

ANNALI
DI
MICROBIOLOGIA
ED ENZIMOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE, AGRARIA, ALIMENTARE,
ECOLOGICA, INDUSTRIALE; DI ENZIMOLOGIA
E DI CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI

VOL. XLV - 1995 - Parte I

Direzione e Amministrazione
VIA CELORIA, 2 - 20133 MILANO

EDITI CON IL CONTRIBUTO DEL CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Prove di vinificazione con *Saccharomyces cerevisiae* in forma secca attiva dotati di diverso potere moloalcolico

C. TORTIA, A. GANDINI*, V. GERBI, J.L. MINATI, G. ZEPPA,
R. CAVALLO, M.S. GRANDO¹

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Sezione di Microbiologia e Industrie agrarie, Università di Torino, Torino, Italy.

¹ Istituto Agrario di San Michele all'Adige - Trento, Italy.

(Received: 5/10/1994 - Accepted: 9/3/1995)

Tortia C., Gandini A., Gerbi V., Minati J.L., Zeppa G., Cavallo R., Grando M.S.: *Wine-making trials with Saccharomyces cerevisiae in active dry form with a different moloalcoholic potential*. Ann. Microbiol. Enzimol., 45, 129-150 (1995).

Some *Saccharomyces cerevisiae* p.r. *cerevisiae* strains in active dry form with different moloalcoholic potential were compared in commercial scale winemaking trials with Barbera and Nebbiolo grapes.

The rate of presence of the selected strain, determined by analysis of the electrophoretic karyotype at different stages of winemaking, is related to the ratio of the number of viable cells inoculated to the number of cells already present in the crushed grapes.

The wines obtained with the more moloalcoholic strain were preferred if tasted when they underwent the only alcoholic fermentation, while after malolactic fermentation significant differences between the wines prepared with the different strains of yeast were not detected. Differences in the rate of malic acid degradation by malolactic bacteria related to the yeast strain which carried out the alcoholic fermentation were observed.

Key words: *Saccharomyces*, moloalcoholic fermentation, wine.

Alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae* in forma secca attiva dotati di diverso potere moloalcolico sono stati confrontati in prove di vinificazione su scala industriale di uve Barbera e Nebbiolo.

La percentuale d'insediamento dei ceppi selezionati, valutata mediante analisi del cariotipo elettroforetico in diverse fasi della vinificazione, è risultata correlata al rapporto tra numero di cellule vitali inoculate e numero di cellule spontaneamente presenti nel pigiato.

I vini ottenuti mediante il ceppo più moloalcolico degustati dopo la sola fermentazione alcolica sono stati preferiti, mentre dopo la fermentazione malolattica non si sono rilevate differenze significative tra i vini elaborati con i diversi ceppi di lievito. Sono state registrate differenze nella velocità di disacidificazione da parte dei batteri malolattici correlabili con il ceppo di lievito che ha attuato la fermentazione alcolica.

Parole chiave: *Saccharomyces*, fermentazione moloalcolica, vino.

* Corresponding author.

Nella vinificazione di uve che, per ragioni varietali o pedo-climatiche, presentano alla raccolta elevati tenori in acido malico può essere opportuno favorire la degradazione microbiologica.

L'acido malico può essere parzialmente demolito da *Saccharomyces cerevisiae* per fermentazione malolattica. La percentuale di degradazione da parte del lievito, pur essendo influenzata da diversi fattori fisico-chimici (1), dipende soprattutto dal ceppo di lievito utilizzato; nel caso si voglia ottenere la parziale degradazione dell'acido malico già durante la fermentazione alcolica è consigliabile inoculare i mosti con un ceppo di lievito selezionato per elevato potere malolattico.

La buona riuscita nell'espressione, da parte del lievito selezionato, di particolari caratteristiche metaboliche è ovviamente condizionata dalla prevalenza del ceppo selezionato sulla microflora spontanea dei mosti la quale, come è noto, è composta oltre che da diverse specie di lievito non-*Saccharomyces*, anche da ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* spontaneamente presenti nei mosti e/o sulle attrezzature di cantina. Nella fermentazione alcolica dei mosti, grazie alla crescente concentrazione in etanolo, la competizione più temibile per il lievito selezionato è proprio quella esercitata dai lieviti della stessa specie (2).

Grazie alla messa a punto di nuove tecniche che permettono l'identificazione di ceppi diversi nell'ambito della specie *Saccharomyces cerevisiae* come l'elettroforesi delle macromolecole esocellulari (3), la marcatura genetica (4, 5), l'elettroforesi delle proteine totali solubili (6), l'elettroforesi dei frammenti di restrizione del DNA mitocondriale (7, 8), l'elettroforesi in campo pulsato del DNA totale (9) e la reazione di polimerizzazione a catena (PCR) (10, 11) è oggi possibile studiare la competizione intraspecifica che si verifica tra i diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sia in fermentazioni spontanee che inoculate con lieviti selezionati (12, 13).

La presente ricerca si propone di confrontare, in prove su scala industriale, alcuni ceppi di *Sacch. cerevisiae* in forma secca attiva del commercio aventi diverso potere malolattico, verificandone le principali caratteristiche enologiche e controllandone l'insediamento nei mosti mediante alcune delle tecnologie di identificazione sopra citate.

Inoltre, siccome da lavori svolti sia da altri Autori (14, 15) che da alcuni di noi (16) risulta che il ceppo di lievito utilizzato nella fermentazione alcolica influisce sulla velocità di inasidamento da parte di *Leuconostoc oenos*, si è voluto quantificare il vantaggio eventualmente conseguibile in termini di anticipo della fermentazione malolattica utilizzando il ceppo più malolattico.

MATERIALI E METODI

Allestimento delle prove di cantina. Le prove sono state svolte nella vendemmia 1992 in due cantine su pigiato di uve Barbera (A e B) ed in una terza cantina su pigiato di uve Nebbiolo (C). Tali vitigni sono stati scelti, oltre che per la loro larga diffusione in Piemonte, per l'elevato tenore in acido malico e per la necessità di demolirlo rapidamente, soprattutto nel caso in cui si desideri un vino da pronto consumo.

Dopo la pigiadiraspatura delle uve, il pigiato ottenuto è stato omogeneizzato in un serbatoio polimero e quindi suddiviso in quattro tesi in recipienti in acciaio

TABELLA 1 - Condizioni operative adottate nelle diverse cantine e principali caratteristiche analitiche dei mosti.

Cantina	A	B	C
Vitigno	Barbera	Barbera	Nebbiolo
Volume recipienti (hl)	50	10	25
Materiale recipienti	cemento rivestito di resina epossidica	acciaio inox	acciaio inox
Stato sanitario delle uve	buono	buono	medio
Data della pigiatura	8 ottobre	10 ottobre	15 ottobre
Temperatura del mosto (°C)	17,5	17	12
SO ₂ (g/hl)	5	3	10
Glucosio (g/l)	69	85	99
Fruttosio (g/l)	74	90	107
Acido malico (g/l)	7,20	5,00	3,60
Acido tartarico (g/l)	7,40	5,85	4,60
Acido citrico (g/l)	0,35	0,36	0,25
pH	3,08	3,09	3,14
Acidità totale (meq/l)	161	130	104
Acidità volatile (g/l acido acetico)	0,10	0,14	0,20

inox o in cemento rivestito di resina epossidica preventivamente sanificizzati. Presso la cantina A sono state effettuate due ripetizioni per ogni tesi (I e II), mentre nelle cantine B e C è stata allestita un'unica ripetizione per ciascuna tesi. Le condizioni operative adottate nelle diverse cantine e le principali caratteristiche dei mosti sono riassunte in Tab. 1.

Il pigiato è stato addizionato di 20 g/hl di sali ammoniacali e tiamina in combinazione ottimale e bilanciata; la dose di anidride solforosa aggiunta, variabile secondo la sanità delle uve, non è mai stata superiore a 10 g/hl.

Tre tesi sono state inoculate ciascuna con un ceppo diverso di *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae* in forma secca attiva mentre una tesi, lasciata fermentare spontaneamente, ha costituito il testimone.

L'eventuale correzione del tenore zuccherino è stata effettuata secondo le modalità normalmente adottate nella cantina.

Alla svinatura, dopo omogeneizzazione, da ogni tesi è stata scorporata un'aliquota di 1 hl ca. in recipienti di PRFY, che, dopo l'esaurimento completo degli zuccheri, è servita per l'allestimento di due sottotesi da 25 l in fusti di acciaio del tipo utilizzato per la distribuzione della birra alla spina.

Delle due sottotesi una (L) è stata inoculata con un preparato di *Leucono-*

Sac. oenos inattivato, mentre l'altra (N) non ha subito inoculo batterico.

Le trentadue sottoceti così allestite nelle diverse cantine sono state trasportate nella cantina sperimentale del D.I.V.A.P.R.A. in modo che la temperatura di conservazione durante la fermentazione malolattica risultasse omogenea per tutte.

Microorganismi

Lieviti. I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in forma secca attiva utilizzati per l'inoculo dei mosti e la relativa vitalità, da noi controllata prima dell'uso, sono riportati in Tab. 2.

I ceppi K1 I.C.V.-I.N.R.A. e D47 I.C.V. sono stati inoculati alla dose di 20 g/l, previa idonea reidratazione.

Data la bassa vitalità del preparato 432 D.I.V.A.P.R.A., questo è stato inoculato alla dose di 30 g/l. Tale scelta è stata dettata dalla necessità di operare in condizioni di inoculo riproducibili a livello industriale, ma nella consapevolezza che la dose inoculata non sarebbe stata sufficiente per avere una carica iniziale uguale a quella ottenuta con i preparati in forma secca attiva degli altri due ceppi.

Batteri lattici. Per l'inoculo di batteri malolattici, è stato utilizzato il preparato di *Leuconostoc oenos* in forma liofilizzata "Inobacter", selezionato presso il Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne.

Tale allestimento è risultato contenere 5×10^8 UFC per grammo.

20 g di preparato batterico sono stati riattivati in mosto diluito, integrato, disacidificato a pH 3,5, pastorizzato e inoculato con lieviti secchi attivi. Si è ottenuto un *piéd de cuve* che, giunto a due terzi di degradazione dell'acido malico, conteneva 4×10^6 UFC/ml di *Leuconostoc oenos* ed è stato inoculato nelle sottoceti L in ragione del 5%.

Analisi microbiologiche. I campioni per il conteggio e l'isolamento dei lieviti sono stati prelevati dal mosto prima dell'inoculo, a 48 h dall'inoculo e alla svinatura.

La carica totale è stata determinata mediante conteggio alla camera contaglobuli di Bürker.

La carica vivente è stata determinata per disseminazione sul mezzo WLN agarizzato, che permette la differenziazione, in base al colore delle colonie, tra i *Saccharomyces* ed altri generi di lieviti (17).

TABELLA 2 - Vitalità dei preparati secchi attivi di *Sacch. cerevisiae r.f. cerevisiae* utilizzati nelle prove di cantina.

<i>Sacch. cerevisiae r.f. cerevisiae</i>	Carica totale per g di preparato	Carica vivente per g di preparato UFC	Vitalità percentuale
K1 I.C.V.-I.N.R.A.	65×10^9	28×10^9	43
D47 I.C.V.	80×10^9	20×10^9	25
432 D.I.V.A.P.R.A.	50×10^9	6×10^9	12

Dopo almeno 48 h di incubazione si è proceduto al conteggio e all'isolamento delle colonie per l'analisi del cariotipo elettroforetico: esse sono state messe in modo randomizzato tra quelle di colore bianco ed in numero pari ad almeno il 25% del totale delle colonie bianche presenti nelle capsule contenenti non più di 100 colonie. Le colture isolate sono state successivamente strisciate su Agar Lisina. L'analisi del cariotipo elettroforetico è stata effettuata solo sui ceppi risultati essere *Saccharomyces cerevisiae*, incapaci di utilizzare la lisina (18).

Per l'identificazione del ceppo K1 I.C.V.-I.N.R.A., marcato geneticamente per la resistenza al diurone e all'veritromicina è stata verificata la crescita su mezzo di coltura N+IMS indicato da Delcel e Aizac (19).

Per la determinazione della carica in batteri lattici dei mosti e dei vini è stato utilizzato il mezzo *M/b* agarizzato secondo Delfini (20) in presenza, in ciascuna capsula Petr., di 0,2 ml di una soluzione contenente 2,5 g/l di pirammina in etanolo al 50%. L'incubazione è avvenuta a 25 °C in anaerobiosi.

Analisi del cariotipo elettroforetico. Per l'estrazione del DNA totale da sottoposte ad elettroforesi in campo pulsato è stato utilizzato il protocollo proposto da Schwartz e Cantor (21) modificato da Grando e Colato (13).

Il riconoscimento dei ceppi è avvenuto mediante confronto del cariotipo elettroforetico degli isolati dai mosti in fermentazione con quello dei ceppi isolati dai preparati secchi attivi utilizzati. I ceppi sono stati considerati diversi quando differivano per almeno una banda.

Prove di laboratorio: confronto tra i diversi ceppi di *Sacch. cerevisiae* riguardo alla produzione di H_2S e di SO_2 .

La prova è stata effettuata in beuta su mosto avente una concentrazione in zuccheri totali di 178 g/l. Per ognuno dei tre ceppi di *Sacch. cerevisiae r.f. cerevisiae* è stata allestita una tesi nel solo mosto ed un'altra in mosto addizionato di 0,3 g/l di solfato ammonico.

I preparati in forma secca attiva sono stati reidratati ed inoculati in modo da apportare 2×10^6 UFC/ml per ogni tesi.

Per rilevare l'eventuale produzione di H_2S le valvole sovrapposte ai recipienti di fermentazione sono state munite di una cartina all'acetato di piombo secondo la metodica riportata da Zambonelli (22).

Dopo 2 e 7 giorni dall'inoculo e ad esaurimento totale degli zuccheri è stata determinata la concentrazione in SO_2 totale.

Analisi chimiche. I principali parametri chimico-fisici sono stati determinati secondo i Metodi Ufficiali CEE.

Gli acidi organici, gli zuccheri ed il glicerolo dei mosti e dei vini sono stati determinati mediante H.P.L.C. secondo Gerbi e Tortia (23).

La concentrazione degli alcoli superiori e di altri composti volatili è stata determinata sui distillati di 100 ml di vino, aggiunti di pentanolo come *standard* interno, mediante gascromatografo Varian 3400 nelle seguenti condizioni operative: colonna J&W DBWAX 30 m - 0,25 mm ID, gas di trasporto H_2 , flusso 1 ml/min, temperatura dell'iniettore 250 °C, rivelatore a ionizzazione di frammento (FID) a 250 °C, temperatura della colonna regolata secondo la seguente programmazione: 35 °C per 3 min, incremento di 3,5 °C al min sino a 180 °C, 180 °C per

1 min, incremento di 10°C al min sino a 200°C, 200°C per 1 min.
La concentrazione in anidride solforosa totale è stata determinata mediante il metodo enzimatico (Bohringer, Mannheim).

Analisi sensoriali. Dato l'elevato numero di campioni, le degustazioni, che sono state eseguite sui vini a fermentazione malolattica ultimata, sono state effettuate soltanto sui campioni inoculati con batteri selezionati (L). Questa scelta è stata dettata dalla necessità di eliminare gli eventuali effetti di ceppi diversi di batteri malolattici, volendo valutare il solo effetto organolettico del lievito selezionato. Per il Barbera vinificato presso la cantina A, che è stato degustato anche dopo la sola fermentazione alcolica, sono state mescolate le ripetizioni I e II.

Nel corso delle degustazioni, compiute da un *panel* di 12 esperti, i vini Barbera e Nebbiolo ottenuti con i diversi ceppi di lievito sono stati confrontati mediante *ranking-test* in cui veniva chiesto di classificare i campioni in ordine di preferenza per i parametri profumo, gusto e giudizio complessivo e di intensità per i parametri colore ed acidità mediante punteggio da 1 a 4, assegnando 1 al campione preferito o giudicato più intenso.

RISULTATI

Prove di cantina. La fermentazione alcolica si è svolta più velocemente nelle tesi inoculate con i ceppi di *Sacch. cerevisiae* r.f. *cerevisiae* D47 I.C.V. e K1 I.C.V.-I.N.R.A., rispetto a quelle inoculate con il ceppo 432 D.I.V.A.P.R.A. ed al testimone (Figg. 1, 2 e 3).

Dopo 48 ore di fermentazione la carica vivente delle tesi aggiunte dei preparati secchi attivi dei ceppi D47 I.C.V. e K1 I.C.V.-I.N.R.A. è risultata maggiore di quella riscontrata nella tesi inoculata con il preparato secco attivo del

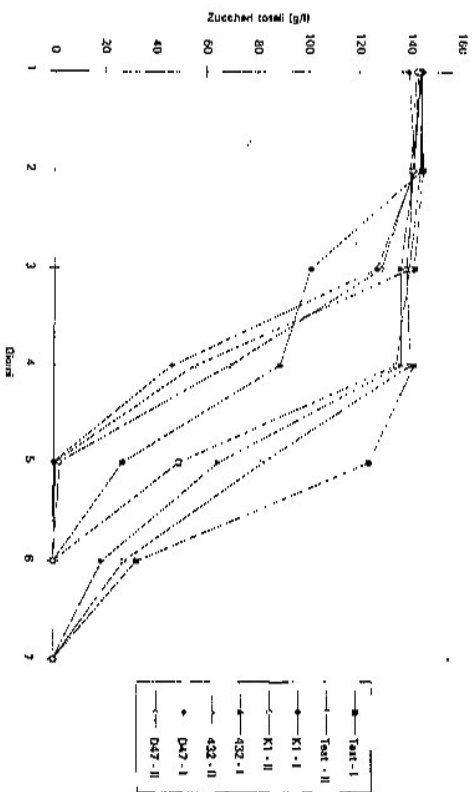


FIG. 1 - Concentrazione in zuccheri totali durante la fermentazione alcolica delle tesi di Barbera vinificate presso la cantina A.

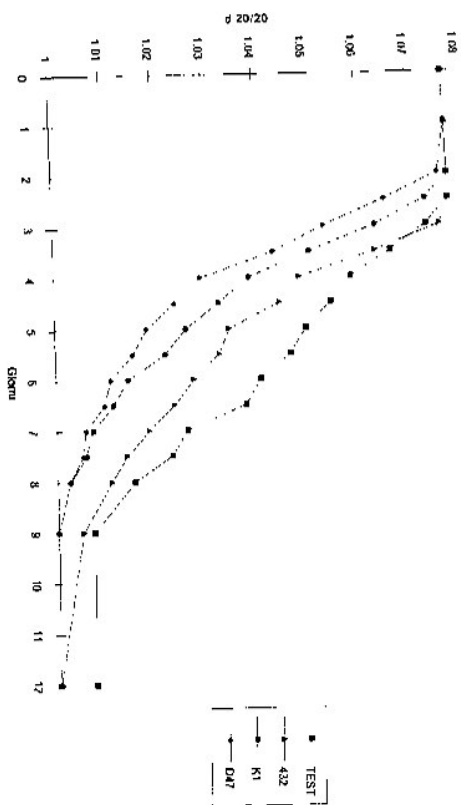


FIG. 2 - Densità del mosto durante la fermentazione alcolica delle tesi di Barbera vinificate presso la cantina B.

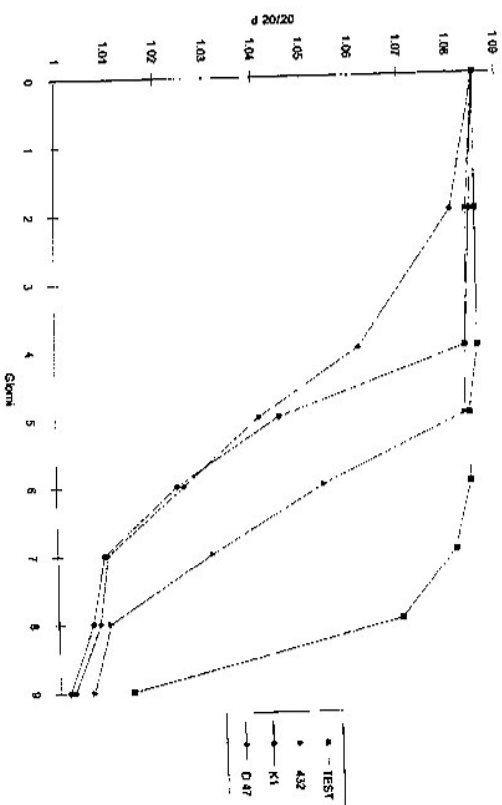


FIG. 3 - Densità del mosto durante la fermentazione alcolica delle tesi di Nebbiolo vinificate presso la cantina C.

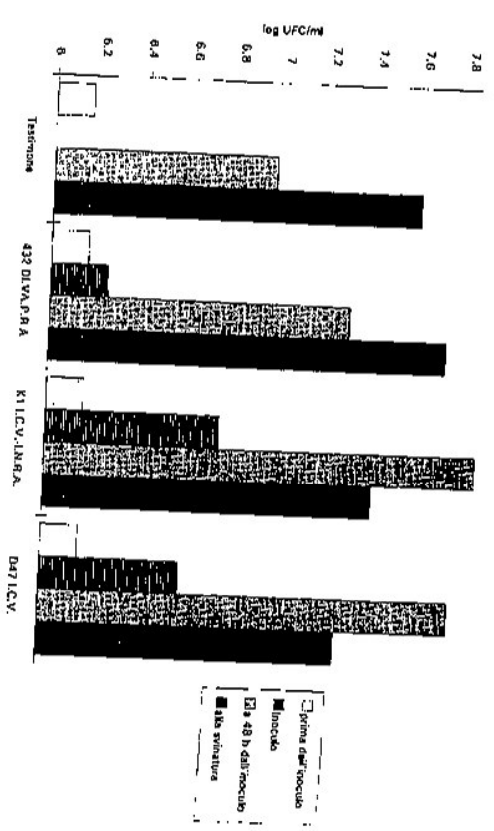


FIG. 4 - Carica blastomicetica vivente in diversi momenti della vinificazione delle tesi di Barbera vinificate presso la cantina A.

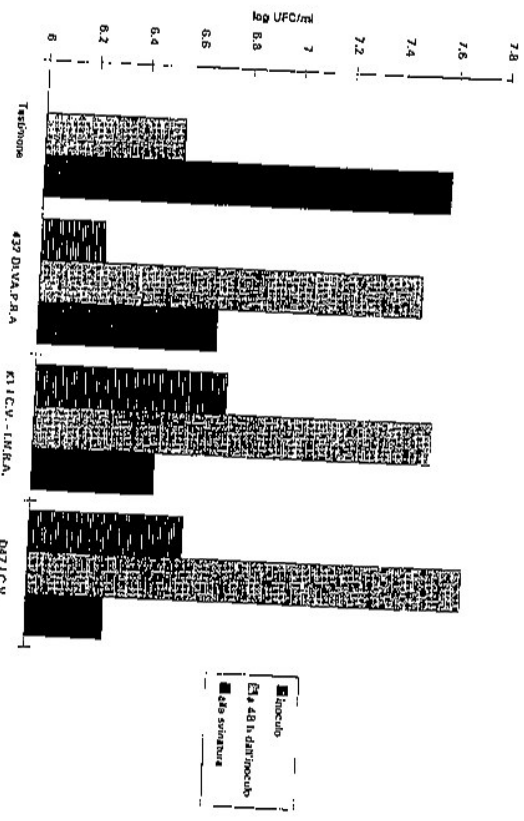


FIG. 5 - Carica blastomicetica vivente in diversi momenti della vinificazione delle tesi di Barbera vinificate presso la cantina B.

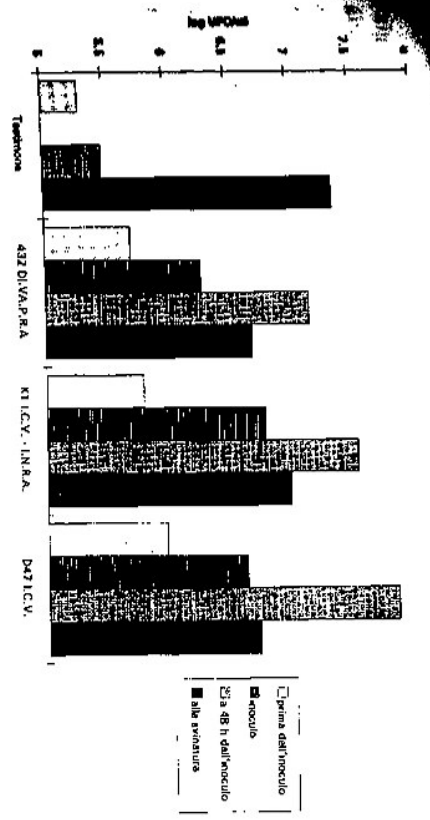


FIG. 6 - Carica blastomicetica vivente in diversi momenti della vinificazione delle tesi di Nebbiolo vinificate presso la cantina C.

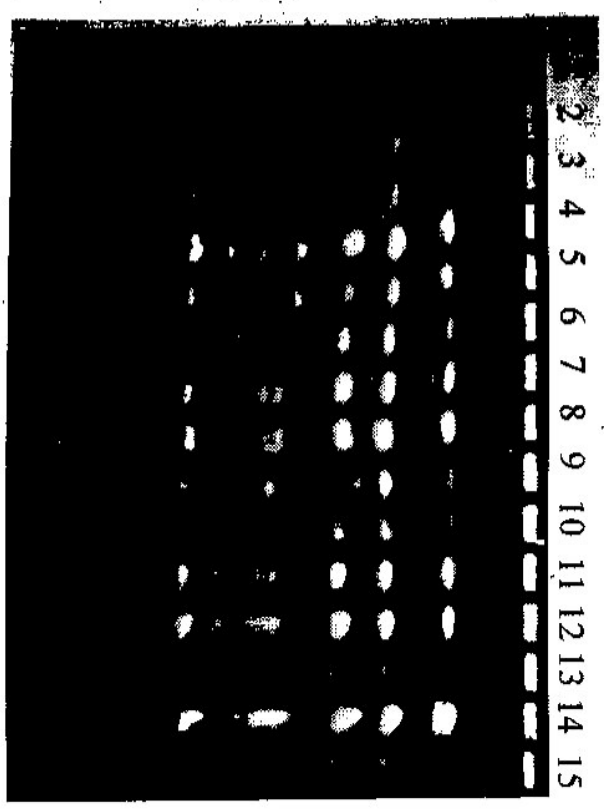


FIG. 7 - Caricipo elettronico dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati nelle prove di cantina: 1: D471C.V. preparato secco all'ivo, 2-5: colture isolate da vasche inoculate con D471C.V.; 6-10 e 14-15: colture isolate da vasche inoculate con 432 DI.VA.P.R.A.; 11: 432 DI.VA.P.R.A. coltura mantenuta presso la collezione del DI.VA.P.R.A.; 12-13: 432 DI.VA.P.R.A. preparato secco all'ivo.

ceppo 432 DI.VA.P.R.A. e di quella rilevata nel testimone. Tale risultato è giustificato in parte dal minore inoculo in cellule vitali effettuato, per i motivi già esposti, nel caso del ceppo 432 DI.VA.P.R.A.. Alla svinatura, le tesi che avevano completato la fermentazione alcolica più velocemente presentavano un minor numero di cellule viventi (Figg. 4, 5 e 6).

I cariotipi dei ceppi 432 DI.VA.P.R.A. e D47 I.C.V. sono risultati ben riconoscibili nelle condizioni operative adottate.

Il cariotipo ottenuto dal preparato in forma secca attiva del 432 DI.VA.P.R.A. è risultato corrispondente a quello mantenuto in coltura pura nella collezione del DI.VA.P.R.A. (Fig. 7).

Limitando l'esame ai *Saccharomyces cerevisiae*, in Tab. 3 è riportata la percentuale di colonie con cariotipo corrispondente a quello del lievito selezionato inoculato ritrovata nei campioni prelevati in diversi momenti della vinificazione per i ceppi D47 I.C.V. e 432 DI.VA.P.R.A.; per il ceppo K1 I.C.V.-I.N.R.A. è riportata la percentuale di colonie capaci di accrescersi su substrato N+IMS.

A 48 ore dall'inoculo il ceppo inoculato ha prevalso sui ceppi della sua stessa specie spontaneamente presenti nel mosto in tutte le tesi.

Tuttavia nelle tesi di Barbera della cantina A che presentavano una carica in lieviti spontanei dell'ordine del milione di UFC/ml, a 48 ore dall'inoculo il ceppo 432 DI.VA.P.R.A. rappresentava poco più della metà delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* presenti nel mosto. Nelle stesse tesi alla svinatura il ceppo inoculato rappresentava una piccola o trascurabile percentuale dei lieviti presenti. Gli altri due ceppi sono invece stati in grado di dominare completamente sulla blastoflora spontanea.

TABELLA 3 - Percentuale del ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* selezionato inoculato ritrovato in diverse fasi della vinificazione. Il dato è riferito al totale dei *Sacch. cerevisiae* presenti nel campione.

Cantina	Tesi	a 48 ore dall'inoculo	
		alla svinatura	
A	432 DI.VA.P.R.A.	I	65
		II	66
	K1 I.C.V. - I.N.R.A.	I	93
		II	100
B	D47 I.C.V.	I	90
		II	100
	432 DI.VA.P.R.A.	I	100
		II	100
C	432 DI.VA.P.R.A.	I	100
		II	100
	K1 I.C.V. - I.N.R.A.	I	88
		II	n.d.

n.d. = non determinato

TABELLA 4 - Caratteristiche analitiche dei vini ottenuti con i diversi ceppi di lievito, analizzati alla fine della fermentazione alcolica. Per la cantina A è riportata la media delle due ripetizioni.

Cantina	A				B				C			
	Test	432	K1	D47	Test	432	K1	D47	Test	432	K1	D47
Acido malico (g/l)	4.81	4.72	4.95	5.39	4.52	3.99	4.41	4.45	3.40	2.79	3.32	3.57
% degradazione dell'acido malico	33,2	34,4	31,2	25,1	9,6	20,2	11,8	11,0	5,5	22,5	7,7	0,8
Acido tartarico (g/l)	4,17	4,06	4,21	4,04	3,3	3,27	3,09	3,23	3,37	3,21	3,35	3,22
Acido citrico (g/l)	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,36	0,36	0,35	0,25	0,25	0,25	0,25
Acido lattico (g/l)	0,19	0,17	0,14	0,18	0,08	0,12	0,08	0,12	0,16	0,18	0,15	0,16
Acidità totale (meq/l)	144	142	148	154	128	126	135	130	106	104	113	116
pH	3,08	3,08	3,08	3,07	3,14	3,15	3,13	3,14	3,33	3,41	3,35	3,37
Acidità volatile (g/l acido acetico)	0,23	0,24	0,23	0,24	0,39	0,33	0,28	0,42	0,46	0,42	0,40	0,36
Alcol etilico (%)	10,0	10,0	10,1	10,1	11,6	11,6	11,9	11,8	11,4	11,4	11,9	11,6

Nelle tesi di Barbera vinificate presso la cantina B si è assistito al predomnio dei ceppi selezionati dopo 48 ore di fermentazione, mentre alla svinatura la loro frequenza si è alquanto ridotta.

Nelle tesi di Nebbiolo, invece, che presentavano una carica indigena iniziale dell'ordine di centinaia di UFC/ml, anche l'inoculo di 432 DI.VA.P.R.A. è stato in grado di sovrapporre la microflora indigena dei mosti.

I risultati ottenuti sono in accordo con quelli di altri Autori (24) che osservarono che quando l'inoculo è 10 volte maggiore della flora indigena la fermentazione è dominata dal ceppo inoculato, mentre nel caso di un inoculo di entità pari alla microflora indigena la frequenza con cui viene ritrovato il ceppo selezionato è inferiore al 50%.

Dopo la fermentazione alcolica i vini ottenuti con i diversi ceppi di lievito differivano principalmente per i parametri chimici correlabili al quadro acido (Tab. 4): il ceppo 432 DI.VA.P.R.A. è sempre risultato il più malolico rispetto agli altri tre ceppi, con percentuali di degradazione variabili tra il 20 ed il 34%. D'accordo con i risultati di Castellani *et al.* (25) e nostri (1) la demolizione dell'acido malico è risultata più intensa in corrispondenza di temperature di fermentazione più elevate.

I ceppi indigeni presenti nei testimoni sono risultati dotati di scarso potere malolico nella cantina C e nella cantina B, mentre quelli della cantina A sono stati in grado di degradare una percentuale di acido malico analoga a quella metabolizzata dal ceppo 432 DI.VA.P.R.A..

Le tesi fermentate con i ceppi selezionati sono risultate dotate di una acidità volatile leggermente minore nelle prove eseguite su Nebbiolo (cantina C); tra le tesi di Barbera vinificate presso la cantina A non sono state rilevate differenze riguardo a tale parametro, mentre presso la cantina B sono stati registrati valori inferiori per i ceppi KI I.C.V.-I.N.R.A. e 432 DI.VA.P.R.A., rispetto al D47 I.C.V. ed al testimone.

Nelle tesi di Barbera (cantine A e B) inoculate con il ceppo 432 DI.VA.P.R.A. alla fine della fermentazione alcolica erano presenti un maggior numero di batteri lattici rispetto alle tesi inoculate con gli altri due ceppi di lievito ed al testimone (Tab. 5).

Nelle sottotesti la cui fermentazione malolattica è stata compiuta dai batteri spontaneamente presenti nei vini (N) sono emerse notevoli differenze riguardo alla velocità di completamento della degradazione malica. Nelle sottotesti la cui fermentazione alcolica era stata compiuta dal ceppo KI I.C.V.-I.N.R.A. è inter-

TABELLA 5 - Carica vivente in batteri lattici nelle diverse tesi alla fine della fermentazione alcolica (UFC/ml).

Cantina	A		B	C
	I	II		
Ripetizione				
Testimone	11	70	1×10^3	$2,8 \times 10^3$
432 DI.VA.P.R.A.	89	5×10^2	4×10^3	$1,5 \times 10^3$
KI I.C.V.-I.N.R.A.	19	2	1×10^3	3×10^3
D47 I.C.V.	29	25	$2,1 \times 10^3$	1×10^3

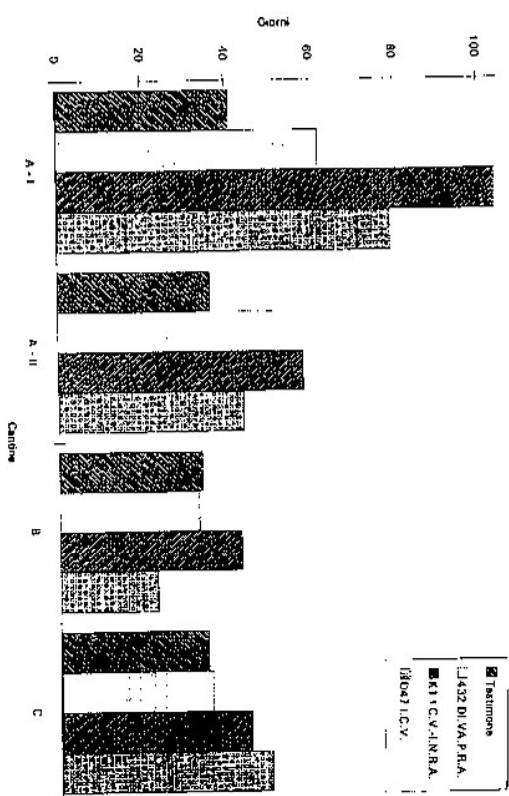


FIG. 8 - Sottotesti a fermentazione malolattica spontanea (N). Giorni intercorsi tra la svinatura e il completamento della fermentazione malolattica.

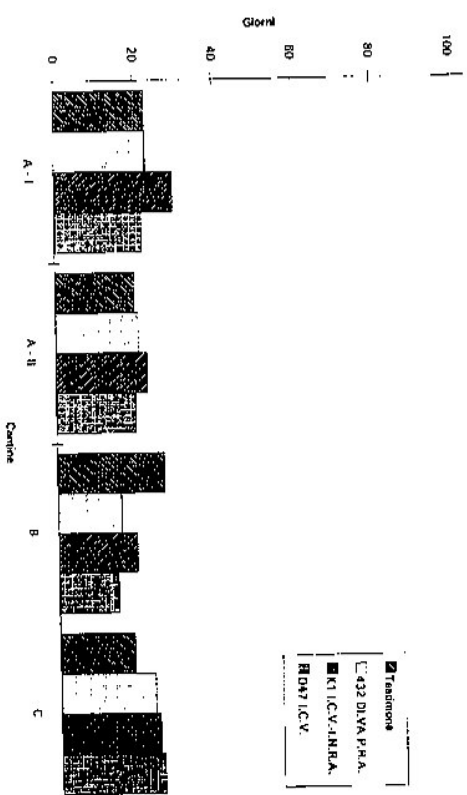


FIG. 9 - Sottotesti inoculate con batteri selezionati (L). Giorni intercorsi tra la svinatura e il completamento della fermentazione malolattica.

corso un maggior periodo di tempo tra la svinatura ed il completamento della fermentazione malolattica rispetto a quelle inoculate con il ceppo 432 DL.VA.P.R.A., ai testimoni e, nelle tesi di Barbera, anche rispetto a quelle inoculate con il ceppo D47 I.C.V.. Le differenze riscontrate tra le due ripetizioni nella cantina A sono imputabili alla disformità di temperatura registrata tra i due gruppi di quattro vasche in cemento, che erano sovrapposte (Fig. 8).

In tutte le sottotesti inoculate con batteri malolattici selezionati (1.) la fermentazione malolattica si è svolta entro 30 giorni. In tali sottotesti non si sono verificate differenze nella velocità di completamento della fermentazione malolattica correlabili con il lievito che aveva condotto la fermentazione alcolica (Fig. 9).

Nelle Tabelle 6 e 7 è riportata la composizione dei vini delle diverse sottotesti a fermentazione malolattica completata. Si rileva una maggior quantità di acido lattico nelle sottotesti in cui era stata demofita una minor quantità di acido malico durante la fermentazione alcolica.

Nelle sottotesti in cui la fermentazione malolattica è stata indotta con batteri selezionati (1.) si rileva una minor concentrazione di acido tartarico, dovuta al fatto che la breve durata della disacidificazione batterica ha permesso di prolungare la stabilizzazione a freddo del vino. La differenza tra l'acidità totale delle diverse sottotesti è dovuta principalmente alla stessa causa.

Non sono state osservate differenze apprezzabili tra l'acidità volatile delle tesi inoculate con batteri malolattici selezionati e quella delle tesi a fermentazione malolattica condotta dai batteri malolattici spontaneamente presenti nei vini.

In alcune tesi la mancata metabolizzazione dell'acido citrico ha determinato una minor produzione di acidità volatile, tuttavia questo fenomeno non è correlabile con il ceppo di lievito utilizzato nella fermentazione alcolica ed è sempre collegato alla fermentazione malolattica spontanea.

Tra le tesi di Barbera (cantine A e B) non sono emerse differenze di rilievo riguardanti l'intensità colorante e la tonalità, gli antociani ed i polifenoli totali, mentre nel Nebbiolo (cantina C) il testimone a fermentazione alcolica operata dai lieviti spontaneamente presenti nel mosto è risultato dotato di una minor intensità colorante e di una minor quantità di antociani e polifenoli.

Le tesi in cui la fermentazione alcolica era stata condotta dal ceppo KI I.C.V.-I.N.R.A. sono risultate contenere tendenzialmente una maggior concentrazione di alcool superiori totali rispetto agli altri due ceppi di lievito selezionato ed ai testimoni (Tab. 8). Questo risultato è in accordo con quanto riferito da alcuni Autori (26) che affermano che a parità di composizione del mosto una maggior velocità di fermentazione determina una maggior ricchezza del vino in alcool superiori. Tuttavia le tesi inoculate con il ceppo D47 I.C.V., la cui fermentazione alcolica è decorsa altrettanto rapidamente, non presentano sempre tali elevati tenori in alcool superiori per cui si può ipotizzare che le differenze di concentrazione di questi composti siano dovute a particolari caratteristiche metaboliche del ceppo KI I.C.V..

Non sono emerse rilevanti differenze a carico del metanolo, dell'aldeide acetica, del diacetile, del lattato e dell'acetato di etile tra le diverse tesi (dati non riportati).

Nelle degustazioni effettuate sui vini Barbera della cantina A dopo la sola fermentazione alcolica la tesi inoculata con il ceppo 432 DL.VA.P.R.A. e

TABELLA 6 - Principali caratteristiche analitiche delle sottotesti di Barbera vinificate presso la cantina A a fermentazione malolattica ultimata (valori medi delle due ripetizioni).

	Cantina A							
	Testimone		432 DL.VA.P.R.A.		KI I.C.V. - I.N.R.A.		D47 I.C.V.	
	L	N	L	N	L	N	L	N
Acido malico (g/l)	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido tartarico (g/l)	2,33	2,32	2,35	2,60	2,43	2,80	2,34	2,57
Acido citrico (g/l)	0	0	0	0,12	0	0,20	0	0,12
Acido lattico (g/l)	3,30	3,40	3,14	3,22	3,29	3,27	3,66	3,67
Acidità totale (meq/l)	84	85	84	87	86	92	87	91
pH	3,19	3,22	3,18	3,21	3,19	3,22	3,19	3,23
Acidità volatile (g/l ac. acetico)	0,53	0,49	0,51	0,49	0,53	0,46	0,53	0,50
Alcol etilico (% v/v)	9,8	9,7	9,9	10,0	10,0	10,1	9,9	9,9
Estratto totale (g/l)	24,6	24,6	24,2	25,2	24,6	26,0	23,8	24,0
Ceneri (g/l)	1,99	2,05	1,98	2,11	2,02	2,22	1,95	2,09
Alcalinità delle ceneri (meq/l)	22,2	23,5	22,7	24,6	24,7	26,3	22,5	24,5
Intensità colorante	1,81	1,95	2,05	2,13	1,90	2,05	1,66	2,18
Tonalità	0,78	0,81	0,73	0,71	0,77	0,72	0,80	0,79
Antociani (mg/l malvina)	78	72,5	76	69	83	75	76	70
Polifenoli totali (g/l ac. gallico)	0,78	0,81	0,84	0,86	0,85	0,85	0,77	0,81

Cantina	Testi	1-Propanolo				2-Metil-1-propanolo				2-Metil-1-butanolo				3-Metil-1-butanolo				Alcooli superiori totali					
		L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N				
A	Testi	22	28	28	22	64	67	61	62	234	230	387	388	387	383	L	N	L	N	L	N	L	N
		432 DI.VA.P.R.A.	29	29	65	60	60	60	60	233	230	387	388	387	383								
	K1 I.C.V.	29	29	67	60	60	60	60	235	235	387	387	387	387	L	N	L	N	L	N	L	N	
		432 DI.VA.P.R.A.	30	30	67	60	60	60	235	235	387	387	387	387									
	D47 I.C.V. - I.N.R.A.	29	29	47	64	64	64	64	275	242	416	423	416	366	L	N	L	N	L	N	L	N	
		432 DI.VA.P.R.A.	29	29	49	64	64	64	280	242	416	423	416	366									
	B	Testi	6	17	50	53	40	50	53	205	205	304	328	328	304	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	17	17	50	53	53	53	208	205	304	328	328	304								
		K1 I.C.V.	7	23	55	55	37	55	55	230	254	395	395	329	333	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	7	23	55	55	37	55	230	254	395	395	329	333								
		D47 I.C.V. - I.N.R.A.	10	23	44	55	27	44	55	223	223	315	386	386	315	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	10	23	44	55	27	44	55	223	223	315	386	386								
C		Testi	4	16	18	23	23	29	53	214	214	294	344	344	294	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	16	16	18	23	23	29	53	230	214	294	344	344								
		K1 I.C.V.	18	21	28	37	37	37	52	184	184	280	280	280	280	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	18	21	28	37	37	52	184	184	280	280	280	280								
		D47 I.C.V. - I.N.R.A.	27	31	31	27	27	31	71	254	266	396	400	399	376	L	N	L	N	L	N	L	N
			432 DI.VA.P.R.A.	27	31	31	27	27	31	71	266	396	400	399	376								

n.d. = non determinato.

TABELLA 8 - Concentrazione dei principali alcooli superiori nelle diverse sottostesi dopo la fermentazione malolattica (mg/l).

Cantina	Testi	1-Propanolo				2-Metil-1-propanolo				2-Metil-1-butanolo				3-Metil-1-butanolo				Alcooli superiori totali								
		L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N							
Barbera	Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Nebbiolo	Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cantina		Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Barbera	Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nebbiolo		Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Testi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELLA 7 - Principali caratteristiche analitiche delle sottostesi vinificate presso le cantine B e C a fermentazione malolattica ultimata.

quella inoculata con il KI I.C.V.-I.N.R.A. sono state preferite in modo significativo alle altre due tesi. Le tesi fermentate con il ceppo KI I.C.V.-I.N.R.A., inoltre, sono risultate significativamente più gradite sia al profumo che al gusto (Fig. 10).

Nei vini Barbera ottenuti presso la stessa cantina A e in quelli ottenuti presso la cantina B degustati dopo la fermentazione malolattica non sono state riscontrate differenze significative tra i vini ottenuti con i diversi ceppi di lievito.

Tra le tesi di Nebbiolo sono state significativamente preferite quelle inoculate con i ceppi KI I.C.V.-I.N.R.A. e D47 I.C.V. Quelle inoculate con il ceppo KI I.C.V.-I.N.R.A. sono anche state giudicate significativamente dotate di gusto e profumo migliori. Le tesi inoculate con i ceppi KI I.C.V.-I.N.R.A. e D47 I.C.V. sono state inoltre giudicate significativamente più colorate (Fig. 11).

Prove di laboratorio: confronto tra i diversi ceppi di Sacch. cerevisiae riguardo alla produzione di H₂S e di SO₂.

I tre ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae* in purezza hanno prodotto SO₂ già nelle prime fasi della fermentazione. Il ceppo KI I.C.V.-I.N.R.A. è risultato il maggior produttore di SO₂, mentre i ceppi 432 DI.V.A.P.R.A. e D47 I.C.V. ne hanno prodotta circa la metà. Non sono state riscontrate differenze di rilievo tra le tesi in mosto e quelle in mosto aggiunto di 0,3 g/l di solfato ammonico (Fig. 12).

Questa maggior produzione di solfiti da parte del ceppo KI potrebbe spicgarci, almeno in parte, la sua azione inibente sugli agenti della fermentazione malolattica.

Per quanto riguarda la produzione di H₂S, già a 48 ore di fermentazione le cartine all'acetato di piombo poste nelle valvoline delle tesi inoculate con il ceppo KI I.C.V. risultavano annerite. Di queste, la tesi priva di solfato ammonico presentava un imbrunimento meno intenso.

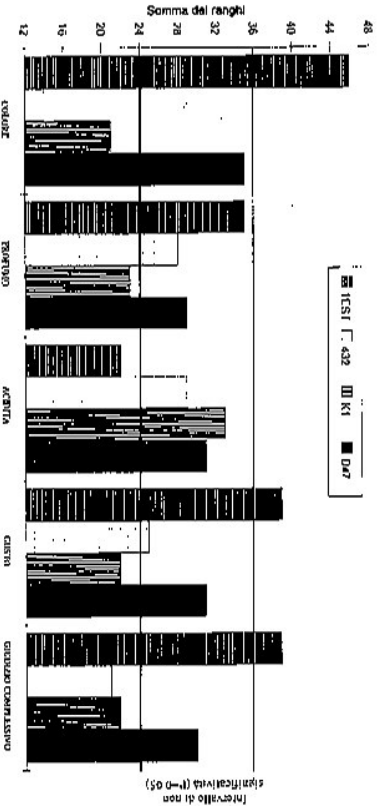


FIG. 10 - Risultati del ranking test compiuto sulle tesi di Barbera della cantina A dopo la sola fermentazione alcolica. I campioni sono stati classificati in ordine di preferenza per i parametri profumo, gusto e giudizio complessivo e di intensità per i parametri colore ed acidità.

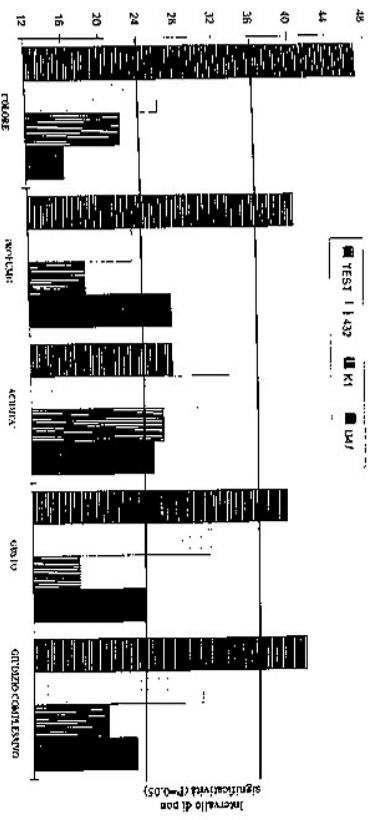


FIG. 11 - Risultati del ranking test compiuto sulle tesi di Nebbiolo della cantina C a fermentazione malolattica ultimata; sottotesti inoculate con batteri selezionati (L.). I campioni sono stati classificati in ordine di preferenza per i parametri profumo, gusto e giudizio complessivo e di intensità per i parametri colore ed acidità.

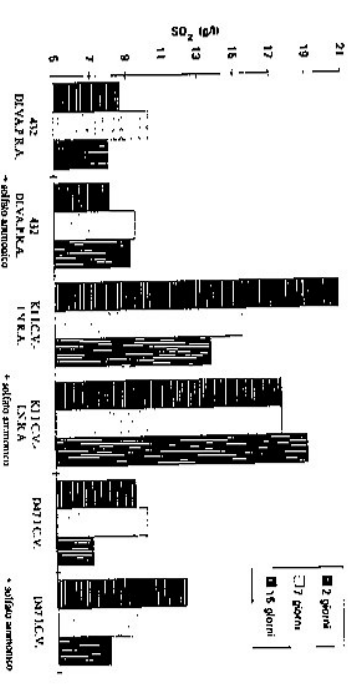


FIG. 12 - Concentrazione in anidride solforosa totale dopo 2, 7 e 15 giorni di fermentazione alcolica delle tesi inoculate con i diversi ceppi di lievito.

La produzione di H₂S è risultata nulla per il ceppo D47 I.C.V. e modesta per il ceppo 432 DI.V.A.P.R.A.

CONCLUSIONI

Mediante l'inoculo con il preparato in forma secca attiva del ceppo 432 DI.V.A.P.R.A. è stato possibile ottenere nei vini Barbera e Nebbiolo una buona percentuale di degradazione dell'acido malico durante la fermentazione alcu-

licia, il che ha influito positivamente sulle caratteristiche del vino degustato prima che avvenisse la fermentazione malolattica.

Nei vini ottenuti mediante l'inoculo dei preparati secchi attivi dei ceppi 432 DI.VA.P.R.A. e D47 I.C.V., la fermentazione malolattica attuata dai batteri spontaneamente presenti nel vino è avvenuta più rapidamente rispetto a quelli in cui la fermentazione alcolica è stata dominata dal ceppo K1 I.C.V.-I.N.R.A..

Tuttavia il preparato secco attivo del 432 DI.VA.P.R.A. presenta una bassa vitalità e, nonostante ne sia stata inoculata una dose maggiore rispetto agli altri due preparati, il ceppo selezionato è stato ritrovato con minor frequenza durante la fermentazione.

La minor carica vivente inoculata ha anche determinato una minor velocità di fermentazione del 432 DI.VA.P.R.A. rispetto agli altri due ceppi. Tale ceppo è risultato tendenzialmente autolisogeno: questa proprietà lo rende poco indicato alla produzione allo stato secco a causa della modesta vitalità. Di conseguenza con questo e altri lieviti analoghi devono essere allestite dall'operatore di cantina idonee preculture al momento dell'impiego (27).

Volendo sfruttare a pieno il potere malolattico del 432 DI.VA.P.R.A. si consiglia di preparare un mosto d'avviamento costituito da un decimo del mosto che si intende inoculare aggiunto della dose di lieviti necessaria complessivamente.

Allo starter in piena fermentazione posto al fondo della vasca sarà aggiunto il pigriato man mano che viene ottenuto, in modo da favorire il predominio del ceppo selezionato sulla microflora spontanea.

Si ringraziamo dirigenti e tecnici della Società Cooperativa Antica Contea di Castelvero, Castelbolognese (AT), dell'Azienda Agricola Cereale, Alba (CN) e delle Cantine Batasiolo, La Morra (CN) per l'interesse, l'ampia disponibilità e la fattiva collaborazione all'esecuzione delle prove.

Si ringrazia la Lallemand Inc. Succursale Italiana per aver messo a disposizione i preparati di lieviti secchi attivi, di batteri malolattici liofilizzati e gli attivatori di fermentazione.

Si ringrazia infine il Dott. Quirico Migheli per la guida fornita all'ottenimento e allo studio dei cariotipi di Saccharomyces cerevisiae.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Tortia C., Gerbi V., Gandini A.: *Impiego di Saccharomyces cerevisiae malolattici in vinificazione*. *Vignevini*, **20**, 7-8, 15-20 (1993).
- (2) Heard G.M., Fleet G.H.: *Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** (3), 727-728 (1985).
- (3) Bouix M., Lèveau J.Y., Guinier C.: *Détermination de l'origine des levures de vinification par une méthode de différenciation fine des souches*. *Com. Vigne Vin*, **15**, 41-52 (1981).
- (4) Vezinhet F.: *Le mariage génétique de souches de levures oenologiques*. *Rev. Fr. Oenol.*, **25**, 97, 47-51 (1985).
- (5) Petering J.F., Henschke P.A., Langridge P.: *The Escherichia coli β -glucuronidase gene as a marker for Saccharomyces yeast strain identification*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42** (1), 6-12 (1991).

- (6) Van Vuuren H.J.J., Van der Meer L.: *Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 49-53 (1987).
- (7) Hallet J.N., Carnegie B., Zucca J., Poulard A.: *Caractérisation de différentes souches industrielles de levures oenologiques par les profils de restriction de leur ADN mitochondrial*. *Prog. agric. vitic.*, **105**, 328-333 (1988).
- (8) Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D.: *Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (9), 2948-2953 (1992).
- (9) Blondin B., Vezinhet F.: *Identification de souches de levures oenologiques par leurs cariotypes obtenus en électrophorèse en champ pulsé*. *Rev. Fr. Oenol.*, **28** (115), 7-11 (1988).
- (10) Lavallée F., Salvay Y., Lamy S., Thomas D.Y., Degreé R., Dulau L.: *PCR and DNA fingerprinting used as a quality control in the production of wine yeast strains*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45** (1), 86-91 (1994).
- (11) Masurel L., Dubourdieu D.: *Comparaison de deux techniques d'identification de souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique: réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des cariotypes (électrophorèse en champ pulsé)*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28** (2), 153-160 (1994).
- (12) Fretier V., Dubourdieu D.: *Ecology of yeast strains Saccharomyces cerevisiae during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43** (4), 375-380 (1992).
- (13) Grandio M.S., Colato L.: *Polimorfismo del cariotipo elettroforetico in lieviti Saccharomyces cerevisiae di interesse enologico*. *Vignevini*, **21**, 5, 57-61 (1994).
- (14) Avedowech R.M., McDaniel M.R., Watson B.T., Sandine W.E.: *An evaluation of combination of wine yeast and Leuconostoc oenos strains in malolactic fermentation of Chardonnay wine*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43** (3), 253-260 (1992).
- (15) Guertzojn M.E., Gandini F.: *Interazione tra lieviti e batteri lattici nella conversione dell'acido malico nei vini*. *Ind. bevande*, **17**, 239-245 (1988).
- (16) Gerbi V., Mirani J.L., Terrone S., Gandini A.: *Impiego di Saccharomyces malolattici nella vinificazione di uve piemontesi ad elevata acidità*. *Piemonte Agricoltura*, **13** (4), 3-8 (1989).
- (17) Gavazza A., Grandio M.S., Zini C.: *Controllo della purezza fermentativa: I lieviti non-Saccharomyces*. *Biologia Oggi*, **6** (1-2), 267-278 (1992).
- (18) Heard G.M., Fleet G.H.: *Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation*. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 477-481 (1986).
- (19) Dellel D., Arzac T.: *Comparaison de différentes techniques de levurage par suivi de l'implantation d'une souche de levure oenologique marquée*. *Rev. Fr. Oenol.*, **28** (113), 11-18 (1988).
- (20) Delfino C.: *Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. I° Contributo: Isolamento e identificazione tassonomica di stipti di batteri lattici dotati dell'attività a svolgere la fermentazione malolattica nei vini acidi*. *Vignevini*, **10** (10), 67-74 (1983).
- (21) Schwartz D.C., Cantor C.R.: *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. *Cell*, **37**, 67-75 (1984).
- (22) Zambonelli C.: *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Ed. Edagricole. Bologna (1988).
- (23) Gerbi V., Tortia C.: *Monitoraggio di zuccheri, etanolo, glicerolo e acidi principali nel corso di fermentazioni alcoliche mediante H.P.L.C.*. Atti della giornata di studio "La tecnica H.P.L.C. come strumento di studio e di controllo di qualità in enologia", Università Cattolica S. Cuore, Piacenza (1991).

- (24) Loiseau G., Vezinhet F., Valade M., Veres A., Cuinier C., Delleil D.: *Contrôle de l'efficacité du levurage par la mise en oeuvre de souches de levures oenologiques marquées*. Rev. Fr. Oenol., **106**, 29-36 (1987).
- (25) Castellari L., Petrucci M., Magrini A., Zambonelli C.: *La correzione microbiologica della composizione dei vini*. Vignevini, **20** (7-8), 21-25 (1993).
- (26) Amati A., Carnacini A., Zironi R.: *Influenza delle tecniche di vinificazione sui componenti volatili dei vini prodotti in ambienti temperati*. Proceedings of the International Symposium: "The aromatic substances in grapes and wines", S. Michele all'Adige, pp. 159-182 (1987).
- (27) Giudici P., Zambonelli C., Passarelli P., Grazia L., Tini V., Castellari L.: *La capacità autoolitica dei lieviti e la qualità dei vini*. Vitivinicoltura, **20** (1), 34-39 (1994).