uno strumento per nuove tecnologie fermentative. Infatti, è stato dimostrato che durante la fermentazione mista la produzione di biomassa da parte di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* è inferiore rispetto a quella prodotta dai due ceppi in colture pure. Comunque, la presenza contemporanea dei lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* può determinare un aumento della persistenza dei non-*Saccharomyces* durante il processo fermentativo (Mendoza, de Nadra, & Farías, 2007).

Per quanto concerne la produzione di metaboliti da parte dei lieviti facenti parte di colture miste, sono stati osservati diversi effetti. In diversi studi è stata osservata un'interazione tra specie di lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* che ha portato alla diminuzione di metaboliti negativi per il vino. Queste interazioni di produzione-riduzione da parte delle diverse specie sono state riscontrate da diverse specie di lieviti non-*Saccharomyces* sia nel caso dell'acetaldeide (M. Ciani, Beco, & Comitini, 2006) sia nel caso dell'acetoino (M

Ciani & Ferraro, 1998). Entrambi i metaboliti, infatti, sono prodotti dal lievito non-*Saccharomyces* e quindi subito metabolizzati da *S. cerevisiae* in fermentazione mista.

Vari studi hanno evidenziato interazioni positive nell'ambito di fermentazioni miste. Queste hanno determinato un incremento della produzione di alcuni composti volatili rispetto alle fermentazioni con colture pure. Sono stati osservati maggiori livelli di esteri, in particolare di 2-feniletil acetato ed isoamil acetato (Virginia Rojas, Gil, Piñaga, & Manzanares, 2001). Interazioni positive nelle fermentazioni miste sono state mostrate anche per quanto riguarda la produzione di tioli volatili, in particolare di 3-mercaptoesil acetato, rispetto alle colture pure. Questa interazione sembra essere a livello di ceppo piuttosto che a livello di specie, ma la natura dell'interazione rimane sconosciuta (Anfang, Brajkovich, & Goddard, 2009).

## 6. Principali specie non-*Saccharomyces*

I lieviti non-*Saccharomyces* presenti nei mosti delle uve e durante la fermentazione possono essere suddivisi in tre gruppi:

- I. lieviti che sono ampiamente aerobici, ad esempio, *Pichia* spp., *Candida* spp;
- II. lieviti apiculati con bassa attività fermentativa, ad esempio, *Hanseniaspora* spp;
- III. lieviti con metabolismo fermentativo, ad esempio, *T. delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Z. bailii* (N. P. Jolly et al., 2014).

### 6.1. *Torulaspota delbrueckii*

*T. delbrueckii* (anamorfo: *Candida colliculosa*) è una delle specie più rappresentative del microbiota associata alle uve della maggior parte delle regioni viticole (J. Jolly et al., 2006). *T. delbrueckii*, precedentemente noto come *Saccharomyces rosei*, è un lievito ascomiceta più volte riclassificato, tanto da aver portato alla descrizione di numerosi taxa, che sono ormai noti come sinonimi (C. Kurtzman et al., 2011). Oggi il genere *Torulaspota* annovera sei specie accettate. Tuttavia, ceppi di *T. delbrueckii* mostrano variazioni nelle capacità fermentative e di assimilazione contribuendo, così, all'incertezza nella definizione della specie.

*T. delbrueckii* risulta essere un basso produttore di acidità volatile, di acetato di etile, di acetaldeide ed acetoino. È un medio produttore di anidride solforosa, alla quale presenta una media resistenza; è un abile biotrasformatore di terpeni, la sua presenza determina un incremento di alcuni composti aromatici ed alcune molecole, tra cui l'acido lattico o succinico. Il potere fermentativo di *T. delbrueckii* è basso, normalmente è compreso tra 7 e 10% v v<sup>-1</sup> di etanolo. Per questo motivo deve essere usato insieme a *Saccharomyces* se si desidera che gli zuccheri del mosto siano completamente consumati (Loira et al., 2014).

A causa di queste sue proprietà metaboliche e fisiologiche, *T. delbrueckii* è una tra le specie di lieviti non-*Saccharomyces* ad aver suscitato maggiore interesse tra le aziende vinicole e ad essere proposta sul mercato sotto forma di lievito commerciale. Esso è stato inizialmente proposto per la vinificazione di mosti a basso contenuto di zuccheri e acidi ed è stato utilizzato per la produzione commerciale di vini rossi e rosati in Italia (Castelli, 1955) e per quella di Sauvignon Blanc in Sud Africa (N. Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2003b). Ceppi di *T. delbrueckii* sono stati commercializzati da due produttori di lieviti

europei e da uno canadese per essere impiegati in colture miste o sequenziali con *S. cerevisiae*. La descrizione incerta di questa specie e le variazioni naturali all'interno della stessa sono elementi che implicano la possibilità di ottenere, nel tempo, ceppi con prestazioni migliorate rispetto a quelli commerciali (van Breda, Jolly, & van Wyk, 2013).

L'impatto di *T. delbrueckii* è stato esaminato per la prima volta nella produzione dell'Amarone, un vino rosso secco, ad alto contenuto alcolico ottenuto da uve appassite. In due diverse vinificazioni, le prove sono state inoculate con ceppi di *T. delbrueckii* insieme o precedentemente a *S. cerevisiae*. Le analisi hanno dimostrato che *T. delbrueckii* è in grado di colonizzare rapidamente il mosto, permanendo nel vino oltre ai 16,5% v v<sup>-1</sup> di etanolo. Gli effetti di *T. delbrueckii* sull'aroma del vino sono per lo più collegati al grande numero di composti volatili da esso prodotti nei vini ottenuti mediante colture miste. Le differenze più significative sono state osservate tra gli alcoli, gli esteri fermentativi, gli acidi grassi e i lattoni, che sono composti importanti per l'aroma dell'Amarone (Azzolini et al., 2012).

In un interessante studio, *T. delbrueckii* è stato utilizzato in colture pure e unito a *S. cerevisiae* per fermentare mosti ottenuti da uve botritizzate. Sono state studiate la velocità di fermentazione, la crescita della biomassa e la formazione di acidità volatile, acetaldeide e glicerolo. I risultati delle prove hanno dimostrato che *T. delbrueckii*, spesso descritto come un basso produttore di acido acetico in condizioni standard, ha mantenuto questa qualità anche in un mezzo ad alto contenuto zuccherino. Diversamente da *S. cerevisiae*, questa specie non ha risposto al mezzo iper-osmotico aumentando la produzione di acido acetico al momento dell'inoculo. Tuttavia, questo lievito mostra una scarsa resa in etanolo, produce poca biomassa e la fermentazione è lenta. Come risultato, le fermentazioni condotte dal solo *T. delbrueckii* non hanno raggiunto il contenuto di etanolo richiesto (14% v v<sup>-1</sup>), anche se la specie è in grado di sopravvivere a queste concentrazioni. Una coltura mista di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* in rapporto 20:1 è risultata la migliore combinazione per migliorare il profilo analitico del vino dolce, in particolare riguardo alla produzione di acidità volatile e di acetaldeide. Infatti, tale coltura ha fornito rispettivamente il 53% di acidità volatile e il 60% di acetaldeide in meno rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae* (Bely, Stoeckle, Masneuf-Pomarède, & Dubourdieu, 2008).

Un altro lavoro di ricerca, questa volta condotto su cinque ceppi di *T. delbrueckii*, ha permesso di mettere a confronto fermentazioni con colture pure di *S. cerevisiae* con

fermentazioni effettuate mediante inoculo sequenziale di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*. Sono stati quindi analizzati, oltre ai parametri fermentativi classici, i composti aromatici, i polialcoli ed i pigmenti. È emerso che il potere fermentativo dei cinque ceppi variava tra 7,6 e 9 % v v<sup>-1</sup> di etanolo, mentre l'acidità volatile era compresa tra 0,2 e 0,7 g L<sup>-1</sup> di acido acetico. La produzione di glicerolo e di 2,3-butandiolo è risultata inferiore rispetto a quella data dalla coltura pura di *S. cerevisiae*. Tuttavia, le fermentazioni sequenziali di *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae* hanno prodotto grandi quantità di diacetile, lattato di etile e di 2-fenilettil acetato. All'analisi sensoriale, la percezione complessiva è risultata migliore in tre vini prodotti mediante fermentazione sequenziale, anche se l'intensità aromatica era maggiore nelle fermentazioni con coltura singola di *S. cerevisiae*. Per quanto riguarda la qualità aromatica, sono state riscontrate significative differenze a livello sensoriale tra le fermentazioni con ceppi differenti di *T. delbrueckii*. Probabilmente, tali differenze sono dovute alla diversa produzione di alcuni composti volatili (esteri, diacetile e 3-etossipropanolo). Questi risultati supportano perciò l'uso di questo lievito come un mezzo per migliorare l'aroma del vino (Loira et al., 2014).

## **6.2. *Candida pulcherrima***

Nel 1901 Lindner descrisse una, a quel tempo, sconosciuta specie di lievito alla quale diede il nome *Torula pulcherrima*, il cui nome era specificatamente collegato al bell'aspetto dei suoi preparati microscopici. Coltivato in condizioni particolari, il microrganismo si presentava, infatti, sotto forma di cellule strettamente sferiche di dimensione uniforme, ognuna contenente un grande globulo altamente rifrangente apparentemente ricco di grassi. Da allora le varie proprietà di questo lievito, oggi conosciuto come *Candida pulcherrima* (teleomorfo: *M. pulcherrima*), sono state studiate da diversi autori (Kluyver, van der Walt, & van Triet, 1953).

Si tratta di un lievito che può essere presente ad elevati livelli di cariche nel mosto. Esso è comunemente associato all'elevata produzione di acidità volatile, ma può anche formare concentrazioni relativamente alte di esteri, in particolare dell'estere associato al sentore di pera, l'ottanoato di etile (Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martínez-Rodríguez, Las Heras-Vázquez, & Rodríguez-Vico, 2004). Questo aspetto può diventare utile nella produzione di vini prodotti con varietà neutre.

Il comportamento di *C. pulcherrima* e *S. cerevisiae* è stato studiato con colture pure e miste utilizzate per inoculare il mosto. *C. pulcherrima* ha mostrato una crescita

significativa e la sopravvivenza in colture miste, anche se *S. cerevisiae* è risultato dominante nella fermentazione. La produzione di etanolo è stata più alta con *S. cerevisiae*, mentre la coltura pura di *C. pulcherrima* ha prodotto basse quantità di etanolo con alti zuccheri residui ed un maggiore contenuto di acetato di etile. Le concentrazioni di acetato di etile prodotto nella coltura mista erano superiori a quelle prodotte utilizzando solo *S. cerevisiae*. Inoltre, altri composti volatili non sono stati formati a livelli indesiderabili nella coltura mista (Zohre & Erten, 2002).

In uno studio successivo, è stato analizzato l'effetto di pratiche enologiche (vale a dire l'uso di diammonio fosfato e anidride solforosa), temperature di fermentazione e pH del mosto sulle prestazioni di *C. pulcherrima* durante la fermentazione. È stato riferito che l'aggiunta di diammonio fosfato, i superiori valori di pH e l'aumento delle temperature determinano un leggero aumento dell'attitudine fermentativa del lievito. La capacità di fermentazione non è stata influenzata dalla concentrazione di anidride solforosa normalmente utilizzata nella fermentazione del vino (0-30 mg L<sup>-1</sup>). Livelli elevati (60 mg L<sup>-1</sup>) di anidride solforosa hanno avuto, invece, un effetto negativo. Tuttavia, si tratta di una concentrazione molto più elevata di quella normalmente utilizzata in una fermentazione commerciale (N. Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2003c).

È stato anche riportato che *C. pulcherrima* può avere un effetto antagonista su diversi lieviti, compreso *S. cerevisiae*, provocando ritardi di fermentazione. Questo fenomeno è dovuto ad un effetto killer, anche se non lo stesso di quello classico esercitato da *S. cerevisiae*, collegato ad un pigmento prodotto da *C. pulcherrima*. Vi sono prove differenti riguardo alle interazioni tra *C. pulcherrima* e altre specie di lievito, verosimilmente dovute a diversi biotipi all'interno della specie (Pallmann et al., 2001).

### **6.3. *Starmerella bacillaris***

*Starmerella bacillaris* (sinonimo *Candida zemplinina*) (Duarte, Pimentel, Teixeira, & Fonseca, 2012) è un lievito non-*Saccharomyces* isolato per la prima volta sotto il nome di EJ1 da mosti ad alto tenore zuccherino derivati da uve bottrizzate (Mills, Johannsen, & Cocolin, 2002). L'interesse fu suscitato dal fatto che questo ceppo di *Candida* sp. era in grado di fermentare esclusivamente il fruttosio, senza influenzare la concentrazione del glucosio. Successivamente, Sipiczki assegnò questo *Candida* sp. ad una nuova specie con il nome *C. zemplinina*, a causa delle differenze significative osservate per la sequenza di RNA ribosomiale rispetto a quella della specie affine *Candida stellata* (Sipiczki, 2004).

Diversi studi di ecologia hanno segnalato la presenza di questa specie durante la fermentazione spontanea del mosto in diversi Paesi, suggerendo il suo coinvolgimento nel processo di fermentazione (Englezos et al., 2015).

Questa specie è contraddistinta da carattere estremamente fruttosofilo e dalla scarsa resa in etanolo rispetto agli zuccheri consumati (Ildikó Magyar & Tóth, 2011). Si differenzia dagli altri lieviti non-*Saccharomyces* comuni poiché può sopravvivere e resistere fino alla fine della fermentazione alcolica a causa della sua capacità di tollerare alte concentrazioni di etanolo presenti nel vino (Rantsiou et al., 2012). Inoltre, tollera basse temperature ed è associata alla produzione di bassi livelli di acido acetico, acetaldeide e notevoli quantità di glicerolo a partire da zuccheri consumati. Questa tendenza a produrre molto glicerolo è stata individuata come la causa principale per la scarsa capacità fermentativa. Oggi, la nuova conoscenza di tali caratteristiche fisiologiche e molecolari potrebbe contribuire alla comprensione del ruolo di *Starm. bacillaris* nella vinificazione. *Starm. bacillaris* è un lievito non-*Saccharomyces* comunemente presente nel vino e la sua associazione con gli onnipresenti lieviti apiculati (*H. uvarum*/*K. apiculata*) influenza fortemente la composizione analitica del prodotto finale (Tofalo et al., 2012).

In uno studio è stata ricercata la possibilità di impiegare *Starm. bacillaris* come partner di *S. cerevisiae* in fermentazioni miste di mosto ad alto contenuto zuccherino, al fine di ridurre la produzione di acido acetico. Per queste sperimentazioni, sono stati isolati da diverse regioni geografiche 35 ceppi di *Starm. bacillaris* che sono stati caratterizzati mediante tecniche molecolari e dei quali sono state valutate le prestazioni in ambito fermentativo. Da queste prove, sono stati selezionati cinque ceppi da impiegare negli inoculi. Per le fermentazioni miste sono state applicate sia la tecnica del co-inoculo sia quella dell'inoculo sequenziale. Dal monitoraggio delle fermentazioni è emerso che per i primi sei giorni è stato mantenuto un equilibrio tra le due specie di lievito. Oltre questo periodo, *Starm. bacillaris* ha iniziato a diminuire. Sono state osservate differenze rilevanti per quanto riguarda il consumo di zuccheri, il contenuto di etanolo e glicerolo e la produzione di acido acetico, a seconda del ceppo e del metodo di inoculo impiegati. L'inoculo sequenziale ha portato ad una riduzione di circa la metà del contenuto di acido acetico, rispetto alla fermentazione mediante coltura pura di *S. cerevisiae*, ma le quantità di etanolo e glicerolo sono state basse. Uno dei co-inoculi ha invece determinato una riduzione di circa  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  di acido acetico ed, al contempo, il mantenimento di elevati livelli di etanolo e glicerolo. Questo studio dimostra che la fermentazione mista mediante

*S. cerevisiae* e *Starm. bacillaris* potrebbe essere applicata nella fermentazione del vino dolce per ridurre la produzione di acido acetico, collegato alla risposta allo stress osmotico di *S. cerevisiae* (Rantsiou et al., 2012).

#### **6.4. *Hanseniaspora* spp**

È stato ampiamente riportato che le prime fasi della fermentazione alcolica sono caratterizzate dalla crescita di specie non-*Saccharomyces*, che consistono principalmente in lieviti apiculati appartenenti ai generi *Kloeckera* e *Hanseniaspora*. Essi sono diventati oggetto di interesse sempre crescente in quanto, oltre ad essere tra i lieviti più frequentemente presenti sulle uve e nel mosto ad inizio fermentazione, sono in grado di svilupparsi fino a cariche di  $10^6$ - $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> nei primi 4-6 giorni della fermentazione (Zott et al., 2008) instaurando una vera e propria competizione con *S. cerevisiae*.

Le specie di lievito appartenenti al genere *Hanseniaspora* generalmente presentano un basso potere fermentativo ed alcuni ceppi sono noti per produrre concentrazioni di acido acetico, di esteri e di glicerolo superiori a quelle prodotte da *S. cerevisiae*. In contrasto con il parere generale, è stato dimostrato che non tutti i ceppi di *Kloeckera* formano elevati livelli di acidità volatile e che alcuni sono simili a quelli prodotti da *S. cerevisiae* (M Ciani & Maccarelli, 1997). Per quanto riguarda gli altri prodotti secondari che influenzano l'aroma del vino, i lieviti apiculati sono stati indicati come grandi produttori di esteri, di acetoino e di composti solforati pesanti. Questi ultimi composti, formati principalmente durante la fermentazione alcolica, possono contribuire negativamente al profumo di vino; a causa del loro impatto sul profilo organolettico del prodotto (Romano, Suzzi, Zironi, & Comi, 1993). Pertanto, vi è una notevole controversia riguardo l'effetto della crescita dei lieviti apiculati sulla qualità organolettica dei vini (M. Ciani & Picciotti, 1995). Diventa quindi importante assumere un approccio prudente nel caso in cui si decidesse di impiegare *Hanseniaspora* spp. nella produzione di vino.

All'interno di questo genere, le specie maggiormente studiate nei recenti lavori di ricerca comprendono principalmente *H. uvarum* (anamorfico: *Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (anamorfico: *Kloeckera apis*) e *Hanseniaspora osmophila* (anamorfico: *Kloeckera corticis*). Ceppi di tali specie sono stati impiegati come starter in varie prove di fermentazioni miste, al fine di studiarne, tra gli altri aspetti, il contributo in termini di esteri. Infatti, gli esteri acetati quali acetato di etile, acetato di esile, acetato isoamilico e 2-feniletile acetato, sono stati riconosciuti come importanti composti aromatici

nel vino, che possono essere formati in concentrazioni relativamente elevate dai lieviti non-*Saccharomyces* (V. Rojas, Gil, Piñaga, & Manzanares, 2003).

Uno studio ha determinato il contributo fornito dalle specie *H. guilliermondii* e *H. uvarum* alla componente volatile (in particolare alcoli superiori, esteri, acidi grassi e composti solforati pesanti) di vini rossi ottenuti mediante fermentazione con *H. guilliermondii* e mediante fermentazione spontanea. La presenza di lieviti apiculati è stata osservata in entrambe le fermentazioni. Tuttavia, *H. uvarum* è stato l'unico lievito apiculato isolato dalla fermentazione spontanea. I lieviti apiculati hanno dominato la fermentazione fino ad una concentrazione di etanolo del 6% v v<sup>-1</sup> ed hanno mantenuto notevoli livelli fino ad una concentrazione di etanolo pari al 12,5% v v<sup>-1</sup>. Il mosto inoculato con *H. guilliermondii* ha portato alla produzione di vino con concentrazioni più elevate di 1-propanolo, 2-feniletile acetato e 3-(metiltio)propionico, e minori quantità di esanoato di etile, pentanoico, acidi grassi liberi, rispetto al vino risultante dalla fermentazione spontanea (Moreira et al., 2011).

Un altro studio ha, invece, confrontato fermentazioni svolte da *H. guilliermondii* e *H. uvarum* come colture di avviamento pure e miste a *S. cerevisiae*. Le analisi mostrano che la crescita dei lieviti apiculati durante i primi giorni di fermentazione aumenta la produzione di composti desiderabili, come gli esteri, e non può avere un'influenza negativa sulla produzione di alcoli superiori e composti solforati pesanti indesiderati. Inoltre, la crescita dei lieviti apiculati ha prodotto un minore contenuto totale di alcoli superiori nei vini rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae*. Inoltre, i più alti livelli di acetato di 2-feniletile sono stati ottenuti quando *H. guilliermondii* è stato inoculato nei mosti, mentre *H. uvarum* ha causato l'aumento il contenuto di acetato di isoamile nei vini (Moreira, Mendes, Guedes de Pinho, Hogg, & Vasconcelos, 2008).

Entrambi gli studi hanno dimostrato che l'uso di specifici lieviti apiculati in fermentazioni miste può portare alla produzione di vini con diversi profili chimici, sottolineando l'importanza dei lieviti *Hanseniaspora* spp come colture starter miste con *S. cerevisiae* nella vinificazione.

## **6.5. *Zygosaccharomyces* spp**

Il genere *Zygosaccharomyces* è strettamente correlato a *Saccharomyces* ed è da tempo associato alle alterazioni del cibo e delle bevande. In particolare, *Zygosaccharomyces* spp. sono lieviti considerati contaminanti di cantina che producono elevate quantità di acido

acetico e che rappresentano un problema specialmente nelle cantine che producono vini dolci e spumanti. Tuttavia, ricercatori hanno suggerito che la produzione di acido acetico potrebbe essere dovuta a lieviti che presentano una stretta somiglianza con *Zygosaccharomyces*. Nella letteratura più datata, infatti, i lieviti che producono acido acetico sono stati erroneamente identificati come specie *Zygosaccharomyces* (J. Jolly et al., 2006).

D'altra parte, questi lieviti possono essere naturalmente presenti nei mosti in fermentazione e concorrere alla formazione del prodotto finale. È stato osservato che le specie *Z. bailii* e *Zygosaccharomyces fermentati* possiedono caratteristiche utili alla vinificazione. Alcuni ceppi, infatti, producono bassi quantitativi di acido acetico, di acido solfidrico e di anidride solforosa. Settanta ceppi di *Zygosaccharomyces* isolati da mosti di uve sono stati studiati per la loro capacità di produrre alcoli superiori e acetoino in terreno sintetico e mosto d'uva. I ceppi di *Zygosaccharomyces* hanno prodotto generalmente basse quantità di alcoli superiori. All'interno di questo genere, *Z. fermentati* si è comportato diversamente da *Z. bailii* producendo meno isobutanolo nel terreno sintetico e in quantità maggiore nel mosto. *Z. fermentati* non costituivano quantità rilevabili di acetoino in qualsiasi condizione, mentre *Z. bailii* ne ha prodotto esso sia nel terreno sintetico sia nel mosto (Romano & Suzzi, 1993).

Successivi studi hanno ricercato un contributo positivo da parte di *Zygosaccharomyces* spp. alla fermentazione del vino. Questi hanno interessato un ceppo di *Z. fermentati* che produce bassi livelli di acido acetico, acido solfidrico e di anidride solforosa e che possiede un elevato vigore fermentativo ed un ceppo di *Z. bailii* che ha presentato la degradazione dell'acido malico ed una produzione di acido solfidrico generalmente bassa (Romano & Suzzi, 1993). Queste caratteristiche potrebbero apportare benefici alla produzione di vino durante, per esempio, la fase di rifermentazione. In uno studio recente, vini prodotti dalla fermentazione mista con le combinazioni di *Z. bailii/S. cerevisiae* e *Zygosaccharomyces florentino/S. cerevisiae* hanno mostrato un aumento della produzione di polisaccaridi, che può avere un'influenza positiva sul sapore del vino (Paola Domizio et al., 2011).

Un lievito *Z. bailii* commerciale è stato rilasciato appositamente per il riavvio in caso di arresti di fermentazione causati dalla permanenza di fruttosio residuo. Questo ceppo, grazie alla sua natura fruttosofila, può costituire una valida strategia per il trattamento di arresti di fermentazione. Esso può anche essere utile in fermentazioni di mosti provenienti da uve

più mature, quindi ad alto contenuto zuccherino, in cui la concentrazione di fruttosio può superare quella del glucosio all'inizio della fermentazione (Sutterlin, 2010).

## 6.6. *Schizosaccharomyces* spp

I lieviti appartenenti al genere *Schizosaccharomyces* sono microrganismi che fanno naturalmente parte del biota dei mosti, ma che non si sviluppano nelle normali condizioni di vinificazione. Tra questi, le specie *Schizosaccharomyces pombe* e *Schizosaccharomyces malidevorans* sono in grado di metabolizzare l'acido malico ad etanolo in modo molto efficiente (degradazione del 95-99% di acido L-malico in 48 ore) (Gao & Fleet, 1995). Il loro impiego in condizioni di alta densità è stato proposto come disacidificazione biologica dei vini al posto del metodo usuale della fermentazione malolattica, che vede protagonisti i batteri lattici della specie *Oenococcus oeni*.

Tuttavia, per motivi di carattere organolettico, l'uso di *Schizosaccharomyces* non è diventato usuale. Quando è voluta solo una parziale disacidificazione, l'azione dei lieviti *Schizosaccharomyces* deve essere limitata. Esistono, per fare ciò, due possibilità. La prima è quella di effettuare un inoculo misto di *Schizosaccharomyces* e *S. cerevisiae* in diverse percentuali. Questo metodo è difficile da controllare in condizioni industriali poiché la miscelazione di entrambi i lieviti deve essere fatta con grande precisione e, inoltre, può essere difficile da prevedere l'evoluzione della percentuale di entrambi i lieviti durante il processo. La seconda è una procedura di inoculo in due fasi: una prima parziale degradazione da parte di *Schizosaccharomyces* seguita dalla sua rimozione mediante filtrazione e un successivo reinoculo con *S. cerevisiae*. La filtrazione rappresenta il principale svantaggio di questa metodica (Taillandier, Gilis, & Strehaiano, 1995).

Uno studio ha stabilito che l'impiego di questi lieviti come disacidificanti biologici deve avvenire prima della fermentazione alcolica. Infatti, è stato osservato che l'etanolo e l'acido acetico in concentrazioni che possono verificarsi durante la vinificazione, inibiscono in modo non competitivo il trasporto dell'acido L-malico all'interno della cellula di *Sch. pombe* (Sousa, Mota, & Leão, 1995).

In un lavoro cellule di *Sch. pombe* sono state immobilizzate in un gel Ca-alginato e sono state esaminate per l'applicazione nella produzione di vino rosso. Questo biocatalizzatore è risultato essere adatto per la disacidificazione dei mosti rossi e del vino rosso parzialmente fermentato. Né *Sch. pombe* né il sistema di supporto alginato hanno esercitato effetti indesiderati sulla qualità del vino. Anche se questo metodo non è una perfetta alternativa

per la fermentazione malolattica, può migliorare l'armonia di vini con alta acidità (Ildiko Magyar & Panyik, 1989).

Uno studio effettuato in Nuova Zelanda ha sfruttato un ceppo mutante di *Sch. malidevorans* ottenuto mediante mutagenesi con luce ultravioletta. La prova è stata svolta in scala commerciale (1000-4500 L) su mosti di Chardonnay e Cabernet Sauvignon. Questo ceppo è in grado di metabolizzare l'acido malico più rapidamente rispetto al ceppo *wild-type* senza utilizzare notevoli quantità di glucosio e fruttosio. Nelle prime due prove, i succhi sono stati inoculati con *S. cerevisiae*, 33-48 ore dopo l'inoculo del ceppo mutante. Nelle rimanenti due prove, i due lieviti sono stati co-inoculati. L'acido malico è stato completamente degradato entro 21-73 ore. I vini prodotti nelle prove mancavano di evidenti difetti organolettici. Essi sono stati miscelati con vini non disacidificati e venduti al dettaglio come vini varietali (Thornton & Rodriguez, 1996).

### **6.7. *Lachancea thermotolerans***

*Lachancea thermotolerans*, precedentemente noto come *Kluyveromyces thermotolerans*, è un lievito che è stato riscontrato in varie regioni vitivinicole. Esso è caratterizzato da elevata produzione di acido L-lattico, bassa produzione di acidità volatile, produttività moderata di alcol e assenza di produzione di composti sgradevoli (Ribéreau-Gayon et al., 2007). È stato inoltre riportato che questo lievito mostra una vitalità ridotta in colture miste con *S. cerevisiae* (Nissen & Arneborg, 2003). L'interesse nei confronti di questa specie è dettato prevalentemente dalla sua capacità di attuare un'acidificazione biologica dei vini durante la fermentazione alcolica. Esso è suscitato anche dal cambiamento climatico globale e dalle variazioni nelle pratiche viticole ed enologiche che hanno portato a una tendenza verso la riduzione dell'acidità totale dei vini.

Un lavoro condotto in Grecia ha messo in relazione la quantità di acido L-lattico prodotto ed il momento di inoculo di *S. cerevisiae* rispetto a quello di *L. thermotolerans*. Sono state condotte quattro fermentazioni con colture miste. Nella prima coltura, sono stati aggiunti entrambi i lieviti insieme, mentre nelle restanti tre culture *S. cerevisiae* è stato aggiunto 1, 2 e 3 giorni dopo l'inoculo di *L. thermotolerans*. È stato rilevato che la crescita e la sopravvivenza di *L. thermotolerans*, così come la quantità di acido L-lattico prodotto, dipendono dal momento dell'inoculo di *S. cerevisiae*. Inoltre, *L. thermotolerans* ha fornito un'efficace acidificazione durante la fermentazione alcolica. Il mosto, che presentava un pH iniziale di 3,50, è stato effettivamente acidificato (70% aumento dell'acidità titolabile,

diminuzione 0,30 unità di pH) per la produzione massima di 5,13 g L<sup>-1</sup> di acido L-lattico (Kapsopoulou, Mourtzini, Anthoulas, & Nerantzis, 2007).

In un altro lavoro *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* sono stati valutati in fermentazioni simultanee e sequenziali con lo scopo di migliorare l'acidità e la qualità complessiva del vino. Nelle prove il lievito non-*Saccharomyces* ha mostrato un elevato livello di competitività; tuttavia il ceppo *S. cerevisiae* ha dominato la fermentazione anche in condizioni di fermentazione industriale. Le diverse condizioni (modalità di inoculo, temperatura di fermentazione, tipo di mosto) hanno influenzato le interazioni specifiche e il comportamento di fermentazione della co-coltura di *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans*. I profili chimici specifici di questi vini sono stati confermati dal test di analisi sensoriale, che ha rilevato aumenti significativi delle note speziate e in termini di acidità totale (Gobbi et al., 2013).

Una miscela commerciale di lieviti secchi costituita da *L. thermotolerans* (commercializzato come *K. thermotolerans*) e *S. cerevisiae* è disponibile in commercio. Questa combinazione è stata sviluppata per la valorizzazione dell'aroma di varietà di uva bianca (Chardonnay, Pinot Bianco, Pinot Grigio e Riesling) e rossa (Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz e Pinot Nero). Secondo la scheda del prodotto, l'uso di questo lievito in inoculo simultaneo potrebbe portare alla valorizzazione di aromi floreali e di frutta tropicale e sapori più complessi e arrotondati, rispettivamente nel vino bianco e rosso. Tuttavia, i vini Pinot Nero prodotti con questa miscela hanno mostrato una diminuzione dell'aroma di "frutta rossa" rispetto al corrispondente vino di controllo prodotto esclusivamente con *S. cerevisiae* e non sono state riscontrate differenze per la sensazione di speziato (Takush & Osborne, 2012).

## **6.8. *Pichia* spp**

*Pichia anomala* (anamorfico: *Candida pelliculosa*) è una specie non-*Saccharomyces* che ha suscitato interesse per il fatto di esercitare efficacemente un controllo contro le infezioni di muffa, in particolare di *Botrytis cinerea*, sulla vite. Essa, però, è stata anche inclusa tra le specie che più frequentemente contaminano ed alterano le bevande fermentate, in quanto grande produttrice di acetato di etile (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). D'altra parte, i prodotti del metabolismo del glucosio di *P. anomala*, in particolare l'acetato di etile, sono importanti per l'aroma del vino. Il ceppo 112 AL appartenente alla specie *P. anomala* è stato isolato da mosti siciliani e apprezzato grazie alla sua elevata produzione di  $\beta$ -

glucosidasi, enzima essenziale per l'aroma del vino (Fredlund, Blank, Schnürer, Sauer, & Passoth, 2004).

Per esaminare i contributi di questa specie, sono stati isolati dei ceppi mutanti che producono un basso tenore di acetato di etile e sono stati impiegati in fermentazioni di colture miste con *S. cerevisiae*. Le analisi hanno riportato che nelle colture miste con *S. cerevisiae*, il mutante *P. anomala* è morto più rapidamente e ha prodotto minori quantità di acetato di etile rispetto al *wild-type*. Colture miste di *S. cerevisiae* e *P. anomala* hanno mostrato attività più elevate di enzima esterasico rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae* durante la fermentazione. Il profilo sensoriale dei vini ottenuti dal ceppo mutante di *P. anomala* è risultato superiore rispetto a quelli ottenuti dal *wild-type*. È perciò stata proposta un'applicazione di *P. anomala* per migliorare la qualità sensoriale nel vino attraverso colture miste (Kurita, 2008).

*Pichia fermentans* (anamorfico: *Candida lambica*), un altro lievito di interesse vinario, è stato proposto per la fermentazione mista con *S. cerevisiae* da cui è emerso che un'influenza positiva da parte del lievito non-*Saccharomyces* sui diversi composti volatili e sui sottoprodotti di fermentazione è stata mostrata solo nella coltura sequenziale con l'inoculo del *S. cerevisiae* dopo due giorni (Clemente-Jimenez et al., 2004).

Un'altra specie ad interesse enologico è *Pichia kluyveri*. Essa ha instaurato interazioni positive nelle fermentazioni miste anche per quanto riguarda la produzione di tioli. Infatti, la fermentazione mista con *P. kluyveri* e *S. cerevisiae* ha determinato un incremento di 3-mercaptoesil acetato rispetto alle colture pure. Questa interazione sembra essere a livello di ceppo piuttosto che a livello di specie, ma la natura dell'interazione rimane sconosciuta (Anfang et al., 2009). Tuttavia, è stato anche riportato che le tossine killer prodotte da *P. kluyveri* possono inibire alcuni ceppi di *S. cerevisiae* (Middelbeek, Hermans, & Stumm, 1979). Quindi, anche per questa specie occorrono ulteriori approfondimenti volti ad individuare ceppi ottimali in grado di conferire benefici senza ostacolare lo svolgimento del processo fermentativo.

## 7. Conclusioni

Diverse sono le specie utilizzate in sperimentazioni ma non qui esaminate, proprio perché molto ampi sono l'ecologia legata al vino e la quantità di studi effettuati in tutto il mondo al riguardo. Ciò non vuole significare che le parti omesse non abbiano pari importanza o non suscitino altrettanto interesse rispetto a quelle riportate.

Dalla presente ricerca bibliografica è emerso che l'interesse nei confronti delle specie di lieviti diverse da *S. cerevisiae* non è cosa recente, né una moda attuale, bensì la naturale evoluzione di studi concreti e approfonditi effettuati fin dal passato. Già da tempo, i ricercatori hanno portato a risultati insperati legati all'utilizzo di ceppi adatti alle vinificazioni, anche se per alcune specie più "difficili" ulteriori sperimentazioni dovrebbero essere condotte.

È auspicabile, pertanto, che questi risultati positivi raggiungano i produttori e i vinificatori, forse ancora non del tutto preparati ad inoculare nei propri mosti specie che, fino a non molto tempo fa, erano abituati a considerare alteranti. D'altra parte, vi è un grande e recente interesse da parte dei consumatori, e quindi anche da parte dei produttori, nei confronti della componente microbica del vino. Questa situazione potrebbe costituire un punto d'incontro ideale tra comunità scientifica e operatori del settore al fine di apportare modifiche migliorative alle colture di lieviti enologici. Tutto ciò potrebbe sfociare nell'impiego abituale, in diverse realtà produttive, di colture miste di cui fanno parte i lieviti non-*Saccharomyces*, più volte indicati come "lieviti del futuro".

## Bibliografia

- Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of grape and wine research*, 12(2), 119-127.
- Amerine MA, Berg HV, Kunkee RE, Ough CS, Singleton UL, Webb AD (1980). *The technology of winemaking*. Westport, CT: AVI Technical Book Inc.
- Anfang, N., Brajkovich, M., & Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of grape and wine research*, 15(1), 1-8. doi: 10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x
- Arneborg, N., Siegumfeldt, H., Andersen, G. H., Nissen, P., Daria, V. R., Rodrigo, P. J., & Glückstad, J. (2005). Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. *Federation of European Microbiological Societies microbiology letters*, 245(1), 155-159.
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., & Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology*, 235(2), 303-313. doi: 10.1007/s00217-012-1762-3
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312-320. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Caridi, A. (2007). New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 167-172. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.032>
- Castelli, T. (1955). Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6(1), 18-19.
- Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239-245. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 1(0), 1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 10(2), 123-133. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x
- Ciani, M., & Ferraro, L. (1998). Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 247-254.

- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 199-203.
- Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology letters*, *17*(11), 1247-1250. doi: 10.1007/BF00128395
- Clemente-Jimenez, J. M. a., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, *21*(2), 149-155.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(3), 237-243. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, *28*(5), 873-882. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Degre, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine microbiology and biotechnology*, 421-447.
- Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(2), 201-210. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.007>
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., & Barile, D. (2014). Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiology*, *43*(0), 5-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.005>
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *147*(3), 170-180. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Duarte, F. L., Pimentel, N. H., Teixeira, A., & Fonseca, Á. (2012). *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, *102*(4), 653-658. doi: 10.1007/s10482-012-9762-7
- EB s.r.l. Lalvin BRL 97. doi: <http://www.ebsrl.net/node/60>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., & Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology*, *199*(0), 33-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009>
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., & Querol, A. (2010). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*, *1*(2), 143-148.

- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 8(7), 979-995. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- Fredlund, E., Blank, L. M., Schnürer, J., Sauer, U., & Passoth, V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5905-5911. doi: 10.1128/aem.70.10.5905-5911.2004
- Gao, C., & Fleet, G. H. (1995). Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, 12(0), 65-71. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80080-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80080-8)
- Gobbi, M. (2011). *Biotechnologia dei lieviti di interesse enologico per il miglioramento della qualità dei vini*. Tesi Dott., Università Politecnica delle Marche, 220 pp.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271-281. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Heard, G., & Fleet, G. (1986). Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *Journal of applied bacteriology*, 60(6), 477-481.
- Heard, G., & Fleet, G. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of applied bacteriology*, 65(1), 23-28.
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J., & Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 541-547.
- Jolly, J., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27(1), 15.
- Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2003a). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.
- Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2003b). The occurrence of Non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 24(2), 35.
- Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2003c). The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 24(2), 63-69.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 14(2), 215-237. doi: 10.1111/1567-1364.12111
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., & Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic change*, 73(3), 319-343.

- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 735-739. doi: 10.1007/s11274-006-9283-5
- Kluyver, A. J., van der Walt, J. P., & van Triet, A. J. (1953). Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 39(7), 583-593.
- Kurita, O. (2008). Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *Journal Applied Microbiology*, 104(4), 1051-1058. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03625.x
- Kurtzman CP, Fell JW & Boekhout T (2011a) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. *The yeasts, a taxonomic study*, Vol. 1, 5th edn (Kurtzman CP, Fell JW & Boekhout T, eds), pp. 3–5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998b). *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., . . . Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 915-922. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., & Villa, T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 141-144.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 23-50. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Magyar, I., & Panyik, I. (1989). Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(4), 233-240.
- Magyar, I., & Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(1), 94-100.
- Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., & Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 188(0), 83-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>
- Mendoza, L. M., de Nadra, M. C. M., & Fariás, M. E. (2007). Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology letters*, 29(7), 1057-1063.
- Middelbeek, E., Hermans, J., & Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45(3), 437-450.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., & Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in *botrytis*-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4884-4893.

- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231-238. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025>
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22(5), 662-667. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.025>
- Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 180(4), 257-263.
- Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., & Bisson, L. F. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 198-203.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729. doi: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181(0), 85-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Rantsiou, K., Campolongo, S., Alessandria, V., Rolle, L., Torchio, F., & Cocolin, L. (2013). Yeast populations associated with grapes during withering and their fate during alcoholic fermentation of high-sugar must. *Australian Journal of grape and wine research*, 19(1), 40-46. doi: 10.1111/ajgw.12000
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., . . . Cocolin, L. (2012). *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 06768-06711.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2007). *Trattato di enologia: Microbiologia del vino e Vinificazioni*, Edagricole, Bologna.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 283-289. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 181-188. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00255-1
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *Journal of applied bacteriology*, 75(6), 541-545. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01592.x
- Romano, P., Suzzi, G., Zironi, R., & Comi, G. (1993). Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1838-1841.

- Sipiczki, M. (2004). Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of basic microbiology*, 44(6), 471-479.
- Sousa, M. J., Mota, M., & Leão, C. (1995). Effects of ethanol and acetic acid on the transport of malic acid and glucose in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: implications in wine deacidification. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology letters*, 126(2), 197-202.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., & Zhao, Y. P. (2014). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiology*, 44(0), 15-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.007>
- Sutterlin, K. A. (2010). *Fructophilic yeasts to cure stuck fermentations in alcoholic beverages*. University of Stellenbosch.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(2), 139.
- Taillandier, P., Gilis, M., & Strehaiano, P. (1995). Deacidification by *Schizosaccharomyces*: interactions with *Saccharomyces*. *Journal of Biotechnology*, 40(3), 199-205. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00046-S](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(95)00046-S)
- Takush, D., & Osborne, J. (2012). Impact of yeasts on the aroma and flavour of Oregon Pinot Noir wine. *Australian Journal of grape and wine research*, 18(2), 131-137.
- Thornton, R. J., & Rodriguez, S. B. (1996). Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions. *Food Microbiology*, 13(6), 475-482. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1996.0054>
- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., & Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, 29(1), 18-26. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.014>
- van Breda, V., Jolly, N., & van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 80-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., & Henschke, P. A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of grape and wine research*, 15(3), 238-248.
- Zohre, D. E., & Erten, H. (2002). The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry*, 38(3), 319-324. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00086-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00086-9)
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 197-203. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>