

Microbiologia e biotecnologia enologica

I lieviti

I lieviti sono funghi unicellulari che si moltiplicano per gemmazione, fatta eccezione per quelli che appartengono al genere *Schizosaccharomyces*, che si riproducono per scissione. I lieviti sono caratterizzati dal possedere forme molto diverse, sulla base delle quali possiamo avere:

- forme **a limone**: tipiche degli apiculati
- forme **sferiche**: *Saccharomyces cerevisiae*
- forme **ellittiche** e **a pera**: alcune specie del genere *Saccharomyces*
- forme **ovali allungate**: *Saccharomyces pastorianus*
- forme **grandi allungate**: formanti un rudimentale micelio come *Schizosaccharomyces pombe*
- forme **rotonde**: contenenti globuli di grasso come *Metschnikowia pulcherrima*
- forme **allungate strette**: formanti catene ramificate come il genere *Candida*, responsabile della fioretta dei vini.

La forma e la morfologia dei lieviti è determinata dal tipo di gemmazione, che può essere:

- **monopolare**
- **bipolare**
- **multilaterale**

Nel punto in cui avviene la gemmazione si viene a formare una cicatrice, in corrispondenza della quale non può aver luogo un'altra gemmazione, determinando di conseguenza il verificarsi di un numero massimo di gemmazioni. Un altro aspetto molto importante, riguarda la formazione di pseudomiceli a partire da una gemma che formerà poi un glomerulo di cellule tutte attaccate. Tutte queste osservazioni permettono di avere ulteriori informazioni ai fini della tassonomia, infatti i lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* non formano alcun micelio, mentre quelli del genere *Candida* lo formano. Altre informazioni tassonomiche possono provenire dalle **spore**, che possono essere:

- filiformi o ad ago: *Metschnikowia*
- a saturno: generi *Pichia* e *Hansenula*
- sferoidali: *Saccharomyces*, presenta spore con parete liscia, *Debariomyces* presenta spore con parete rugosa
- a cappello: generi *Pichia* e *Hansenula*

Alcuni lieviti hanno inoltre la capacità di formare delle strutture molto resistenti denominate **artrospore**, le quali non sono delle vere e proprie spore, ma cellule vegetative che ispessiscono la parete, assumono forma rettangolare e diventano particolarmente resistenti a diverse situazioni critiche. Sono tipiche del genere *Trichosporon*. Riguardo le spore, bisogna sottolineare che le spore dei lieviti sono diverse da quelle batteriche. Infatti le spore dei lieviti sono i gameti della cellula-lievito. Queste spore sono infatti aploidi e per coniugazione possono dare uno zigote diploide. Non tutti i lieviti producono spore, infatti abbiamo lieviti sporigeni e asporigeni. In realtà in questi ultimi le spore non sono mai state osservate ma è probabile che in particolari condizioni essi le producano. Anche la superficie della spora può essere un carattere utile per la tassonomia, se infatti la superficie della spora è liscia, siamo in presenza ad esempio di *Saccharomyces*, se è rugosa abbiamo il genere *Debariomyces*.

I lieviti possono presentare delle strutture particolari dette **pseudomiceli** (falso micelio), poiché tra le cellule non esistono setti divisorii come nelle ife miceliari. Essi si vengono a formare quando la gemma rimane attaccata alla cellula-madre, quindi le due cellule (madre e figlia) producono gemme addizionali, il cui risultato finale è una catena o un ammasso di cellule denominato pseudomicelio.

Classificazione

Consiste nell' eseguire:

1. **analisi morfologica macroscopica**, al fine di osservare:
 - a. **forma**: puntiforme, circolare, irregolare, ecc.
 - b. **colore**: il rosso ad esempio è tipico di *Rhodospiridium*
 - c. **bordi della colonia**: se frastagliati sono tipici di lieviti produttori pseudomiceli
2. **analisi dei caratteri colturali**: cioè se si tratta di un lievito filmogeno, flocculento, ecc.
3. **analisi dei caratteri fisici**: come vengono usati i composti del C (glucosio, fruttosio, galattosio), quelli dell'N (NH₃)
4. **analisi della riproduzione**: agamica nei Deuteromiceti, gamica o agamica negli Ascomiceti.

Il genere è definito sulla base di un'osservazione microscopica delle singole cellule.

Lieviti di interesse enologico

Sono tutti dei funghi appartenenti alla divisione degli *Eumycota* ed alla sottodivisione degli *Ascomycotina*.

CLASSE: *Archiascomycetes*

❖ Ordine: *Schizosaccharomycetales*

➤ Famiglia: *Schizosaccharomycetaceae*

- Genere *Schizosaccharomyces*: si riproduce per scissione agamica, le cellule sono da globose a cilindriche, possibile formazione di pseudocife e dunque di pseudomicelio; gli aschi derivano dalla coniugazione di due cellule aploidi. Le ascospore possono essere sferiche, reniformi o ovoidali. Il metabolismo è di tipo fermentativo con bassa produzione di alcol. È responsabile della fermentazione maloalcolica. È il lievito che ha come ecosistema tipico i succhi di frutta. Le specie più importanti sono: *S. Pombe*, *S. Japaniensis*, *S. Malidevorans* e *S. Octosporus*.

CLASSE: *Hemiascomycetes*

❖ Ordine: *Saccharomycetales*

➤ Famiglia: *Metshnikowiaceae*

- Genere *Metshnikowia*: cellule sferiche, spore aghiformi. Non forma pseudomiceli. Il suo metabolismo è impuro di tipo ossidativo-fermentativo. Presente nell'ecosistema vigna. Nei mosti sani raggiunge una concentrazione di $10^3/10^4$ cellule/ml, in quelli malati tale concentrazione sale intorno alle 10^5 cellule/ml. Modesta produzione di alcol, 3–6 % e alta produzione di acido acetico. La specie più importante è la *Metshnikowia Pulcherrima*.

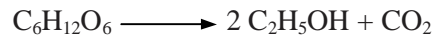
➤ Famiglia: *Saccharomycetaceae*

- Genere *Debaryomyces*: cellule globose. Si riproduce per gemmazione multilaterale, partecipa ai processi di maturazione di salumi e formaggi. Si differenzia dal genere *Saccharomyces* per la rugosità delle spore.
- Genere *Dekkera*: cellule ovali. Gemmazione multilaterale. Gli aschi contengono da 1 a 4 spore. Può formare pseudomicelio. Il suo metabolismo è di tipo fermentativo con grosse produzioni di acido acetico. Vengono considerate le forme perfette di *Brettanomyces Bruxellensis* e *Intermedium*.
- Genere *Kluyveromyces*: molto importante in enologia in quanto è un **lievito starter**. Questi lieviti vengono utilizzati per effettuare le fermentazioni scalari, in cui vengono inoculate nel mosto elevate quantità di lievito (circa 10^6 cellule/ml) in modo che esse prendano il sopravvento sugli altri microrganismi spontanei. Gli aschi possono rompersi e liberare ulteriori spore. Bassa produzione di alcol ma altrettanto bassa produzione di acido acetico: per questo il suo utilizzo nelle fermentazioni scalari.
- Genere *Pichia* e *Hansenula*: cellule sferiche, produce pseudomiceli. Gli aschi arrivano a contenere sino a 4 ascospore di forma sferica, a cappello o a saturno. Possono avere metabolismi fermentativi e non. Sono molto simili sia morfologicamente che funzionalmente. Le specie più importanti sono:
 - *Pichia Membranaefaciens* e *Hansenula Anomala*: la loro importanza è legata al fatto che sinergicamente ad alcune specie del genere *Candida* sono responsabili della **fioretta**.
- Genere *Saccharomyces*: le cellule possono essere globose, ellittiche o cilindriche; gemmazione multilaterale. Gli aschi si formano senza preventiva coniugazione e contengono da 1 a 4 spore globose o ellittiche a parete liscia. Alto vigore fermentativo e notevole importanza enologica.
 - Specie *Saccharomyces Cerevisiae*: le cellule possono presentarsi singole appaiate o concatenate al termine dello sviluppo nei mezzi liquidi, in tali condizioni esse sedimentano ma talvolta formano una pellicola superficiale. È il lievito più importante in enologia e può essere impiegato in tutte le fasi della vinificazione grazie a:
 - Elevato vigore fermentativo
 - Elevato potere alcoligeno
 - Elevata resistenza agli antisettici
 - Elevata adattabilità alle diverse condizioni
 - Specie *Saccharomyces Bayanus*: questo lievito non si sviluppa in presenza di una temperatura di 37 °C. Basso potere alcoligeno. Usato per la rifermentazione in autoclave per gli spumanti. Sino al 1984 si differenziava dal *S. Cerevisiae* per l'incapacità di fermentare il galattosio.
 - Specie *Saccharomyces Pastorianus*: è il lievito tipico della produzione della birra *lager* (fermentazione a bassa temperatura).

- Genere **Torulaspora**: cellule globose o ellittiche; possibile formazione di pseudoife; cellule vegetative prevalentemente aploidi. La sporificazione è immediatamente preceduta da coniugazione fra una cellula e la sua stessa gemma, talvolta fra cellule differenti; ascospore globose o ellittiche, lisce o rugose. Rispetto al *Saccharomyces*, le cellule si presentano più piccole e sferiche.
 - Specie *Torulaspora Delbrueckii*: è la specie più importante del genere; buone se non ottime caratteristiche enologiche; forte vigore fermentativo, accettabile potere alcoligeno (10°), buona resistenza agli antisettici. Usato nei processi di rifermentazione in bottiglia.
 - Genere **Zygosaccharomyces**: moltiplicazione per gemmazione multilaterale, cellule globose, ellittiche e cilindriche. Durante la coniugazione, che precede la sporificazione, presentano la caratteristica forma a occhiale. La coniugazione avviene in generale fra due cellule. Aschi con 1–4 spore globose o ellittiche. Le specie del genere sono dotate di accentuata osmofilia, perciò sono i principali responsabili delle alterazioni di succhi di frutta, marmellate e mieli (concentrazione zuccherina superiore a 70 %). Elevata resistenza alla SO₂. Fermentano preferibilmente il fruttosio. Le specie più importanti sono lo *Zygosaccharomyces Bailii* e *Rouxii*: dotati di buona attività fermentativa, elevata osmofilia, possono essere impiegati, essendo ubiquitari, per realizzare fermentazioni scalari; presenti anche nelle fermentazioni spontanee. In Sardegna vengono impiegati nella tecnica di invecchiamento sotto flor, poiché essendo **microrganismi diauxici**, sono dotati anche di metabolismo ossidativo, che consente di ottenere particolari aromi, ne sono esempio la Vernaccia, la Malvasia e l'Arvistadu.
- Famiglia: **Saccharomycoidaceae**: apiculati, gemmazione bipolare
- Genere **Hanseniaspora**: viene considerata la forma perfetta del genere Kloeckera. Sono tra i lieviti più piccoli e per questo poco resistenti alla SO₂. Hanno attività fermentativa nonostante producano un massimo di 8% di alcol. Dal punto di vista enologico non viene considerato un lievito buono perché conferisce elevata acidità volatile ai vini (caratteristica dei vini del Sud-Italia), predilige infatti gli ambienti caldi. La formazione delle ascospore non è preceduta da coniugazione, le spore germinando danno origine subito a cellule diploidi (autodiploidizzazione).
 - Genere **Saccharomyces**: è il lievito più grande (5–8 volte il Kloeckera), di forma apiculata. Gli aschi si formano senza previa coniugazione. Le 4 spore generalmente sono unite in due coppie, sferiche e lisce. Dotato di attività fermentativa. È il lievito più resistente alla SO₂ per due fattori:
 - **Fattore fisico**: cellule molto grandi. Quindi ha un basso rapporto superficie/volume, con conseguente basso assorbimento di SO₂ rispetto alle dimensioni
 - **Fattore metabolico**: produce sostanze che inattivano la SO₂. Con la fermentazione produce acetaldeide e acido piruvico, dal metabolismo proteico produce acido α-chetoglutarico.
 La specie più importante di questo genere è il *Saccharomyces Ludwigii* la cui caratteristica saliente è quella di avere la più alta resistenza alla SO₂. I suoi interventi più importanti si riscontrano nei mosti muti (alta quantità di SO₂) in cui è sempre il primo ed unico agente della fermentazione.
- Famiglia: **Candidaceae**
- In questa famiglia vengono inclusi i lieviti appartenenti agli ex Deuteromiceti (funghi imperfetti) per i quali non sono ancora note capacità e modalità di riproduzione.
- Genere **Brettanomyces**: è considerata la forma imperfetta asporigena del genere Dekkera. Comprende specie che non hanno un ruolo ben chiaro nella vinificazione. Producono molto acido acetico, perciò sono sospette.
 - Genere **Kloeckera**: è considerata la forma imperfetta del genere Hanseniaspora. Cellule apiculate, si riproducono per gemmazione bipolare. La specie più importante è quella apiculata che corrisponde a *Hanseniaspora Uvarum*. La sua importanza enologica non è centrale in quanto presenta una bassa attività fermentativa legata soprattutto alla fermentazione di monosaccaridi. Fa parte degli apiculati ed è sempre presente nelle prime fasi della fermentazione spontanea di mosti no solfitati. La sua attività cessa quando il mosto arriva a 3–4 °. Molto sensibile alla SO₂ (50 mg/l). Forma molti prodotti secondari perciò è considerato un lievito non buono.
 - Genere **Candida**: cellule di forma globosa, ovoidale, cilindrica, allungata, raramente apiculata. Moltiplicazione per gemmazione multilaterale. Presenza o meno di pseudomiceli. Fermentazione presente o assente. È un genere molto numeroso ed eterogeneo. Le specie di interesse enologico:
 - *Candida Pelliculosa*: forma imperfetta di *Hansenula Anomala*
 - *Candida Valida*: forma imperfetta di *Pichia Membranaefaciens*
 - *Candida Holmi*: forma imperfetta di *Saccharomyces Exiguus*
 - *Candida Colliculosa*: forma imperfetta di *Torulaspora Delbrueckii*.
 - *Candida Vini*: specie che si riscontra nei vini, presenta cellule da ovoidali a cilindriche, capace di formare pseudomiceli grandi e ramificati. Privo di attività fermentativa, è l'agente responsabile della **fioretta**.
 - Genere **Trigonopsis**: comprende la sola specie *Trigonopsis Variabilis*: le cellule presentano forma triangolare o tetraedrica con angoli arrotondati. La gemmazione avviene in corrispondenza degli angoli. Privo di attività fermentativa e di nullo interesse enologico

La fermentazione alcolica

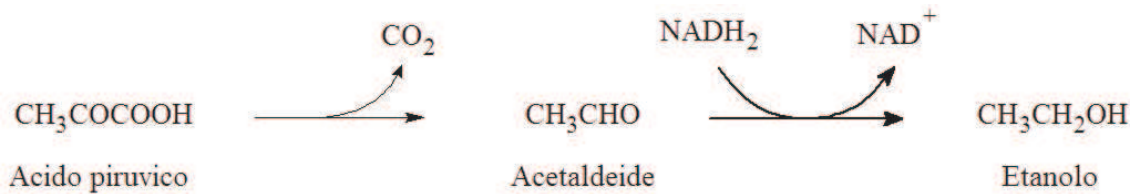
Consiste nella conversione del glucosio $C_6H_{12}O_6$ in CO_2 ed etanolo CH_3CH_2OH , secondo la reazione:



con un rendimento in etanolo di circa il 50% in peso rispetto al glucosio fermentato. L'etanolo viene misurato in volume e precisamente in gradi: per determinare il grado alcolico ottenibile al termine di una fermentazione, si moltiplica il contenuto iniziale di zuccheri fermentescibili (espresso in grammi per 100) per 0,6. Ad esempio, se un mosto d'uva ha il 20% di zuccheri, produrrà un vino di 12 ° ($20 \cdot 0,6 = 12$).

Il processo che porta alla demolizione del glucosio è detto **glicolisi**, ed è organizzato in diversi passaggi catalizzati da diversi enzimi:

1. Il primo passaggio si conclude con la produzione di gliceraldeide-3-fosfato, ed è **endoergonico** poiché richiede 2 molecole di ATP
2. il secondo passaggio si conclude con la produzione di acido piruvico ed è **esoergonico** poiché porta alla produzione di 4 molecole di ATP. L'acido piruvico subisce decarbossilazione ad acetaldeide e questa viene ridotta ad alcol etilico:



Prodotti secondari della fermentazione alcolica

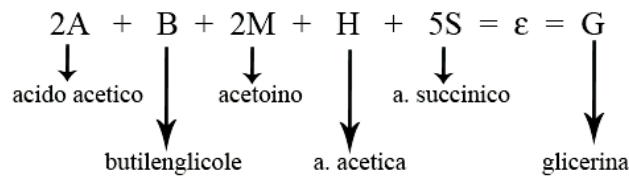
L'alcol etilico non è l'unico prodotto che si viene a formare dalla fermentazione alcolica, gli altri sottoprodotti sono rappresentati da:

- acetoino
- acido acetico
- acido piruvico
- acido succinico
- aldeide acetica
- butilenglicole
- glicerina

Tra tutti questi il più importante è la **glicerina**, che si viene a formare nel caso in cui si abbiano dei problemi nella fermentazione principale e la sua utilità è dovuta principalmente all'ossidazione del $NADH_2$ per la ricostituzione del NAD. I meccanismi che portano alla produzione di glicerina sono 4:

1. ogni volta che si verifica un blocco a livello di acido piruvico o di aldeide acetica, la ricostituzione del NAD avviene attraverso la via alternativa rappresentata dalla riduzione del diidrossiacetone-fosfato a glicerol-fosfato.
 2. l'aldeide acetica non è disponibile in quantità sufficiente a consentire la ricostituzione del NAD; tale indisponibilità può essere dovuta a cause sia endogene che esogene, come ad esempio l'aggiunta ai mosti di SO_2 , che si combina in parte con l'aldeide acetica, impedendone la riduzione, provocandone l'accumulo e deviando la fermentazione a favore della glicerina.
 3. la presenza di un'aldeide-deidrogenasi devia l'aldeide acetica dal suo normale destino, portando alla formazione di etanolo e di acido acetico; questa reazione di ossidoriduzione è influenzata dal pH del mezzo, e normalmente avviene a pH alcalini ottimali per l'azione dell'aldeide-deidrogenasi, ma può verificarsi anche a pH acidi.
 4. si ottengono come prodotti finali glicerina e acido piruvico: ciò si verifica quando nel mezzo vengono a mancare le fonti di N, oppure quando si verifica una repressione della piruvato-decarbossilasi.
- La produzione di acetoino e butilenglicole avviene a partire da acido piruvico e aldeide acetica, in seguito alla condensazione di due molecole di aldeide acetica.
 - L'acido succinico proviene dall'acido glutammico per via ossidativa, avendo come intermedio l'acido α -chetoglutarico. Quest'ultimo si può formare per condensazione di due molecole di acido acetico oppure per riduzione dell'acido piruvico con intermedi l'acido ossalacetico, malico e fumarico.

Tra glicerina e gli altri sottoprodotti esiste un rapporto costante qualitativo e quantitativo, espresso dalla relazione:



Fermentazione spontanea o naturale

Le fasi iniziali della fermentazione naturale vedono il prevalere dei generi *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, subentra poi il *Metschnikowia* e altri lieviti con metabolismo ossidativo. Il *Saccharomyces* è inizialmente presente in quantità ridotta, per poi prendere il sopravvento durante le fasi finali.

- *Kloeckera apiculata*: è dominante nelle prime fasi della fermentazione, è ampiamente presente in natura e prende facilmente il sopravvento per il suo buon vigore fermentativo. Come tutti i lieviti apiculati ha una bassa alcol-tolleranza, di conseguenza la sua attività si arresta in presenza di una gradazione alcolica di 4°.
- *Saccharomyces cerevisiae*: è un lievito ellittico molto vigoroso, che subentra al *Kloeckera apiculata* quando questo blocca la sua attività. Presenta un'elevata resistenza all'alcol, che raramente è inferiore a 10° e può toccare punte estreme prossime ai 20°. I ceppi più interessanti si hanno nelle zone meridionali, dove il clima e il maggior contenuto zuccherino delle uve esercitano un'azione selettiva. Il genere *Saccharomyces* inizia a moltiplicarsi a metà del processo fermentativo e non assume importanza finché la sua concentrazione non è di 10⁴ cellule/ml, valore che viene raggiunto quando si ha la regressione degli apiculati. La concentrazione massima dei Saccaromiceti è di 9 · 10⁸ cellule/ml e, consumando tutto lo zucchero, concludono la fermentazione.

A parte il *Saccharomyces cerevisiae*, vi sono altre specie che intervengono nelle ultime fasi della fermentazione, essendo dotate di un discreto potere alcoligeno, queste sono:

- *Torulaspora rosei*,
- *Zigosaccharomyces bailii*: occasionalmente può sostituire il *Saccharomyces cerevisiae*
- *Schizosaccharomyces pombe* e *japonicus*.

Al termine della fermentazione, se non viene impedito il contatto con l'aria atmosferica, è inevitabile che si sviluppino i lieviti responsabili della fioretta, quali *Pichia membranaefaciens*, *Candida vini* e *Hansenula anomala*, che portandosi in superficie formano veli superficiali spessi e fragili, si moltiplicano respirando l'alcol etilico e provocano un forte abbassamento del grado alcolico.

Il motivo per cui il processo fermentativo viene avviato dai lieviti e non dai batteri è da ricercare nell'ambiente in cui si opera, rappresentato dal mosto, il quale si presenta ricco di zuccheri, usati dai lieviti, povero di O₂, e con un pH compreso tra 3 e 4, condizioni ideali per lo sviluppo dei lieviti e non dei batteri e neanche per le muffe, essendo queste aerobie.

I fattori che impediscono la conclusione della fermentazione sono:

- escursioni termiche oltre il valore ottimale che è di 25~30 °C
- concentrazione zuccherina iniziale molto elevata, poiché i lieviti non resistono alla quantità di alcool prodotto.

I fattori che non permettono il verificarsi della fermentazione spontanea sono:

1. elevata concentrazione di SO₂
2. pulizia della cantina eccessiva
3. fitofarmaci provenienti dalle uve

Stato sanitario dell'uva

È molto importante considerare lo stato sanitario dell'uva, infatti gli acini che presentano l'epicarpo lesionato sono oggetto di una malattia nota come **marciume acido**, che si manifesta in fase di maturazione avanzata, ed è caratterizzata da una forte ossidazione degli acini, i quali presentano una buccia sempre più fragile ed emanano un forte profumo di acido acetico, spesso accompagnato dalla presenza di moscerini. Altre modificazioni riguardano la presenza di acido galatturonico, ottenuto dalle sostanze pectiche, insieme a una riduzione di acidità fissa (acido tartarico e acido malico). Una delle caratteristiche più importanti è rappresentata dalle diverse specie di lieviti che

proliferano negli acini colpiti, come il genere *Candida*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, *Hanseniaspora*, *Zigosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, ecc.

Interventi sulla fermentazione dei mosti

Si tratta di interventi che mirano a guidare la fermentazione in favore del *S. cerevisiae*, cercando di controllare alcuni lieviti sfavorevoli (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*) che possono agire nelle fasi iniziali della fermentazione. Questi interventi sono:

- **impiego di lieviti selezionati**: il lievito selezionato è definibile come una coltura pura di specie enologicamente idonee, dotate di caratteristiche che consentano di ottenere risultati predefiniti, quindi abbiamo lieviti che producono diverse gradazioni alcoliche e altri che presentano una diversa resistenza alla SO₂. I lieviti selvaggi della fermentazione spontanea possono essere sostituiti completamente con una coltura di un lievito selezionato di *S. cerevisiae*, che viene aggiunta ai mosti subito dopo la pigiatura dell'uva, permettendo così di eliminare i lieviti apiculati e di portare a secco il vino con risultati costanti, visto l'elevato potere alcoligeno del *Saccharomyces*, inoltre l'impiego di ceppi di lieviti selezionati garantisce il buon andamento della fermentazione. Il ceppo di lievito scelto deve possedere due importanti caratteristiche:

- elevato vigore fermentativo
- elevato potere alcoligeno

La prima utilizzazione dei lieviti selezionati si ha nell'industria birraria, ad opera di Hansen, intorno alla fine del 1800, mentre in campo enologico si sono diffusi dopo e ancora oggi non vengono usati molto per due motivi:

1. la birra veniva prodotta da industriali e non da piccoli proprietari (come accadeva per il vino qualche decennio fa)
2. la birra veniva prodotta nel nord Europa, dove la ricerca era più avanti rispetto al meridione.

Una maggiore diffusione si è avuta dopo il 1960, al fine di ottenere un prodotto più uniforme da un anno all'altro, poiché il mercato non gradisce brusche variazioni. In Sardegna la prima azienda che è ricorsa all'uso di lieviti selezionati è stata la *Sella & Mosca*, ottenendo un miglioramento delle produzioni. Un ruolo molto importante in questo settore, ha avuto la microbiologia, che utilizzando i lieviti selezionati, eliminando quelli spontanei, ha permesso di sostituire la fermentazione spontanea con una fermentazione guidata. Inizialmente questo era possibile usando il lievito per il pane, per passare poi a ceppi enologicamente importanti. In Italia, Castelli ha creato il **mosto-lievito**, secondo un processo organizzato in più fasi:

1. prelievo di 100 ml~1 litro di mosto, che viene sottoposto a trattamento termico di sterilizzazione per 10~20 minuti,
2. il mosto sterilizzato è inoculato con cellule di lievito selezionato, che si moltiplica rapidamente. Dopo 24 ore sono già in attiva fermentazione.
3. la precoltura viene aggiunta ad altro mosto non sterilizzato ottenuto da uve sane, e posto in una damigiana. I lieviti, essendo in piena attività, prendono il sopravvento.
4. travaso del mosto dalla damigiana in un grande tino, in modo che i lieviti possono moltiplicarsi ulteriormente.
5. prelievo di una quantità dal 3~5% di mosto dal tino, e suo utilizzo per vinificare tutta la massa.

Questa base di lieviti è chiamata dai francesi *ped de cuve*. Essendo una tecnica molto complicata, viene usata solo dalle piccole cantine.

Più recenti sono i **lieviti secchi attivi**, ottenuti con tecniche particolari che portano all'ottenimento di polveri, ossia i lieviti secchi attivi non sono altro che dei preparati commerciali disidratati, il cui utilizzo richiede una preventiva idratazione per 10~20 minuti a 40 °C e addizionati poco prima della vinificazione. Attualmente è la tecnica più utilizzata.

- **fermentazioni scalari**: sono dei processi provocati da diversi lieviti che agiscono in associazione e in successione. Generalmente la prima fase della fermentazione vede predominare il *Kloeckera apiculata*, mentre nella seconda fase predomina il *Saccharomyces cerevisiae*. Si può ottenere una fermentazione scalare inoculando, in tempi diversi, specie di lieviti che influiscono positivamente sulla qualità dei vini, come il *Kluiveromyces* prima del *Saccharomyces* in grande quantità (10⁶ cellule/ml) in modo che prenda il sopravvento sui lieviti spontanei.
- **metodo super-quattro**: consiste nel mantenere il grado alcolico del materiale in fermentazione ad un livello superiore a 4°, così da ottenere l'inibizione dell'attività di tutti quei lieviti sensibili all'alcol e di basso potere alcoligeno, ma anche di favorire l'attività del *S. cerevisiae*. Tale metodo si può applicare solo nel caso di fermentazione di mosti non solfitati, perché con l'aggiunta di SO₂ i lieviti indesiderati vengono inibiti ugualmente.

Il metodo può esser applicato nel caso di **fermentazione in continuo**, dove la massa fermentativa viene continuamente alimentata con mosto fresco, stabilizzando così il grado alcolico ad un livello superiore a 4°.

Più problematica è la sua applicazione nella **fermentazione discontinua**, nella quale la stabilizzazione del grado alcolico è possibile riempiendo le vasche di fermentazione, anziché in una sola volta, per tappe successive nel corso di una decina di giorni.

- **pasteurizzazione dei mosti**: è un trattamento a caldo, a una temperatura compresa tra 60 °C e 100 °C, che permette di uccidere le cellule vegetative di tutti i m.o. le spore dei lieviti e delle muffe ma non quelle dei batteri. È una tecnica poco usata in enologia, limitata ai vini dolci o contenenti un residuo di zuccheri fermentescibili che dopo l'imbottigliamento vanno contro ai processi di rifermentazione.

I vantaggi che essa comporta sono:

- eliminazione di tutti i microrganismi del mosto
- assenza di microrganismi selvaggi, che permette di inoculare i lieviti scelti in assenza di competizione
- l'uso superfluo della SO₂

Gli svantaggi che essa comporta sono:

- alcuni caratteri dei vini possono essere modificati
- non garantisce la stabilità chimica del vino
- le attrezzature da usare non sono adatte alle grandi cantine dove si lavorano grandi quantità di mosto
- dopo il trattamento il mosto può risultare inquinato

- **utilizzo dell'anidride solforosa SO₂**: la SO₂ è l'unico antisettico che può essere usato in enologia. Essa permette di controllare e di garantire un buon andamento del processo fermentativo. Pur essendo enologicamente molto importante, risulta essere altrettanto pericolosa per l'uomo, che può assimilarne, quotidianamente, una quantità massima di 0,7 mg/Kg di peso corporeo. La SO₂ può essere somministrata:

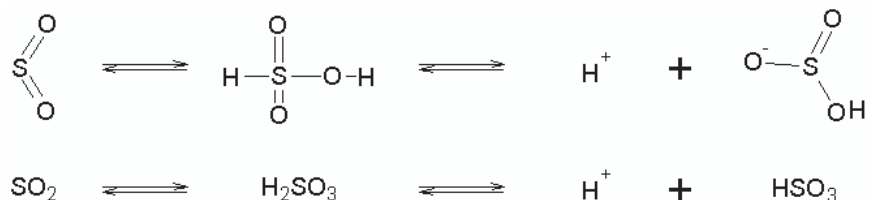
- **come sale** (metabisolfito di K): presenta un rendimento del 50% circa
- **in forma liquida**: contenuta in bombole, viene usata in cantine di grandi dimensioni.

Nel vino la SO₂ si presenta in due forme:

- **combinata**: si lega ai diversi composti presenti nel vino, con legami più o meno stabili. Non è attiva dal punto di vista antisettico, fa parte della SO₂ totale.
- **libera**: non si lega a nessun composto e si può trovare come:
 - **forma dissociata**: ione bisolfito HSO₃⁻
 - **forma indissociata**: SO₂ libera, che è la forma più attiva

L'azione antisettica della SO₂ è fortemente influenzata da diversi fattori quali:

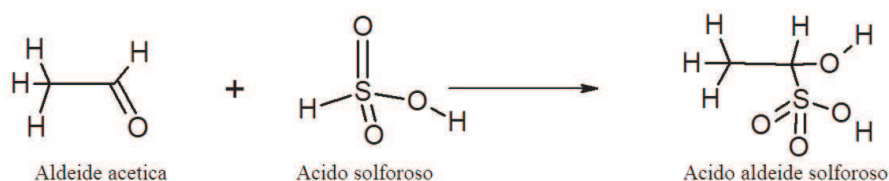
1. **pH**: più basso è il pH, maggiore sarà la frazione attiva presente, e quindi maggiore sarà l'attività antisettica:



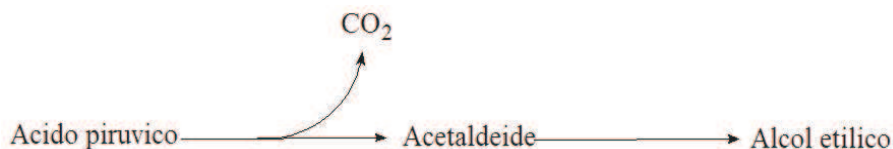
2. **temperatura**: all'aumentare della temperatura aumenta anche la forma indissociata SO₂.

Quindi, maggiore sarà la frazione indissociata, minore sarà la quantità di SO₂ totale che si dovrà utilizzare. Le sostanze che legano la SO₂ sono:

- **acetaldeide**: legandosi con la SO₂ forma l'**acido aldeide-solforoso**:



L'acetaldeide si forma dalla decarbossilazione dell'acido piruvico, da cui poi si ottiene alcol etilico:



L'accumulo di acetaldeide si può verificare in casi particolari:

1. **elevate concentrazioni di O₂**: la reazione che porta alla formazione di alcol etilico a partire dall'aldeide acetica, è una riduzione, di conseguenza la presenza di O₂ sposta l'equilibrio verso la produzione di acetaldeide. Quindi, per evitare ciò, è bene evitare il contatto del vino con O₂, soprattutto se il vino è bianco. Nei vini rossi è meno importante, in quanto le uve vengono fatte fermentare con le bucce, la cui presenza impartisce il tipico colore; in questo caso l'accumulo di acetaldeide è inevitabile, poiché per due volte al giorno, le bucce che galleggiano nel mezzo vengono spinte nella massa. È comunque importante poiché conferisce al vino l'aroma particolare.
 2. **fermentazione che parte da uve guaste**: riguarda la fermentazione che interessa i grappoli in presenza di O₂. Nella fermentazione di uve sane, l'acetaldeide può arrivare a 10~20 mg/l, nei vini giovani a circa 10 mg/l.
- **acido piruvico**: è un prodotto della fermentazione
 - **acido α-chetoglutarico**: si forma per deaminazione dell'acido glutammico
 - **acido uronico e acido galatturonico**.

La SO₂ reagisce con tutti questi acidi, formando composti poco stabili. È necessario quindi attuare dei comportamenti volti a limitare la presenza di tutti questi composti: nel caso dell'aldeide acetica, si devono utilizzare uve sane, anziché insufflare aria; nel caso dell'acido piruvico, si deve assicurare la presenza nel vino di **tiamina** (vit. B₁), fondamentale per l'attivazione del coenzima cocarbossilasi della piruvato-decarbossilasi, enzima che catalizza la reazione che porta alla conversione dell'acido piruvico in alcol etilico, con intermedio l'aldeide acetica. La quantità di tiamina da utilizzare legalmente consentita è di 0,6 mg/l.

La SO₂ non dev'essere somministrata subito nel processo di fermentazione, poiché inizialmente nella massa sono presenti grandi quantità di acido piruvico e aldeide acetica. Verrà somministrata a fine fermentazione, considerando le quantità di acido piruvico, acido α-chetoglutarico e aldeide acetica presenti, nonché della durata dell'invecchiamento: si userà poca SO₂ nei vini la cui durata d'invecchiamento è breve, mentre si aumenterà la dose in quelli con un lungo invecchiamento, in modo che il vino venga protetto dai m.o. e dai processi di alterazione e ossidazione. È bene precisare che la quantità di SO₂ da apportare varia anche in funzione della qualità dell'uva e della temperatura, normalmente con uve sane e bassa temperatura si può evitare l'uso dell'antisettico.

Vantaggi dell'utilizzo della SO₂:

1. regola la fermentazione, eliminando i lieviti apiculati sia sporigeni che asporigeni, a favore degli ellittici. I lieviti meno resistenti sono: *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Torulasporea*. Quelli più resistenti sono: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Zigosaccharomyces bailii* (fermentazione sotto flor), *Schizosaccharomyces pombe* (fermentazione malo-alcolica) e *Saccharomycodes ludwigii*, che manifesta la maggiore resistenza alla SO₂ rispetto agli altri lieviti
2. protegge i vini dai processi di ossidazione accelerando la chiarificazione
3. rende più rapida la fermentazione
4. l'acidità malica dei vini è maggiore poiché blocca l'attività dei batteri lattici
5. conferisce stabilità al colore poiché reagisce con l'O₂ evitando che si leghi alle sostanze coloranti (polifenoli): l'O₂ entrando in contatto con i polifenoli origina la cosiddetta *cassee*, cioè rottura del colore.

Svantaggi nell'utilizzo della SO₂:

1. il vino invecchia con difficoltà perché manca l'O₂, che si combina con la SO₂
2. può provocare danni all'uomo
3. può rilasciare nel vino odore e sapore sgradevoli, infatti alcuni lieviti hanno la capacità di produrre H₂S durante il meccanismo che porta alla formazione di amminoacidi solforati, che può essere eliminato con il travaso. Nel caso l'H₂S permanga, si arriva ad ottenere composti come i **mercaptani**, portando a buttare il vino.

La quantità massima di SO₂ ammessa dalla legge è:

- **vini rossi:**
 - **secchi** (assenza di zucchero): 175 mg/l
 - **dolci** (più del 5% di zucchero): 225 mg/l
- **vini bianchi:**
 - **secchi:** 225 mg/l
 - **dolci:** 275 mg/l

La differenza tra vini bianchi e rossi sta nel fatto che in questi ultimi la presenza di tannini e di polifenoli svolge già un'azione antisettica. Gli apiculati vengono inattivati con 20~30 mg/l di SO₂. Gli ellittici (*Saccharomyces*) sono inattivati con 30~40 mg/l. Inoltre la quantità di SO₂ sarà maggiore quanto più alta è la concentrazione zuccherina, la quale può esaltare enormemente l'attività microbica.

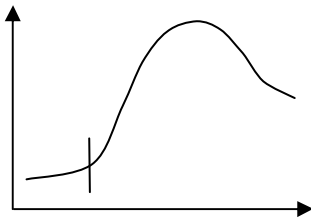
Caratteristiche enologiche dei lieviti

La scelta e la selezione dei lieviti viene fatta sulla base di:

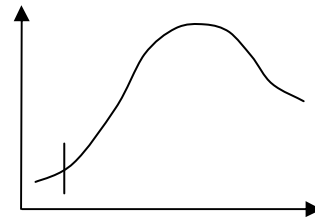
- **caratteri tecnologici:** influiscono sull'andamento dei processi fermentativi
- **caratteri di qualità:** influiscono sulle caratteristiche chimiche dei vini

Caratteri tecnologici

1. **Vigore fermentativo:** è la capacità che ha un lievito di prevalere sugli altri il più rapidamente possibile; i lieviti migliori sono quelli che hanno il maggiore vigore fermentativo:

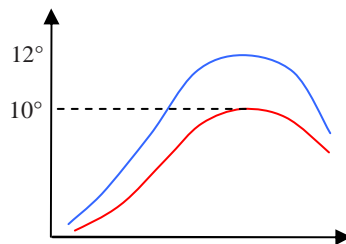


Il lievito impiega molto tempo per ambientarsi e prevalere sugli altri



Il lievito impiega poco tempo per ambientarsi quindi prevale subito sugli altri

2. **Resistenza alla SO₂:** è una caratteristica di ceppo; i migliori sono quelli più resistenti
3. **Potere fermentativo:** è la capacità che ha un lievito di produrre alcol (massima quantità di alcol ottenuta in un mezzo contenente una quantità ottimale di zucchero, ~28% di glucosio). Anche nel caso in cui si voglia ottenere un vino con bassa gradazione alcolica, è bene comunque utilizzare lieviti che abbiano un buon potere fermentativo in modo da ottenere la quantità di alcol voluta quando il lievito è ancora vivo e non in fase di stasi:



■ Il lievito a 10° è già in stasi

■ Il lievito a 10° è ancora in crescita

4. **Modalità di sviluppo nei mezzi liquidi:**

- a. **Sviluppo polverulento:** ultimato il processo di gemmazione, le cellule si separano le une dalle altre disperdendosi. Al termine dello sviluppo le cellule si raccolgono sul fondo dei recipienti e in seguito ad agitazione si disperdono nuovamente determinando torbidità uniforme e polverulenta del liquido
- b. **Sviluppo in aggregati:** dopo la gemmazione le cellule rimangono attaccate alla cellula-madre formando degli aggregati di notevoli dimensioni che frantumandosi producono aggregati più piccoli, liberando poche cellule
- c. **Sviluppo flocculento:** dopo la gemmazione le cellule si separano le une dalle altre, dando inizialmente uno sviluppo polverulento; in seguito le cellule si uniscono fra di loro formando grumi compatti che si depositano sul fondo; questi, dopo agitazione si frantumano e si disperdono nel liquido per ricadere infine sul fondo.

5. **Potere schiumogeno:** la formazione di schiuma durante i processi fermentativi è una prassi, però a volte accade che anziché occupare un piccolo volume, sia persistente e in quantità tale da provocare la fuoriuscita del vino dal

contenitore. La schiuma contiene CO₂ e da questa dipende la quantità di bollicine presenti e che a sua volta è condizionata dalla produzione di alcol. Di conseguenza, quando due vini presentano la stessa gradazione alcolica, presenteranno anche la stessa produzione di schiuma; ciò che può cambiare è la persistenza della schiuma che dipende dall'elasticità della membrana delle bolle. Sono da preferire i lieviti che danno una schiuma poco persistente, poiché in caso contrario si dovrà disporre di tini molto grandi per impedire la fuoriuscita del liquido; l'elasticità delle bolle è determinata dalle sostanze proteiche prodotte dal lievito. La schiuma si forma maggiormente nel **mosto-fiore**, ossia il mosto di prima spremitura, mentre è minore nel mosto torchiato, essendo questo ricco di tannini, che comportandosi da antisettici, bloccano la fermentazione e quindi la produzione di schiuma. È bene che nei vini spumanti, i lieviti non abbiano potere schiumogeno, perché ostacolerebbero l'illimpidimento.

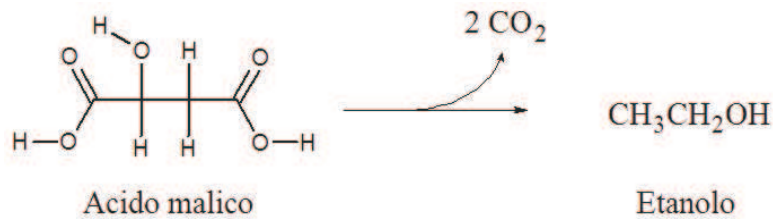
6. **Potere filmogeno o florizzazione:** è dato dai lieviti con **metabolismo diauxico**, capaci di cambiare il loro metabolismo durante lo sviluppo. I lieviti in questione sono chiamati **filmogeni**, come *Saccharomyces cerevisiae* e *S. bayanus*, *Zigosaccharomyces bailii*: questi lieviti risalgono in superficie dove formano un velo, passando ad un metabolismo ossidativo. Le cellule per potersi compattare maggiormente assumono forma esagonale ed impediscono che il vino entri in contatto con l'O₂. Le cellule di lievito che si portano in superficie galleggiano grazie ad un aumento, a livello della parete cellulare, di lipidi ed in particolare di acidi grassi insaturi, che fanno in modo che le cellule possano allontanarsi dall'ambiente acquoso (essendo idrofobi). Giunti in superficie i lieviti utilizzano i prodotti della fermentazione: alcol, acidi organici, glicerina, e dal loro metabolismo, il prodotto principale che si ottiene è l'acetaldeide, che unendosi ad altri composti forma **acetali** e **sostanze aromatiche**; quindi un vino invecchiato in questo modo presenterà un aroma molto forte. Per quanto riguarda l'invecchiamento, è molto importante tenere sotto controllo la temperatura (20 °C) e il rapporto superficie/volume, poiché più il recipiente è piccolo, minore sarà il tempo d'invecchiamento.
7. **Resistenza ai fitofarmaci:** alcuni fitofarmaci potrebbero arrivare al mosto ed inibire l'attività dei lieviti, quindi è bene che i ceppi utilizzati presentino un'elevata resistenza nei confronti di queste sostanze.
8. **Fattore Killer:** si basa sul fatto che alcuni ceppi di *S. cerevisiae*, chiamati killer, hanno la capacità di produrre una sostanza tossica, alla quale essi stessi sono resistenti ma è letale per altri ceppi appartenenti alla stessa specie; la tossina secreta è composta per il 90% da un carboidrato, il D-mannosio, e per il 10% da una proteina, dalla quale dipende l'effetto tossico. Il fenotipo dei ceppi che presentano questo carattere è rappresentato dal simbolo K⁺, mentre i ceppi non killer sono rappresentati col simbolo K⁻, analogamente i ceppi resistenti sono rappresentati con R⁺, quelli non resistenti R⁻.
9. **Temperatura di fermentazione:** corrisponde all'intervallo termico ottimale al quale la fermentazione si svolge in maniera equilibrata. Questo intervallo è compreso fra 18 e 24 °C. È bene notare che vi sono dei lieviti saccaromiceti, che danno origine a buone fermentazioni anche a 6 °C, come quelli che vengono usati in birrifico per la produzione della birra "lager yeasts", mentre altri lieviti hanno la capacità di sviluppare bene in presenza di alte temperature come il *Kluiveromyces marxianus*.
10. **Attività fermentativa:** la scelta del lievito dovrà essere fatta non soltanto in funzione della quantità di alcol prodotto, ma anche in funzione della produzione di schiuma e di energia, infatti il processo fermentativo è esoergonico che porta alla formazione di alcol e CO₂ a partire dal glucosio. La CO₂ formata è responsabile della produzione di schiuma, la cui presenza determina una maggiore produzione di energia comportando un incremento della temperatura di fermentazione.

Caratteri qualitativi

1. **Azione sull'acido malico:** l'acido malico è causa di instabilità essendo facilmente aggredibile dai batteri lattici; esso è presente in grandi quantità nelle uve vendemmiate anticipatamente (agosto – settembre) poiché permane per motivi biochimici e tende a scomparire in ottobre. L'acido malico deve mancare nei vini rossi, e ciò è possibile utilizzando lieviti che lo degradino
2. **Produzione di composti solforati:** i lieviti hanno la capacità di produrre amminoacidi solforati partendo dai solfati, durante questo processo vengono prodotti anche alcuni intermedi di reazione come i solfiti e idrogeno solforato H₂S, attitudine comune nei lieviti e che risulta essere un carattere genetico. I ceppi naturalmente differiscono per la quantità di H₂S che viene prodotto, il quale dipende dalle caratteristiche nutrizionali del mezzo. Un'elevata produzione di H₂S si può avere per la presenza nel mosto di Zolfo elementare derivante da trattamenti anti-oidici. La produzione di idrogeno solforato può essere anche negativa, poiché conferisce al vino odore e sapore sgradevoli. Inoltre i lieviti hanno la capacità di produrre SO₂ dalla riduzione dei solfati: anche in questo caso, la quantità di SO₂ prodotta varia in base al ceppo considerato. La SO₂ prodotta, che si ritrova in forma combinata, è uguale a quella che viene apportata artificialmente, con la quale si combina per formare la SO₂ totale.
3. **Produzione di accettori di SO₂:** possono formarsi prodotti indesiderati come acetaldeide, acido α-chetoglutarico, acido piruvico.
4. **Purezza fermentativa:** fa riferimento alla produzione di acido acetico per fermentazione del glucosio.

La fermentazione malo-alcolica

La fermentazione malo-alcolica consiste nella conversione dell'acido malico in etanolo tramite duplice decarbossilazione, ossia:



Tale processo si realizza per attività dei lieviti appartenenti al genere *Schizosaccharomyces*, che vengono ampiamente utilizzati nel settore della **disacidificazione biologica**, la quale può essere ottenuta mediante 2 vie e che permette la completa eliminazione dell'acido malico:

1. **disacidificazione per fermentazione dei mosti**
2. **disacidificazione per rifermentazione dei vini**

La specie che viene usata maggiormente è lo *Schizosaccharomyces pombe*, seguito dallo *Schizosaccharomyces japonicus*.

Disacidificazione per fermentazione dei mosti

Permette di ottenere la fermentazione dei mosti sostituendo il *Saccharomyces cerevisiae* con *Schizosaccharomyces*, anche se quest'ultimo comporta sempre alcuni inconvenienti riguardanti:

- i ceppi di *Schizosaccharomyces* non riescono a prendere il sopravvento sui lieviti presenti nel mosto
- hanno un potere alcoligeno di 10°, mostrando quindi difficoltà nel completare la fermentazione, che pertanto verrà ultimata da *S. cerevisiae*
- la qualità e la tipicità dei vini sono dubbie

Per ovviare a tutti questi inconvenienti, alcuni autori hanno proposto di eseguire una fermentazione scalare, inoculando ceppi di *Schizosaccharomyces* e ceppi di *S. cerevisiae*. Per ottenere questo tipo di disacidificazione è bene che vengano rispettati alcuni punti:

1. scegliere accuratamente il ceppo di *Schizosaccharomyces* sulla base del vigore fermentativo e sulla tolleranza all'alcol
2. avere mosti poveri di lieviti selvaggi
3. eseguire abbondanti inoculazioni (10^6 cellule/ml)
4. eseguire una leggera solfitazione: 40~45 mg/l prima dell'inoculazione
5. eseguire un inoculo di *S. cerevisiae* verso la fine della fermentazione

Disacidificazione per rifermentazione dei vini

Si basa sull'utilizzo di *Schizosaccharomyces pombe*. Tale tecnica, migliore della precedente, richiede una maggiore attenzione e opportuni accorgimenti riguardanti:

1. il ceppo di *Schizosaccharomyces pombe* dev'essere scelto in funzione della sua tolleranza all'alcol
2. il vino dev'essere ben preparato, ossia filtrato al fine di eliminare tutte le cellule di *S. cerevisiae*
3. le precolture devono essere preparate con mosto concentrato, opportunamente diluito o mosto desolfitato, quindi inoculate nel vino in ragione del 6%
4. dopo l'inoculazione il vino dev'essere mantenuto ad una temperatura di 16 °C o prossima a 20 °C. In queste condizioni, la rifermentazione dura 15 giorni e provoca un brusco calo dell'acidità malica.

La fermentazione malo-alcolica rimane comunque una fermentazione non buona perché si ottengono molti prodotti secondari non buoni.

I batteri acetici

I batteri acetici sono m.o. dotati di metabolismo ossidativo, che ossidando l'alcol etilico ad acido acetico, sono i principali responsabili della **fermentazione acetica**. I batteri che hanno quest'attitudine appartengono al genere *Acetobacter*, mentre quelli che esplicano il loro potere ossidativo verso il glucosio appartengono al genere *Gluconobacter*.

❖ **Famiglia *Acetobacteraceae***: cellule Gram negative, ellittiche o bastoncellari, singole, in paia o in catenelle. Aerobi con metabolismo strettamente respiratorio. Hanno optimum termico di 25~30 °C e optimum di pH di 5~6.

- **Genere *Acetobacter***: cellule ellittiche o bastoncellari, in paia o in catenelle, mobili con flagelli peritrichi o laterali, o non mobili. Ossidano l'etanolo ad acido acetico:
 - *Acetobacter aceti*
 - *Acetobacter liquefaciens*
 - *Acetobacter pasteurianus*
 - *Acetobacter hansenii*
- **Genere *Gluconobacter***: cellule ellittiche o bastoncellari, singole o in paia, raramente in catenelle, mobili o immobili. Aerobi obbligati con metabolismo respiratorio, optimum termico di 25~30 °C e pH = 5,5~6. Ossidano l'etanolo ad acido acetico, mentre non ossidano acetati o lattati a CO₂ e H₂O. Sono molto diffusi in natura, sui fiori, sulla frutta, nelle bevande alcoliche, nel miele. La specie più importante è:
 - *Gluconobacter oxydans*

Esigenze dei batteri acetici

I fattori che favoriscono lo sviluppo dei batteri acetici sono:

1. **temperatura**: quella ottimale si aggira intorno ai 30 °C, con un minimo termico di 5 °C, nel senso che sino a questo valore si moltiplicano con rapidità decrescente.
2. **pH**: quello ottimale per la loro attività ossidativa è di 5,4~6,3.
3. **alcol etilico**: la sensibilità verso l'alcol etilico varia in funzione del ceppo e delle condizioni nutrizionali del mezzo, è certo però che lo sviluppo dei batteri acetici si riduce all'aumentare del grado alcolico.

Inibitori dei batteri acetici

I batteri acetici sono molto sensibili all'azione della SO₂. Non sono invece sensibili al sorbato di potassio la cui azione è esclusivamente antifungina, né ai composti antibotritici in genere. Sono poco sensibili agli antibiotici in generale; il più attivo nei loro confronti è la novobiocina.

Chimismo della fermentazione acetica

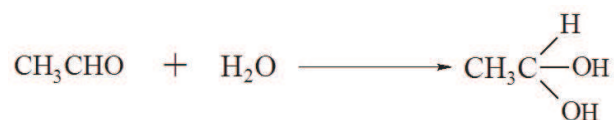
Le fasi dell'ossidazione dell'etanolo sono:



Questa reazione avviene avendo come termine intermedio l'aldeide acetica:

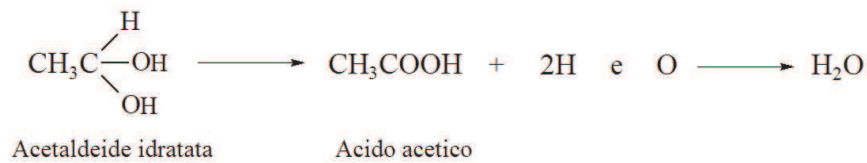


L'aldeide acetica è poi idratata:

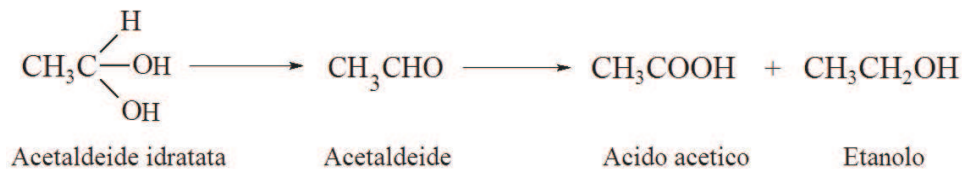


L'aldeide acetica idratata può poi essere trasformata in acido acetico attraverso due vie:

- in aerobiosi per deidrogenazione:



- oppure in anaerobiosi per dismutazione, con formazione anche di etanolo:



La dismutazione produce inizialmente il 50% di acido acetico e il 50% di etanolo. Quest'ultimo viene nuovamente trasformato in acido acetico ed etanolo e la reazione procede fino ad ottenere soltanto acido acetico.

Importanza enologica dei batteri acetici

I batteri acetici hanno la capacità di sviluppare nei mosti e nei vini in tutte le fasi della vinificazione, per via della loro tollerabilità nei confronti di bassi valori di pH. Sono i nemici più pericolosi dei vini, a causa dell'ossidazione dell'etanolo in acido acetico e originando le malattie note come spunto e acescenza. Lo sviluppo di questi batteri può essere impedito controllando lo stato di asfissia e utilizzando SO₂, nonché controllando il grado alcolico, il pH e la temperatura. Il genere *Gluconobacter* normalmente è presente in grande quantità nei mosti (è presente soprattutto nei grappoli per poi diminuire nei mosti a causa della scarsa alcol-tolleranza), il genere *Acetobacter* è presente essenzialmente nei vini, in modo particolare sui grappoli colpiti da Botrytis.

I batteri lattici

Sono definiti batteri lattici quei batteri che per fermentazione degli zuccheri producono prevalentemente acido lattico. Attualmente vengono definiti lattici sia i batteri che producono solo acido lattico, che quelli che producono oltre ad acido lattico anche piccole quantità di altri composti come CO₂ e acido acetico.

Sono batteri Gram+, con cellule immobili che non producono spore; sono organismi anaerobi o anaerobi facoltativi, che richiedono la presenza, nei mezzi nutritivi, di tutti gli amminoacidi e di molte vitamine che non riescono a sintetizzare. In base ai prodotti del loro metabolismo si distinguono in batteri:

- omolattici (o lattici omofermentanti): fermentano gli zuccheri e producono solo acido lattico
- eterolattici (o lattici eterofermentanti): fermentano gli zuccheri producendo acido lattico, acido acetico, CO₂ e, talvolta, alcoli.

Le famiglie più importanti sono due:

- ❖ **Famiglia *Streptococcaceae***: le specie appartenenti a questa famiglia presentano cellule Gram+ a forma di cocco, asporigeni e anaerobi facoltativi. I generi più importanti sono:
 - **Genere *Leuconostoc***: sono batteri eterolattici, con cellule sferiche, immobili e asporigeni, è un genere che comprende diverse specie, alcune delle quali si sviluppano bene a pH inferiori a 4,8 (le più importanti in campo enologico in quanto il vino ha un pH = 3~4) e altre a pH maggiori a 4,8. Il genere *Leuconostoc* lo si ritrova dopo conclusa la fermentazione principale, è il responsabile dell'avvio della **fermentazione malo-lattica**.
 - **Genere *Pediococcus***: sono batteri omolattici, con cellule sferiche che si riuniscono a formare della tetradi, sono immobili e asporigeni

❖ Famiglia *Lactobacillaceae*: comprende un solo genere:

- Genere *Lactobacillus*: le specie possono essere omofermentanti o eterofermentanti, con cellule allungate; una specie molto importante è il *Lactobacillus plantarum*, batterio omofermentante, presente nel mosto e nel vino durante la fermentazione malo-lattica; si trova spesso negli ambienti meridionali, dove i vini hanno un basso valore di pH.
Il genere *Lactobacillus* lo si ritrova subito dopo la fermentazione alcolica principale.

Esigenze dei batteri lattici

I costituenti che devono esser presenti in un mezzo nutritivo sono:

- **Composti del Carbonio**: sono rappresentati da glucosio e da altri carboidrati. I batteri lattici sono in grado di fermentare l'acido malico e l'acido tartarico (acidità fissa)
- **Composti dell'Azoto**: non avendo la capacità di utilizzare l'N presente nei composti inorganici, richiedono la presenza di amminoacidi o di peptidi, non avendo proprietà proteolitica, non sono in grado di usare le proteine
- **Sali minerali**: P, K, Mg, Ca
- **Fattori di accrescimento**: sono fra i batteri più esigenti in fatto di vitamine quali biotina, tiamina, riboflavina, ecc., tra le quali la tiamina è richiesta dai batteri eterofermentanti del genere *Lactobacillus*, ma non dagli omofermentanti

I fattori che influiscono sullo sviluppo dei batteri lattici sono:

- **Temperatura**: esistono batteri lattici sia mesofili che termofili, con ottimi termici compresi fra i 45 e i 25 °C. Dal punto di vista enologico, i più importanti sono quelli mesofili, in quanto i termofili, pur avendo la capacità di svilupparsi in vino, non hanno molto interesse, poiché difficilmente la temperatura può raggiungere livelli adeguati.
- **pH del mezzo**: i valori ottimali sono compresi fra 5 e 7, con i livelli minimi, più importanti, prossimi a 3
- **Aerazione del mezzo**: è importante che il mezzo manchi completamente di O₂, essendo m.o. anaerobi o anaerobi facoltativi.
- **Grado alcolico**: possono sopportare gradazioni alcoliche elevate, anche maggiori a 10°.
- **Resistenza alla SO₂**: sono sensibili alla SO₂ quando il pH è prossimo a 3. La sensibilità si riduce all'aumentare del pH, questo perché la SO₂ diviene attiva a quei valori di pH ai quali i batteri si sviluppano con difficoltà.
- **Concentrazione salina**: tollerano concentrazioni saline superiori al 2,5%, questo è un fattore di poca importanza enologica.

Importanza dei batteri lattici

I batteri lattici partecipano a diversi processi fermentativi naturali, e vengono ampiamente utilizzati nelle industrie alimentari, in particolare:

- sono utilizzati per la produzione industriale di acido lattico da siero di latte
- sono i principali agenti della maturazione dei formaggi
- sono i principali agenti della fermentazione dei foraggi insilati
- insieme ai lieviti sono i costituenti dei cosiddetti lieviti naturali, usati per i prodotti da forno (panettoni e simili)
- sono gli agenti della fermentazione degli insaccati
- hanno azione antiputridogena essendo organismi acidogeni
- sono usati per la determinazione di amminoacidi e di vitamine
- sono gli agenti della fermentazione malo-lattica dei vini

In alcuni casi, i batteri lattici possono essere estremamente dannosi:

- alcuni specie del genere *Streptococcus* possono essere patogene per l'uomo e per gli animali
- negli zuccherifici possono causare perdite dirette di saccarosio per sua fermentazione e indiretta per abbassamento del pH, in questo caso vengono combattuti con aldeide formica
- negli zuccherifici, i batteri eterolattici come quelli del genere *Leuconostoc*, possono causare la formazione di grandi gomme che ostacolano i movimenti dei liquidi e impediscono la lavorazione
- sono gli agenti delle più temute malattie dei vini quali filante, agrodolce e girato.

La fermentazione malo-lattica

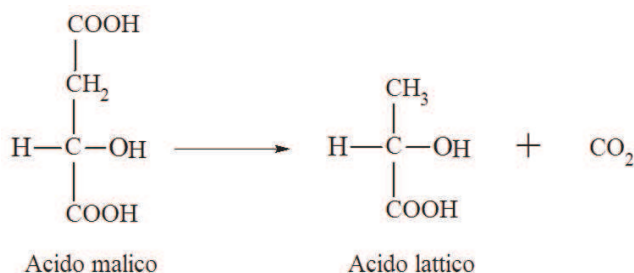
Consiste nella conversione dell'acido malico in acido lattico, mediata dall'attività del batterio lattico *Leuconostoc oenos* e dall'intervento di altri lattobacilli che hanno la capacità di sopportare bassi valori di pH; come l'omofermentante *Lactobacillus plantarum* e gli eterofermentanti *Lactobacillus brevis*, *buchneri*, *hilgardii*, *trichodes*, *fructivorans*, *desidiosus*, *yamanahiensis*, batteri che hanno un'importanza secondaria, mentre l'agente promotore di tale processo è il *Leuconostoc oenos*.

Alcuni batteri importanti nella fermentazione malo-lattica sono:

- *Pediococcus cerevisiae*: cellule di forma sferica riunite in coppie o in tetradi; in anaerobiosi forma colonie superficiali di colore bianco tendente al giallo; è un batterio omofermentante il cui optimum termico è di 25 °C e quello di pH è di 3,5~6,2
- *Leuconostoc oenos*: cellule di forma sferica riunite in paia o in catenelle; si sviluppa bene in mezzi con pH = 4,2~4,8 e temperature minime di 10 °C e massime di 35 °C, con ottimi compresi fra 18 e 24 °C; è un batterio eterofermentante e ha la capacità di fermentare l'acido malico
- *Lactobacillus plantarum*: cellule a forma di bastoncino diritto; è un batterio omofermentante che si sviluppa bene a intervalli termici compresi fra 30~35 °C
- *Lactobacillus hilgardii*: cellule a forma di bastoncino, singole o riunite in catenelle o in filamenti; è un batterio eterofermentante, con una temperatura ottimale di sviluppo compresa fra 28~34 °C, con un minimo di pH = 3,8
- *Lactobacillus brevis*: è simile a *L. brevis*, dal quale si differenzia per la capacità di fermentare alcuni zuccheri e per alcune richieste nutrizionali
- *Lactobacillus fructivorans*: cellule a forma di bastoncino, singole o riunite in catenelle; lo sviluppo è molto lento ed è capace di tollerare elevate percentuali di alcol etilico (15°); ha una temperatura ottimale di sviluppo compresa fra 25~30 °C e pH = 4,5~5,5.

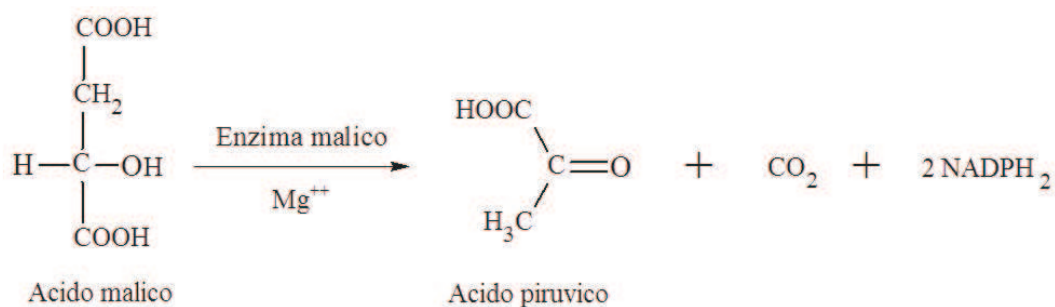
Biochimismo della fermentazione malo-lattica

Dal punto di vista chimico, la fermentazione malo-lattica consiste nella conversione di una molecola di acido malico in una molecola di acido lattico e una di CO₂ secondo la reazione:

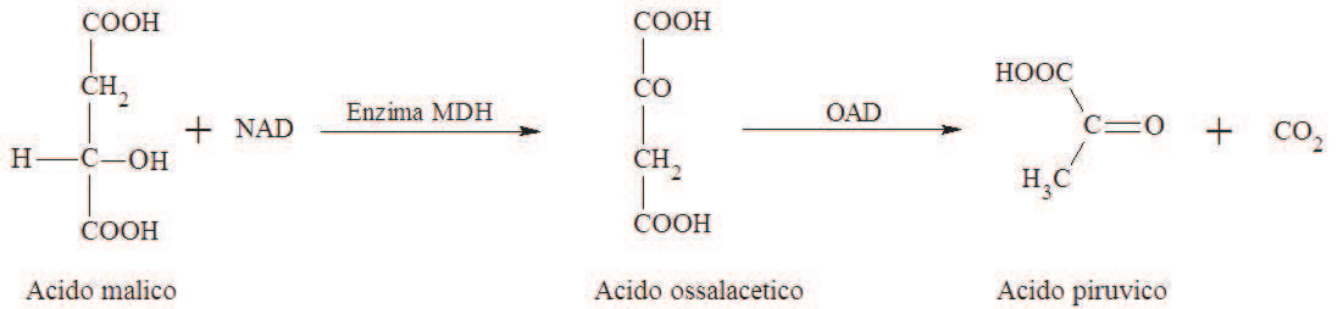


Il processo però non si svolge per decarbossilazione diretta dell'acido malico, ma per l'attività di due enzimi: l'enzima malico e l'enzima malico-deidrogenasi:

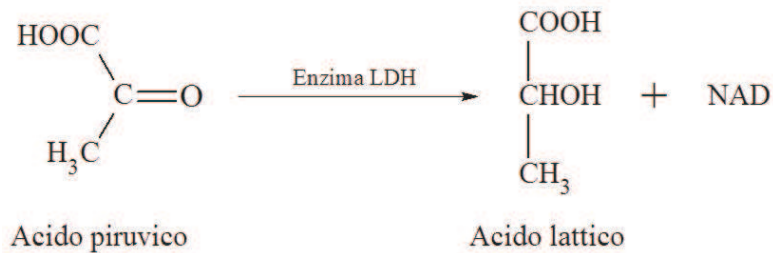
- l'enzima malico è NADP⁺ dipendente e la sua attività è condizionata dalla presenza di cationi bivalenti come il Mn²⁺ o Mg²⁺; ha un optimum termico di 35 °C e un pH = 7~7,2; non è molto sensibile all'etanolo tanto che a 15 ° alcolici conserva ancora l'87% della propria attività; esso andrebbe a catalizzare la reazione con la quale l'acido malico viene convertito ad acido piruvico e CO₂:



- l'enzima malico–deidrogenasi (MDH) è NAD^+ dipendente ed è attivo a pH più elevati 9~9,5; esso porta alla formazione di acido ossalacetico, dal quale poi proviene l'acido piruvico per azione dell'enzima ossalacetato–decarbossilasi (OAD):



In entrambi i casi la reazione fino ad acido malico è completata grazie all'azione dell'enzima lattato–deidrogenasi (LDH):



La fermentazione malo–lattica è endoergonica, nel senso che affinché essa possa verificarsi richiede energia e anche piccole quantità di zuccheri fermentescibili. Da questo processo si viene a formare solo acido lattico nel caso di fermentazione omolattica; mentre con fermentazione eterolattica si vengono a creare, oltre all'acido lattico, altri composti come acido acetico, acetoino, diacetile e vari esteri. Le caratteristiche di gusto e di profumo cambiano in maniera nettissima, portando in certi casi un deciso miglioramento e affinamento della qualità del vino, in altri casi un deciso crollo della qualità stessa.

Effetti della fermentazione malo–lattica

- riduzione dell'acidità totale e conseguente aumento di pH
- produzione di CO_2
- formazione di torbidità
- gusto più gentile per la sostituzione dell'acido malico, che lega la bocca, con un acido più gradevole, l'acido lattico
- produzione di aromi per la presenza di acetoino, diacetile e vari esteri
- cambiamento netto delle caratteristiche del vino, in alcuni casi positive, in altre negative.

La fermentazione malo–lattica è gradita nel caso di vini che hanno un'eccessiva concentrazione di acido malico, nei quali induce un miglioramento, mentre nel caso di vini giovani con bassa concentrazione di acido malico, essa non è vantaggiosa, in quanto l'acido suddetto conferisce il sapore tipico che si intende conservare, quindi i motivi che portano ad indurre questo processo sono 2:

1. uve con eccessivo contenuto di acido malico
2. per migliorare qualitativamente il vino

La fermentazione malo–lattica viene detta anche **fermentazione secondaria** o **disacidificazione biologica** e deve avvenire sempre nei vini rossi, poiché questi non devono essere aggressivi (per la presenza di acido malico), mentre nei vini poco acidi o in quelli che devono mantenersi giovani a lungo (spumanti e frizzanti) o nei vini bianchi, non è detto che debba avvenire e spesso è sgradita; è bene inoltre far avvenire questa fermentazione nei vini che hanno una concentrazione di acido malico superiore al 7%.

Condizioni che favoriscono od ostacolano la fermentazione malo-lattica

1. **pH del vino:** è il fattore più importante e più difficile da controllare; quando è prossimo a 3, il *Leuconostoc oenos* trova difficoltà nel svilupparsi, per poi essere completamente inibito ad un valore inferiore; normalmente la fermentazione malo-lattica è favorita da bassi valori di pH, trovando livelli ottimali compresi fra 3 e 4; inoltre influisce sull'attività antisettica della SO₂, esaltandola con un suo diminuire
2. **SO₂:** in presenza di un basso valore di pH, livelli di SO₂ totale pari a 100~150 mg/l di SO₂, di cui valori compresi fra 50 e 150 mg/l di SO₂ combinata e fino a 10 mg/l di SO₂ libera, possono disturbare gravemente il processo
3. **azione dell'O₂ e della CO₂:** essendo anaerobi facoltativi e microaerofili, sono stimolati dalla presenza di O₂, così come sono stimolati dalla presenza di CO₂
4. **temperatura:** i batteri responsabili del processo sono mesofili, e in particolare il *Leuconostoc oenos* ha livelli termici ottimali compresi fra 18~24 °C con valori minimi di 10 °C.
5. **rapporti con i lieviti:** i lieviti possono avere un'azione inibitrice o stimolante nei confronti della fermentazione malo-lattica:
 - a. **azione inibente:** tutti i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che producono SO₂ durante la fermentazione
 - b. **azione stimolante:** i ceppi di *S. cerevisiae* dotati della massima capacità malo-alcolica, in quanto abbassano la concentrazione dell'acido malico e agevolano lo sviluppo dei batteri lattici, e quei ceppi che abbassano la concentrazione di SO₂ aggiunta ai mosti. L'etanolo non ha azione inibente fintanto che la sua concentrazione non raggiunge livelli apprezzabili (superiori a 10°)

Inoltre la prolungata permanenza dei lieviti nel vino influisce positivamente sui batteri lattici, soprattutto nel caso in cui i lieviti vadano contro ad autolisi, in quanto il lisato di lievito è un ottimo integratore dei mezzi nutritivi tipici dei batteri lattici.

Procedimenti per favorire la fermentazione malo-lattica

- Livello iniziale di pH = 3,3~3,4
- Presenza di vinacce, poiché innalzano il pH e perché si ha un incremento di nutrienti, mentre i trattamenti di chiarificazione fatti dopo la pigiatura dell'uva, agiscono negativamente in quanto impoveriscono il mezzo di composti nutritivi necessari ai batteri lattici
- L'SO₂ dev'essere usata in quantità non superiore ai 50 mg/l, e ciò è possibile evitando di usare lieviti produttori di SO₂
- Il vino dev'essere mantenuto ad una temperatura superiore ai 12°C e il più vicino possibile ai 24 °C per tutta la durata della fermentazione malo-lattica

Procedimenti per impedire la fermentazione malo-lattica

- Bisogna mantenere basso il pH
- L'SO₂ dev'essere aggiunta in 2 momenti: metà ai mosti prima che inizi la fermentazione alcolica e l'altra metà nel vino, così da ottenere un prodotto più ricco di SO₂ libera
- Sottoporre i vini a filtrazione su membrane con pori di 0,22~0,45 µm, che permettono di eliminare la maggior parte delle cellule batteriche lattiche
- Eseguire, dopo l'imbottigliamento, la pasteurizzazione del vino, sottoponendolo ad un trattamento termico di 55 °C per 30 minuti, in modo da uccidere tutte le cellule di batteri lattici, comprese quelle di *Leuconostoc oenos*
- Usare un enzima idrolitico (lisozima) che ha la capacità di disgregare la parete cellulare dei batteri lattici provocandone la morte.

Scelta della specie e selezione dei ceppi

La specie principalmente coinvolta nella fermentazione malo-lattica è il batterio lattico *Leuconostoc oenos*, posto che alla determinazione del processo vi concorrono altre specie come il *Lactobacillus plantarum*, che pur non essendo altrettanto acidofilo, è molto vigoroso e più versatile, potendo resistere all'azione combinata di diversi fattori negativi, ecco perché si è ipotizzato che questo risulti più idoneo nelle fasi iniziali della fermentazione.

Gli aspetti da considerare nella selezione dei ceppi sono:

1. Tolleranza all'alcol
2. tolleranza alla SO₂ a concentrazioni superiori a 50 mg/l
3. capacità di sviluppo anche a valori di pH = 3
4. capacità di sviluppo a temperature di 10~15 °C
5. conferimento di buone caratteristiche organolettiche
6. incapacità di produrre gomme o mucillagini extracellulari

Preparazione delle precolture

Il *Leuconostoc oenos* presenta uno sviluppo in vino molto difficoltoso, e subito dopo l'inoculazione molte cellule muoiono; ciò richiede l'aggiunta di precolture sviluppate in mezzo; le precolture vengono preparate nel modo seguente:

1. preparare un mosto d'uva diluito al 50% con acqua, al quale vengono aggiunti 5 grammi/l di estratto di lievito e con pH portato a 4,5
2. dopo sterilizzazione, il mezzo viene inoculato con la coltura selezionata e messo in termostato a 25 °C.
3. dopo circa una settimana, la coltura, nel pieno dello sviluppo è pronta per essere inoculata direttamente nel mosto o nel vino.

Le precolture così preparate possono essere aggiunte in tre diversi momenti:

1. **ai mosti prima** che inizi la fermentazione alcolica e contemporaneamente ai lieviti selezionati: vini novelli e vini bianchi
2. **ai mosti durante** la fermentazione alcolica: vini da consumarsi entro 5~6 mesi
3. **ai vini**, dopo conclusa la fermentazione alcolica: vini a lungo invecchiamento.

Biotechnologie delle rifermentazioni

La rifermentazione in autoclave

La rifermentazione in autoclave viene utilizzata per la produzione di vini spumanti, i quali vengono ottenuti anche mediante la tecnica della rifermentazione in bottiglia. Tra i due processi esistono alcune differenze:

- la dimensione dei recipienti utilizzati
- uso di diversi lieviti selezionati
- la rifermentazione in autoclave è più difficoltosa e richiede una maggiore attenzione nella preparazione e inoculazione della coltura madre
- al termine della rifermentazione i vini sono sottoposti a trattamenti diversi, importanti ai fini della qualità

Caratteristiche dei lieviti selezionati

I lieviti che vengono usati per la rifermentazione in autoclave devono possedere determinati requisiti:

- **Specie:** si prestano bene solo i ceppi riferibili alla specie *Saccharomyces cerevisiae*
- **Vigore fermentativo:** ad un maggiore vigore fermentativo corrisponde un avvio più rapido della fermentazione, nonché un suo più rapido svolgimento a basse temperature
- **Potere fermentativo o alcoligeno:** dev'essere superiore ai 14 °C
- **Resistenza alla SO₂:** il ceppo utilizzato deve presentare una media resistenza
- **Purezza fermentativa:** il ceppo utilizzato deve presentare una bassa capacità nella produzione di acidità volatile
- **Tipo di sviluppo:** sono preferibili i ceppi a sviluppo polverulento, poiché sono più vigorosi, danno maggiori garanzie e hanno cellule che si risospendono uniformemente nei liquidi
- **Potere schiumogeno:** sono migliori i ceppi col maggiore potere schiumogeno, in quanto le loro cellule, dopo agitazione, rimangono in sospensione più a lungo ed assicurano la rapidità del processo di rifermentazione e il suo completamento
- **Fattore killer:** ha un'importanza trascurabile
- **Produzione di SO₂:** la SO₂ che si forma durante la rifermentazione è molto modesta, essa però va ad aggiungersi a quella già presente nel vino; tale aspetto è molto importante poiché esistono lieviti capaci di produrre elevate quantità di SO₂

- **Produzione di H₂S**: sono da preferire i ceppi non produttori H₂S, in quanto danno i risultati più costanti e sicuri, soprattutto nel caso di vini dotati di profumi propri; mentre i ceppi produttori H₂S conferiscono al vino un retrogusto amaro

Le autoclavi sono recipienti cilindrici a tenuta di pressione collaudate a 12 atm, munite di valvole, manometro, impianto di condizionamento termico, termometro, con apertura nella parte basale e dotate di sistemi che permettono l'agitazione e la risospensione delle cellule durante la rifermentazione. Hanno una capacità di 100~200 hl; il vino base è dolcificato con saccarosio o con mosto concentrato rettificato fino alla concentrazione di ~25gr/l.

La rifermentazione in autoclave può essere controllata tramite la lettura dei dati di pressione riportati sul manometro oppure tramite la determinazione degli zuccheri residui, soprattutto nella fase finale.

La rifermentazione in bottiglia

I lieviti che vengono usati per questo tipo di rifermentazione sono simili a quelli usati nella rifermentazione in autoclave, fatta eccezione per due aspetti:

1. i lieviti devono avere uno sviluppo di tipo flocculento, poiché le cellule unendosi in aggregati pesanti cadono nel fondo del recipiente, facilitandone la raccolta: *Saccharomyces ellipsoideus* e *oviformis*
2. il secondo aspetto riguarda il potere schiumogeno. Infatti nel caso in cui vengono usati ceppi con sviluppo polverulento, è bene assicurarsi che non siano schiumogeni, poiché questi in bottiglia tendono a formare un leggero velo superficiale che non si rompe, e nell'eventualità in cui si rompa, tende a riformarsi, ostacolando le operazioni di raccolta delle cellule.

La rifermentazione in bottiglia è più semplice di quella in autoclave ovviamente per la minore grandezza dei recipienti e facilità di manipolazione delle bottiglie.

La precoltura dev'essere aggiunta poco prima dell'imbottigliamento, la massa viene agitata bene al fine di ottenere una sospensione omogenea; tale operazione risulta difficoltosa nel caso in cui si usi un ceppo flocculento, la cui attitudine all'aggregazione verrebbe esaltata dalla presenza dell'alcol.

Le bottiglie vengono quindi chiuse con capsula di plastica e tappo a corona e riposte orizzontalmente in cantina ad una temperatura di 11~13 °C; qui inizierà la rifermentazione che si protrarrà per alcuni mesi, durante i quali, l'andamento del processo può essere controllato analizzando alcuni campioni. Conclusa la rifermentazione, il vino viene messo a contatto con il lievito per un periodo più o meno lungo (fino a 2 anni), al fine di affinarne la qualità. La bottiglia verrà poi inclinata in modo tale da far depositare la massa delle cellule sul collo della bottiglia, che al momento dell'eliminazione dei residui di lievito, si congela e si stappa in modo tale che la pressione all'interno della bottiglia espelle il cilindretto congelato. A questo punto il vino viene rabboccato con uno sciroppo di vino e zucchero (*liquer d'expédition*) e ritappato.

Malattie del vino

Bisogna innanzitutto fare distinzione tra malattia e difetto:

- La **malattia** è un'alterazione del vino causata da microrganismi che alterano prevalentemente le caratteristiche organolettiche del vino
- Il **difetto** è invece di natura prevalentemente chimico-fisica e coinvolge nella maggior parte dei casi gli aspetti visivi (torbidità, ecc.)

Le malattie, a seconda del tipo di microrganismo, si distinguono in:

- **Malattie causate da m.o. aerobi**: fioretta e acescenza
- **Malattie causate da m.o. anaerobi**: agrodolce, girato, filante e amaro

Vi sono inoltre m.o. facoltativi che, se agiscono da aerobi, danno malattie tipiche dei m.o. aerobi, viceversa, se agiscono da anaerobi daranno le malattie tipiche dei batteri anaerobi.

Le malattie differiscono ancora a seconda dell'agente che le provoca, distinguiamo tra:

- **Lieviti**: fioretta, spunto
- **Batteri**: le restanti malattie

Può accadere che dopo la vinificazione il vino si intorpidisca (**intorpidimento microbico**), ciò accade per via di un eccesso di zuccheri che vengono fermentati dai lieviti residui del vino agevolati da eventuali alte temperature. Questa però non è una malattia perché non modifica le caratteristiche organolettiche del vino, tuttavia è un aspetto negativo se si verifica quando il prodotto è già in bottiglia.

Si hanno malattie diverse a seconda del prodotto attaccato: quando si attaccano gli zuccheri, si ha la **fermentazione lattico-mannitica** o **agrodolce**, quando si attaccano gli acidi organici si può avere il girato, che coinvolge l'acido tartarico oppure la fermentazione malo-lattica quanto viene attaccato l'acido malico. Quest'ultima è considerata una malattia solo se si vuole lasciare una certa quantità di acido malico, altrimenti non lo è.

Fioretta

È una malattia causata dai lieviti dei generi *Pichia*, *Hansenula* e *Candida*. Il primo fattore scatenante è l'ossigeno, quindi colpisce i vini contenuti in recipienti scolmi.

Gli altri fattori che agiscono in seguito a quello scatenante, sono:

- Bassa gradazione alcolica
- Elevata temperatura: superiore a 25 °C
- pH = 4
- ritardo nei travasi.

I travasi devono essere eseguiti per eliminare la feccia che, oltre a contenere parti inerti (foglie, terra, ecc.) contiene anche m.o. morti e può liberare sostanze azotate che fungono da substrato nutritivo per i microrganismi che si possono sviluppare. All'inizio della fermentazione oltre ai lieviti fermentanti, vi sono anche altri m.o. non fermentanti come i generi *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* e altri m.o. Quando è terminata la fermentazione, i lieviti fermentanti scompaiono. Se si creano le condizioni adatte, i m.o. non fermentanti si portano in superficie, formano uno pseudo-micelio come un velo e **ossidano l'alcol etilico ad acido acetico**. Questo si lega con un'altra molecola di alcol etilico per formare l'acetato di etile.

Il primo sintomo che si rileva in un vino colpito da questa malattia è lo **spunto**, infatti questa è la fase iniziale della malattia e l'acido acetico è contenuto in bassissime percentuali pari a 1‰. La malattia procede fino ad arrivare al 4~5‰ di acido acetico. In questa situazione intervengono i batteri acetici e si arriva all'acescenza. Per evitare lo sviluppo della fioretta:

- **non lasciare i recipienti scolmi**, quindi effettuare le colmature,
- **utilizzare azoto inerte oppure SO₂**,
- **curare l'igiene**.

Acrescenza

I batteri acetici sono m.o. aerobi che necessitano di ossigeno e di fonti di azoto come sostanze alimentari. Il genere più importante è *Acetobacter*, seguito da *Gluconobacter*.

Anche i batteri formano veli superficiali che sono più spessi e quindi più resistenti di quelli formati dai lieviti. La caratteristica più importante è che questi m.o. trasformano il vino in aceto con un contenuto di acido acetico del 5%. Il rimedio all'acescenza consiste in:

- **evitare il contatto tra vino e ossigeno**,
- **colmature**,
- **cura dell'igiene**.

Lo spunto, ma non l'acescenza, si può curare aggiungendo del mosto, ad esempio mosto muto, e facendo fermentare nuovamente.

Agrodolce

Detta anche **fermentazione lattico-mannitica**, è la malattia più grave in assoluto. Colpisce il mosto in fermentazione. Il primo fattore scatenante è l'elevata temperatura, infatti i lieviti sono mesofili e lavorano sino a 35 °C. Quando la temperatura si innalza sino a 37~40 °C, i lieviti cessano la loro attività fermentativa. Tuttavia nel mosto c'è ancora zucchero e, in assenza dei lieviti, si sviluppano i **batteri lattici termofili** che vivono bene a tali temperature. Queste temperature elevate si raggiungono se non si controlla la temperatura di fermentazione, dato che questa è una reazione esoergonica, quindi se non si controlla la temperatura si possono tranquillamente raggiungere tali temperature.

I batteri lattici utilizzano il glucosio e lo trasformano in **mannite**, un polialcol, e **acido lattico**. Il sapore risulta quindi dolce e acido, da questo il nome di Agrodolce. Se non ci si accorge dell'aumento della temperatura oltre i 37 °C è quasi impossibile intervenire perché la mannite è difficile da combattere. I rimedi sono:

- **controllo della temperatura:** le cantine possiedono ambienti freschi, i vinificatori sono separati e quasi sempre dotati di intercapedini per il raffreddamento; nel caso di vinificazioni in piccole quantità si possono introdurre nella massa contenitori pieni d'acqua, meglio se piccoli perché possiedono maggiore superficie disperdente
- **utilizzo di SO₂**

Girato o subbollimento o cerchione

Colpisce i vini poco alcolici o quelli che provengono da uve peronosporate, in particolare i rossi. Quando il vino viene lasciato con le fecce, si possono sviluppare i fermenti lattici, i quali producono una notevole quantità di CO₂ e formano una torpidità a nuvola tipica dello sviluppo batterico. Il prodotto che viene fermentato è l'**acido tartarico**, che viene trasformato in acido lattico e altri composti come **acido acetico** e **acido propionico**, che conferiscono un gusto rancido al vino. Se presa in tempo, non è una malattia gravissima, se trascurata il vino si decolora e l'acidità sparisce. Il girato si può prevenire:

- **evitando di far fermentare uve guaste**, che si possono vinificare separatamente dalle uve sane
- **utilizzando SO₂ in fermentazione.**

La cura è realizzabile solo nella fase iniziale della manifestazione della malattia, con solforazione e filtrazione. Nella fase avanzata non si può intervenire e l'unico destino del vino è la distillazione.

Filante

Colpisce i vini bianchi poco alcolici con bassa acidità fissa, ricchi in zuccheri e proteine. Il vino colpito da filante si presenta con una consistenza mucillaginosa e vischiosa. La malattia è dovuta all'intervento di batteri lattici capsulati che si riuniscono in catene (genere *Leuconostoc*) e conferiscono al vino un tipico aspetto mucoso. Questi m.o. hanno bisogno di un substrato ricco di Azoto per produrre la capsula. È una malattia curabile mediante:

- **travasi**, sbattendo il vino così da rompere le catenelle, seguiti da filtrazione.

In prevenzione, si può anche in questo caso, intervenire con SO₂.

Amaro

Non è da confondere con l'aroma amaro tipico di alcuni vini, come *Cannonau* o *Vermentino*. La malattia colpisce vini bianchi con bassa gradazione alcolica ed è dovuta all'attacco della **glicerina**, che viene trasformata in **aldeide acrilica**, che possiede un gusto amaro disgustoso. La causa non è dovuta alla glicerina ma ad un alto tenore di Azoto che è un buon substrato per lo sviluppo di batteri lattici eterofermentanti.

Si può contenere lo sviluppo di questi batteri con SO₂.