

P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu,
B. Donèche, A. Lonvaud

Trattato di Enologia

Microbiologia del vino
Vinificazioni

1

Quarta edizione italiana

 **edagricole**

1ª edizione: marzo 1957
2ª edizione: marzo 2003
3ª edizione: marzo 2007
4ª edizione: agosto 2017



Traduzione dal francese della quarta edizione italiana di: Antonella Bosso, Maria Carla Cravero, Emilia Garcia Moruno, Mario Ubigli

Titolo originale dell'edizione francese: *Traité d'œnologie. 1. Microbiologie du vin - Vinifications*

© 1998, 2004, 2012, Dunod, Paris (6ème édition).

5507

© Copyright 2017 by «Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl»,
via Eritrea, 21 - 20157 Milano

Redazione: P.zza Galileo, 6 - 40123 Bologna
Vendite: tel. 051/6575833; fax: 051/6575999
e-mail: libri.edagricole@newbusinessmedia.it
<http://www.edagricole.it>

Proprietà letteraria riservata - Printed in Italy

La riproduzione con qualsiasi processo di duplicazione delle pubblicazioni tutelate dal diritto d'autore è vietata e penalmente perseguibile (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n. 633). Quest'opera è protetta ai sensi della legge sul diritto d'autore e delle Convenzioni internazionali per la protezione del diritto d'autore (Convenzione di Berna, Convenzione di Ginevra). Nessuna parte di questa pubblicazione può quindi essere riprodotta, memorizzata o trasmessa con qualsiasi mezzo e in qualsiasi forma (fotomeccanica, fotocopia, elettronica, ecc.) senza l'autorizzazione scritta dell'editore. In ogni caso di riproduzione abusiva si procederà d'ufficio a norme di legge.

Impianti: Emmegi Group, via F. Confalonieri, 36 - 20124 Milano

Stampa: Rotolito Lombarda, via Sondrio 3 - 20096 Seggiano di Pioltello (MI)

Finito di stampare nell'agosto 2017

ISBN-978-88-506-5507-6

Prefazione alla VI Edizione Francese

Da alcuni anni si assiste ad un'accelerazione nell'acquisizione di nuove conoscenze sulla vite e sul vino. La realizzazione del sequenziamento e dell'interpretazione del genoma della vite ne è un esempio, ne consegue la possibilità di effettuare ricerche mirate sulla sintesi di numerosi costituenti dell'uva di interesse enologico. Si aprono così dei nuovi percorsi investigativi riguardanti le relazioni fra l'accumulo dei composti fenolici e di certuni aromi con il vitigno o con le condizioni dell'ambiente. Il perfezionamento degli strumenti di analisi contribuisce, per parte sua, a questo rapido avanzamento delle conoscenze enologiche.

In considerazione di questi progressi, seppur ritirati da alcuni anni, il professor Pascal Ribéreau-Gayon, docente onorario della Facoltà d'Enologia, ci ha incitato a proseguire con una nuova edizione del Trattato interamente rivista e corretta. Con il collega professore Philippe Darriet, Direttore dell'unità di ricerca Enologia, abbiamo assunto il coordinamento di questo aggiornamento, affiancati dagli autori dei diversi capitoli. Noi vorremmo dedicare questa nuova edizione del 2012 alla memoria del professor Pascal Ribéreau-Gayon che ci ha lasciati nella primavera del 2011.

Il piano dell'opera non è cambiato. Alcuni capitoli hanno subito delle importanti modificazioni in ragione dei risultati recentemente acquisiti, mentre altri hanno subito minori modifiche. Si è conservato, come nelle precedenti edizioni, il medesimo spirito corrispondente alla concezione dell'enologia bordolese e utilizzando i progressi delle scienze fondamentali per analizzare gli intimi meccani-

smi della trasformazione dell'uva in vino. Il Trattato di Enologia, in questa nuova edizione, continua ad essere un testo di riferimento per studenti e professionisti che vogliono aumentare le loro conoscenze o risolvere dei problemi tecnici.

Rinnoviamo i nostri sinceri ringraziamenti a quanti, membri della facoltà e/o dell'unità di ricerca Enologia, in seno all'Istituto delle Scienze della Vite e del Vino, hanno contribuito con le loro competenze all'aggiornamento di questa opera:

- **Jean-Christophe Barbe**, Maestro di Conferenze a Bordeaux Sciences Agro (Vol. 1, Capp. 8, 9) riguardanti il biossido di zolfo ed i prodotti complementari;
- **Marina Bely**, Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Capp. 1, 2, 3) riguardanti la microbiologia dei lieviti;
- **Philippe Darriet**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 7, 8) riguardanti l'aroma dei vitigni e le deviazioni aromatiche di origine fungina;
- **Bernard Donèche**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Cap. 10) riguardante la biochimica dell'uva e la sua maturazione;
- **Laurence Geny**, Maestro di Conferenze HDR alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Cap. 10) riguardante la biochimica dell'uva e la sua maturazione;
- **Rémy Ghidossi**, Maestro di Conferenze

Prefazione alla VI Edizione francese

- alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 9, 10, 11, 12) riguardanti i fenomeni colloidali e i procedimenti in uso in enologia;
- **Michaël Jourdes**, Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 6, 9) riguardanti i polifenoli e i fenomeni colloidali nei vini;
 - **Aline Lonvaud**, Professore emerito alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Capp. 1, 4, 5, 6, 7) riguardanti la microbiologia dei lieviti e dei batteri del vino;
 - **Patrick Lucas**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Capp. 4, 5, 6, 7; Vol. 2, Cap. 5) riguardanti la microbiologia dei batteri del vino e le amine biogene;
 - **Stéphanie Marchand-Marion**, Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Cap. 2, 3, 5, 8) riguardanti gli alcoli, gli zuccheri, alcuni composti azotati e i composti associati ad alcune deviazioni;
 - **Isabelle Masneuf-Pomarede**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Capp. 1, 2, 3) riguardanti la microbiologia dei lieviti;
 - **Martine Mietton-Peuchot**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università

Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 10, 11, 12) riguardanti i processi in enologia;

- **Alexandre Pons**, ricercatore distaccato, Unità di ricerca Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 5, 7, 8) riguardanti l'invecchiamento precoce dei vini e il ruolo del glutatione;
- **Pierre-Louis Teissedre**, Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen (Vol. 1, Capp. 8, 9, 12; Vol. 2, Capp. 1, 3, 4, 8, 13) riguardanti il diossido di zolfo ed i prodotti complementari, la vinificazione in rosso, numerosi aspetti della composizione delle uve e dei vini (acidi organici, glucidi, estratto secco e materie minerali, composti fenolici), ruolo dei poliosidi nella eliminazione dei composti responsabili di deviazioni;
- **Cécile Thibon**, Ingegnere di ricerca INRA, Unità di ricerca Enologia, Università Bordeaux Segalen (Vol. 2, Capp. 5, 7) riguardanti gli aromi dei vitigni (composti solforati).

Bordeaux, 7 Luglio 2012

Professor Bernard Donèche

*Docente della Facoltà di Enologia Università
Bordeaux Segalen*

*Direttore del Dipartimento Formazione
dell'Istituto di Scienze della Vite e del Vino.*

Prefazione alla V Edizione Francese

I due volumi del *Traité d'oenologie* sono usciti in libreria nel 1998. Sono stati oggetto di numerose edizioni, sono stati tradotti e pubblicati in inglese, in spagnolo e in italiano. Si direbbe, dunque, che abbiano incontrato un buon successo sia presso gli studenti intenzionati ad approfondire la loro preparazione sia presso i professionisti che hanno probabilmente trovato in quest'opera delle soluzioni ai problemi tecnici con i quali sono venuti a confronto e le basi scientifiche che ne hanno consentito l'interpretazione.

Si è, dunque, ritenuto opportuno predisporre una nuova edizione interamente riveduta e corretta allo scopo di aggiornare le conoscenze enologiche che si sono continuamente evolute nel corso di questi ultimi anni. Il piano dell'opera e la concezione non sono cambiati. Alcuni capitoli sono stati poco modificati giacché gli autori hanno ritenuto che l'evoluzione delle conoscenze non era stata sufficientemente significativa. Altri, invece, hanno subito delle modificazioni molto consistenti, sia perché la redazione iniziale era suscettibile di ulteriore miglioramento, sia perché, più in generale, era opportuno segnalare i risultati ottenuti di nuovi lavori di ricerca e le loro conseguenze pratiche. In alcuni casi sono stati introdotti dei paragrafi supplementari. I due volumi dell'opera possono essere considerati come la quinta edizione del *Traité d'oenologie*, pubblicato per la prima volta nel 1947 e rimaneggiato a più riprese.

In ogni caso, abbiamo cercato di mantenere lo spirito che ha contraddistinto l'edizione precedente, esso corrisponde ad una concezione coerente e costante dell'enologia bordolese.

Si tratta, muovendo da basi scientifiche indiscutibili, che si fondano sulla microbiologia, sulla biochimica e sulla chimica, di spiegare i meccanismi profondi che intervengono nella maturazione dell'uva, nelle fermentazioni e nelle differenti tappe successive dell'elaborazione dei vini, per consentirci di adottare, in ogni situazione, la soluzione più opportuna. È rimarcabile che questo approccio scientifico, che, peraltro, trova le migliori applicazioni nell'enologia dei più grandi vini, si sia imposto nella valorizzazione della qualità e delle specificità dei differenti "terroirs". L'enologia scientifica non comporta la standardizzazione e la banalizzazione della qualità, al contrario, consente di eliminare i difetti e di mettere in luce gli elementi qualitativi specifici delle diverse vendemmie, in funzione delle caratteristiche del vitigno e del territorio che non risultano più mascherate da imperfezioni tecniche.

L'interesse rivolto al vino in questi ultimi anni, travalicante l'aspetto puramente qualitativo, ha raggiunto una dimensione culturale più vasta e ha indotto alcuni a proporre pratiche diverse che, non per questo, rappresentano un progresso significativo. Alcune sono una rivisitazione, sotto diversa forma, di procedimenti conosciuti da molto tempo, altre non dispongono delle basi scientifiche necessarie per la loro comprensione e la loro definizione nell'ambito di applicazione. Per contro noi ci siamo applicati a descrivere dei procedimenti perfettamente validati di cui sono ben conosciute le migliori condizioni di utilizzazione.

Come è avvenuto nella precedente edizione anche in questa, tre aspetti importanti dell'e-

Prefazione alla V Edizione francese

nologia, l'analisi dei vini, la degustazione e l'ingegneria enologica non sono stati deliberatamente presi in considerazione. Tenuto conto della loro importanza, questi temi devono essere oggetto di pubblicazioni separate.

In occasione di questa nuova edizione, gli autori rinnovano i loro sinceri ringraziamenti a quanti hanno apportato la loro competenza per la realizzazione di quest'opera:

- Marina Belly per la cinetica fermentativa e la produzione di acidità volatile (paragrafi 2.3.4 e 14.2.5)
- Isabelle Masneuf per l'alimentazione azotata dei lieviti (paragrafo 3.4.1)
- Gilles de Revel per la chimica della SO₂ e in particolare la natura delle sue combinazioni (paragrafo 8.4)
- Gilles Masson per i vini rosati (paragrafo 14.1)
- Cornelis Van Leeuwen per l'incidenza del regime idrico della vigna sulla maturità dell'uva (paragrafo 10.4.6)

- André Brugirard per i vini dolci naturali francesi (paragrafo 14.4.2)
- Paulo Barros e Josa Nicolau de Almeida per i vini di Porto (paragrafo 14.4.3)
- Justo F. Casas Lucas per i vini di Xérès (paragrafo 14.5.2)
- Alain Maujean per l'aggiornamento e la nuova stesura del paragrafo riguardante i vini di Champagne (paragrafo 14.3).

Infine gli autori ringraziano in modo particolare Blanche Masclef per il ruolo essenziale che ha svolto nella fase di battitura del testo di questa nuova edizione e per la rimarchevole efficacia nel coordinamento della messa a punto del manoscritto.

Bordeaux, 17 maggio 2004

Prof. Pascal Ribéreau-Gayon

Membro corrispondente dell'Istituto

Membro dell'Accademia di agricoltura di Francia

Prefazione alla IV Edizione Francese

Si è sovente fatto notare che il vino è, probabilmente, il prodotto della nostra alimentazione che ha dato luogo al maggior numero di ricerche scientifiche e di pubblicazioni. Certamente, l'interesse rivolto al vino da parte di ricercatori di grande notorietà ha contribuito allo sviluppo dell'enologia, a dimostrazione che questa disciplina, a fianco della sua innegabile utilità pratica, può dare luogo a dei lavori autenticamente scientifici.

In primo luogo, bisogna citare Louis Pasteur, per il quale le malattie del vino hanno costituito un modello semplificato in vista dell'approccio allo studio delle malattie contagiose dell'uomo e degli animali. Concetto che esprime perfettamente in poche parole: «Quando si osserva la birra e il vino messi alla prova da profonde alterazioni, perché questi liquidi hanno dato asilo a degli organismi microscopici che si sono introdotti in maniera invisibile e fortuita al loro interno, dove, in seguito, si sono diffusi, come non essere assillati dal pensiero che fenomeni dello stesso tipo possano e debbano verificarsi, talvolta, anche per l'uomo e gli animali».

A partire dal XIX secolo, la conoscenza del vino, la sua costituzione e le sue trasformazioni, è profondamente evoluta in funzione dello sviluppo delle discipline scientifiche (chimica, biochimica, microbiologia) alle quali i corrispondenti fenomeni fanno riferimento. Con regolarità ne è conseguito il miglior controllo delle condizioni pratiche della preparazione e della conservazione del vino e, in conclusione, il miglioramento della sua qualità. Questo procedere impone una messa a punto costan-

te dello stato delle conoscenze acquisite sulle scienze e le tecniche del vino.

Da tempo, la scuola bordolese ha largamente contribuito alla diffusione dei progressi dell'enologia mediante la pubblicazione successiva (edizioni Béranger poi Dunod) di numerosi lavori tradotti in diverse lingue:

Analyse du vin - U. Gayon e J. Laborde (1912)

Traité d'œnologie - J. Ribéreau-Gayon (1949)

Analyse et contrôle du vin - J. Ribéreau-Gayon e E. Peynaud (1947 e 1958)

Traité d'œnologie (2 tomes) - J. Ribéreau-Gayon e E. Peynaud (1960 e 1961)

Connaissance et travail du vin - E. Peynaud (1971 e 1981)

Sciences et techniques du vin (4 tomes) - P. Ribéreau-Gayon e P. Sudraud (1975 a 1982)

Per fare il punto sulle conoscenze attuali, gli autori propongono un'opera intitolata *Traité d'œnologie. Tome I: Microbiologie du vin. Vinification*. Completata da un secondo volume, *Traité d'œnologie. Tome II: Chimie du vin. Stabilisation et traitements*.

Questi libri, pur scritti da ricercatori, non si rivolgono esclusivamente ai ricercatori. Anche se, questi, in particolare i più giovani troveranno la possibilità di collocare i loro interessi personali nel quadro della conoscenza enologica globale: oggi, la complessità dell'enologia non consente a un unico ricercatore di abbracciare tutte le discipline.

Ma questi libri si rivolgono anche agli studenti e ai tecnici delle aziende. Essi devono trovarvi l'interpretazione teorica dei problemi che riscontrano nella pratica di cantina, al fine di

adottare, fra le soluzioni che vengono proposte per risolverli, quelle che meglio si adattano a ciascuna situazione. Per poter raggiungere questi obiettivi, gli enologi devono disporre di conoscenze scientifiche adeguate. Nell'ambito della microbiologia del vino, l'applicazione delle tecniche della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica sono oggi indispensabili. Così come per affrontare i problemi della chimica del vino, devono essere padroneggiati i metodi fisico-chimici di analisi quantitativa e di analisi strutturale (cromatografia, RMN, spettrometria di massa).

La concezione stessa di questi volumi non giustifica una bibliografia esauriente per ciascun tema affrontato. Essa si limita alle pubblicazioni che riteniamo più significative. Abbiamo privilegiato, senza dubbio, la bibliografia in lingua francese, poiché riteniamo sia, talvolta, poco conosciuta.

Allo stesso modo abbiamo cercato di far prevalere una certa concezione francese, e più specificamente bordolese, dell'enologia e dell'«arte di fare il vino»; essa cerca di valorizzare la qualità potenziale delle differenti uve, basate sulle specifiche condizioni naturali che costituiscono il *terroir*.

Il ruolo dell'enologia è di favorire l'espressione della qualità e della tipicità dell'uva che dipende dalla natura del vitigno e dalle tecniche di coltura della vite, ma anche, dalle condizioni di maturazione, indotte esse stesse dai fattori naturali del suolo e del clima.

Tuttavia, sarebbe sicuramente un errore ritenere che i grandi vini siano esclusivamente il risultato di una tradizione ancestrale che si fonda su delle condizioni naturali eccezionali e che solo ai prodotti più ordinari, elaborati in impianti di grandi capacità, possano beneficiare dei progressi delle scienze e delle tecniche. Certamente questi valorizzano al meglio le prestazioni delle installazioni e dell'industrializzazione delle operazioni, ma la storia insegna, senza equivoci, che i progressi dell'enologia più significativi sia per la qualità sia in generale (per esempio la fermentazione malolattica) sono stati acquisiti sui grandi vini e le tecniche messe a punto sono state in seguito trasferite alle produzioni meno prestigiose.

Una tecnologia ad elevate prestazioni è indi-

spensabile per i grandi vini, poiché la loro grande qualità è la più suscettibile di essere minacciata da una gestione imperfetta, della tecnica, senza conseguenze per dei vini meno raffinati.

Noi utilizziamo la parola «vinificazione» che fa parte del linguaggio tecnico della tradizione francese. Questa espressione rappresenta una prima fase della tecnologia del vino e ingloba tutti i problemi tecnici che vanno dalla raccolta delle uve sino alla fine dei fenomeni fermentativi (fermentazione alcolica ed eventualmente fermentazione malolattica). Essa è seguita da una seconda fase, che riguarda il prodotto fino all'imbottigliamento, designata con le parole «affinamento, stabilizzazione, trattamenti»; l'espressione «invecchiamento» è specificatamente riservata alle trasformazioni del vino in bottiglia.

Questa distinzione in due fasi deriva certamente dalle consuetudini del commercio. Tradizionalmente, in Francia, la vigna era coltivata da un viticoltore che assicurava anche la trasformazione dell'uva in vino grezzo; questo veniva nelle cantine di un negoziante che lo affinava e lo commercializzava, eventualmente dopo averlo imbottigliato. Anche se oggi l'imbottigliamento alla proprietà è fortemente generalizzato, le consuetudini tendono a mantenere una distinzione fra l'«enologia del viticoltore» e l'«enologia del negoziante». Nei paesi di viticoltura più recente, generalmente di lingua inglese, il costume vuole che il vignaiolo, responsabile della coltura della vigna, trasferisca direttamente le uve a una *winery* che assicura tutte le operazioni tecniche fino all'imbottigliamento e alla commercializzazione. Per questa ragione, la tradizione anglosassone parla più volentieri di *wine making* che ingloba l'insieme delle operazioni che vanno dalla recezione delle uve fino all'imbottigliamento.

In questi volumi abbiamo desiderato mantenere la distinzione fra «vinificazione» e «stabilizzazione, trattamenti», perché la prima fase si basa essenzialmente sulla microbiologia e la seconda sulla chimica, è, dunque, una soluzione per collegare le operazioni individuali alle loro discipline di base. Siamo ben consapevoli dei limiti di questa ripartizione.

In vinificazione si ha l'intervento di fenomeni chimici e la stabilizzazione dei vini nel corso della loro conservazione include la prevenzione dalle contaminazioni microbiche.

Di conseguenza, la descrizione delle differenti tappe dell'enologia non obbedisce sempre a una logica così netta come i titoli dell'opera potrebbero far supporre. A titolo di esempio, le contaminazioni microbiche nel corso della conservazione sono trattate nel Volume I. Per questa ragione, le proprietà antisettiche del diossido di zolfo inducono a descriverne l'impiego nel Volume I; questo ha comportato la descrizione delle proprietà chimiche antiossidanti di questa sostanza nel medesimo capitolo. Un ragionamento identico si applica ai coadiuvanti del SO₂, sia antisettici (acido sorbico), sia antiossidanti (acido ascorbico).

Un'altra annotazione concerne l'affinamento sulle fecce dei vini bianchi e le trasformazioni chimiche che ne derivano. Esse non possono essere dissociate dalla vinificazione e sono trattate nel Volume I. Infine, i composti fenolici del vino rosso si basano su aspetti chimici complessi; si è ritenuto opportuno raccogliere in un unico capitolo, del Volume II, tutti gli aspetti comprendenti la natura di queste sostanze, le loro proprietà, la loro evoluzione nel corso della maturazione, della vinificazione e dell'affinamento.

Questo trattato non considera il problema delle attrezzature impiegate nelle diverse operazioni, vengono richiamati solo i principi di ciascuna di esse e la loro incidenza sul prodotto finito. Per esempio, non vengono descritte le apparecchiature per la regolazione termica, né le pigiatrici, né le diraspatrici o le presse, così come i materiali di filtrazione o l'osmosi inversa e gli scambiatori di ioni, né, per finire, viene contattata la tecnologia dell'imbottiglia-

mento. Si tratta di una scelta deliberata, ritenendo che questi importanti problemi giustificerebbero un lavoro specifico dedicato all'«Ingegneria dei processi enologici».

La degustazione è un altro aspetto essenziale per la professione di enologo che non è stato considerato in questi volumi, anche se dà luogo regolarmente a pubblicazioni documentate. Un'ultima considerazione riguarda l'analisi del vino, la cui padronanza è indispensabile per l'enologo, ma che non è stata trattata in quest'opera. Salvo qualche caso particolare, per esempio i composti fenolici, le cui diverse famiglie sono spesso definite secondo criteri analitici.

Gli autori desiderano ringraziare quanti hanno prestato la loro opera nella realizzazione di questo lavoro:

- J.-F. Casas Lucas, paragrafo 14.5.2, Xérès;
- A. Brugirard, paragrafo 14.4.2, Vini dolci naturali;
- J.N. de Almeida, paragrafo 14.4.3, Porto;
- A. Maujean, paragrafo 14.3; Champagne;
- C. Poupot per la preparazione materiale dei capitoli 1, 2 e 13;
- la signorina F. Luye-Tanet per il contributo dattilografico.

Gli autori ringraziano in modo particolare la signora B. Masclef che ha assicurato una parte importante della battitura del testo e il coordinamento della messa a punto del manoscritto.

Bordeaux, il 20 dicembre 1997

Prof. Pascal Ribéreau-Gayon

Membro corrispondente dell'Istituto

Membro dell'Accademia di agricoltura di Francia

Gli Autori

Pascal Ribéreau-Gayon †

Professore emerito presso l'Università Victor Segalen Bordeaux II
Docente onorario alla Facoltà d'Enologia

Denis Dubourdieu †

Professore presso la Facoltà d'Enologia, Università Victor Segalen Bordeaux II, direttore scientifico dell'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin

Bernard Donèche †

Professore presso la Facoltà d'Enologia, Università Victor Segalen Bordeaux II

Aline Lonvaud

Professore presso la Facoltà d'Enologia, Università Victor Segalen Bordeaux II, direttore dell'unità mista di ricerca Enologia - Ampelologia

Hanno collaborato

Jean-Christophe Barbe

Maestro di Conferenze a Bordeaux Sciences Agro
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 8, 9)

Marina Bely

Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 1, 2, 3)

Philippe Darriet

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 7, 8)

Bernard Donèche

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Cap. 10)

Laurence Geny

Maestro di Conferenze HDR alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Cap. 10)

Rémy Ghidossi

Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 9, 10, 11, 12)

Michaël Jourdes

Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 6, 9)

Aline Lonvaud

Professore emerito alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 1, 4, 5, 6, 7)

Patrick Lucas

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 4, 5, 6, 7; Vol. 2, aggiornamento Cap. 5)

Stéphanie Marchand-Marion

Maestro di Conferenze alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 2, 3, 5, 8)

Isabelle Masneuf-Pomarede

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 1, 2, 3)

Martine Mietton-Peuchot

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 10, 11, 12)

Alexandre Pons

Ricercatore distaccato, Unità di ricerca Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 5, 7, 8)

Pierre-Louis Teissedre

Professore alla Facoltà di Enologia, ISVV, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 1, aggiornamento Capp. 8, 9, 12; Vol. 2, aggiornamento Capp. 1, 3, 4, 8, 13)

Cécile Thibon

Ingegnere di ricerca INRA, Unità di ricerca Enologia, Università Bordeaux Segalen
(Vol. 2, aggiornamento Capp. 5, 7)

I Traduttori

Antonella Bosso

Dirigente tecnologo del CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) – Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti

Maria Carla Cravero

Ricercatore del CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) – Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti

Emilia Garcia Moruno

Direttore del CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) – Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti

Mario Ubigli

Già Direttore inc. dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Asti ora CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) – Centro di Ricerca per l'Enologia, Asti

Note riguardanti l'espressione di alcuni parametri della costituzione dei mosti e dei vini

Unità

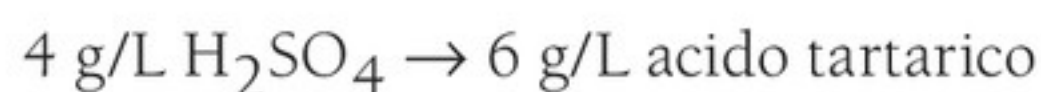
Sono state esclusivamente utilizzate le unità del sistema metrico di lunghezza (m), del volume (L) e del peso (g). La loro conversione in altre unità, di utilizzo comune nei paesi anglosassoni (inch, foot, gallon, pound), si possono trovare in un'opera di enologia ben documentata: Principles and practices of Wine Making, R.B. Boulton, V.L. Singleton, L.F. Bisson, R.E. Kunkee, 1995, The Chapman and Hall Enology Library, New York.

Espressione dell'acidità totale e dell'acidità volatile

Nonostante che il regolamento della CEE raccomandi l'espressione dell'acidità totale in peso equivalente di acido tartarico, in Francia si è conservato l'uso di dare questa espressione in peso equivalente di acido solforico. L'espressione in milliequivalenti (meq) per litro che sarebbe la più corretta non è stata imposta. Nel testo si fa largamente ricorso all'espressione in acido solforico, fornendo in certi casi, la corrispondenza in acido tartarico, molto utilizzato in altri paesi.

A partire dal peso del milliequivalente dei diversi acidi, la tabella a pie' pagina permette di passare semplicemente da un'espressione ad un'altra.

Più particolarmente, per passare dall'acidità totale espressa in H_2SO_4 , a quella espressa in acido tartarico, si aggiunge la metà:



in senso inverso bisogna sottrarre un terzo.

Nel caso dell'acidità volatile, secondo il costume e l'uso corrente francese si esprime in peso equivalente di acido solforico. Più abitualmente, negli altri paesi essa viene rappresentata in peso equivalente di acido acetico. L'espressione in milliequivalenti per litro è poco utilizzata.

La stessa tabella consente di passare con facilità da un'espressione all'altra.

Si può osservare che l'espressione in acido acetico è approssimativamente superiore a quella in acido solforico del 20%.

Valutazione del titolo alcolometrico potenziale dei mosti (TAP)

Si tratta di una determinazione importante per il seguito della maturazione, il controllo della

Coefficienti moltiplicatori che permettono di passare da un'espressione dell'acidità totale o dell'acidità volatile a un'altra.

Espressione nota	Espressione desiderata			
	meq/L	g/L H_2SO_4	g/L a. tartarico	g/L a. acetico
meq/L	1,00	0,049	0,075	0,060
g/L H_2SO_4	20,40	1,00	1,53	1,22
g/L a. tartarico	13,33	0,65	1,00	
g/L a. acetico	16,67	0,82		1,00

vinificazione, eventualmente per la previsione dell'arricchimento in zucchero del mosto (chaptalisation) necessaria (ndt: pratica non consentita nel nostro Paese). Questa determinazione è sempre fatta a partire da una misura fisica, densimetria o rifrattometria.

La lettura del risultato può essere espressa secondo diverse scale, di cui alcune sono oggi più utilizzate, (grado Baumé, grado Oeschlé); esistono due sistemi principali (10.4.3):

- il TAP è fornito direttamente dall'apparecchio che è graduato secondo una scala che corrisponde a 17 o a 17,5 g/L di zucchero per 1% vol. di alcol, oggi la CEE raccomanda 16,83 g/L. Il «mostimetro» è un densimetro munito di due graduazioni, l'una esprime la massa volumica (densità), l'altra fornisce direttamente il TAP. Esistono diversi metodi più o meno precisi, per calcolare il TAP a partire dalla densità e tenendo conto di diversi elementi della costituzione del mosto (Boulton *et al.*, 1995);
- il grado Brix rappresenta la percentuale di zucchero in peso. Moltiplicando il grado Brix per 10, si ottiene il peso dello zucchero in 1 kg di mosto, che rappresenta un po' meno di 1 L. Esiste una tabella di conversione fra i gradi Brix e il TAP (10.4.3). 17 °Brix corrispondono presso a poco a un TAP del 10% vol. e 20 °Brix a un TAP del 12% vol. In prima approssimazione, nella gamma dei gradi alcolici più correnti in enologia, si può moltiplicare il grado Brix per 10, poi dividerlo per 17, per avere una buona approssimazione del TAP.

In ogni caso la determinazione del TAP del mosto è forzatamente approssimata. In primo luogo non è sempre possibile ottenere un campione rappresentativo di un insieme di raccolte o di mosti sui quali effettuare la misu-

ra. Successivamente, dobbiamo riconoscere che le misure fisiche, densità o indice di rifrazione, sono molto precise, ma esse esprimono rigorosamente il tenore in zucchero, come se il mosto fosse una miscela di acqua e zucchero. La misura, nei fatti, è disturbata dagli altri costituenti dell'uva e questa differenza è assai sensibile. Infine, il tasso di conversione dello zucchero in alcol è variabile (approssimativamente da 17 a 18 g/L) e dipende dalle condizioni di fermentazione e dalla natura dei lieviti. La generalizzazione dell'uso dei lieviti selezionati ha permesso di abbassare il valore di questo tasso di conversione.

Determinazione con spettrometria nel visibile e nell'ultravioletto

La misura della densità ottica (o assorbanza) viene largamente impiegata per la determinazione del colore dei vini (Volume II, 6.4.5) e del loro tenore in composti fenolici totali (Volume II, 6.4.1). In questo lavoro, la densità ottica è segnata DO o ancora DO 420 (colore giallo), DO 520 (colore rosso), DO 620 (colore blu) o DO 280 (assorbimento nell'ultravioletto) per esprimere la densità ottica alle lunghezze d'onda indicate.

- L'intensità della colorazione è espressa da:
 $IC = DO420 + DO520 + DO620$ o, qualche volta, sotto forma semplificata;
 $IC = DO420 + DO520$.
- La tinta della colorazione è espressa da:

$$T = \frac{DO420}{DO520}$$

- Il tenore in composti fenolici totali è espresso da DO280.

Le modalità operative sono descritte nel capitolo 6 del Volume II.

Indice generale

Prefazione alla VI Edizione Francese.....	Pag.	III
Prefazione alla V Edizione Francese.....	»	V
Prefazione alla IV Edizione Francese.....	»	VII
Gli Autori	»	X
Hanno collaborato	»	X
I Traduttori	»	XII
Note riguardanti l'espressione di alcuni parametri della costituzione dei mosti e dei vini.....	»	XIII
Parte I - Microbiologia del vino		
1. I lieviti.....	»	3
1.1 Introduzione	»	3
1.2 La parete cellulare	»	4
1.2.1 <i>Il ruolo generale della parete</i>	»	4
1.2.2 <i>La struttura chimica della parete e la funzione dei costituenti parietali</i>	»	5
1.2.3 <i>L'organizzazione generale della parete ed i fattori che influiscono sulla sua composizione</i>	»	8
1.3 La membrana plasmatica	»	8
1.3.1 <i>La composizione chimica e l'organizzazione della membrana</i>	»	8
1.3.2 <i>Le funzioni della membrana plasmatica</i>	»	11
1.4 Il citoplasma e i suoi organuli	»	13
1.4.1 <i>Il citosol</i>	»	13
1.4.2 <i>Il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi ed i vacuoli</i>	»	14
1.4.3 <i>I mitocondri</i>	»	15
1.5 Il nucleo	»	16
1.6 La riproduzione ed il ciclo biologico dei lieviti	»	17
1.6.1 <i>La moltiplicazione vegetativa</i>	»	17
1.6.2 <i>La riproduzione sessuale</i>	»	18
1.7 Il fattore killer	»	21
1.7.1 <i>Introduzione</i>	»	21
1.7.2 <i>La fisiologia e la genetica del fattore killer</i>	»	22
1.7.3 <i>Il ruolo del fattore killer nella vinificazione</i>	»	23
1.8 La classificazione delle specie di lievito	»	25
1.8.1 <i>Generalità</i>	»	25

Indice generale

1.8.2	<i>L'evoluzione dei principi generali della tassonomia dei lieviti e delimitazioni delle specie</i>	Pag.	26
1.8.3	<i>Le successive classificazioni del genere Saccharomyces e la posizione dei lieviti di vinificazione nell'attuale classificazione</i>	»	29
1.8.4	<i>La delimitazione delle specie di vinificazione Saccharomyces cerevisiae e Saccharomyces bayanus con PCR</i>	»	33
1.9	<i>L'identificazione dei ceppi di lieviti di vinificazione</i>	»	39
1.9.1	<i>Principi generali</i>	»	39
1.9.2	<i>L'analisi del DNA mitocondriale</i>	»	39
1.9.3	<i>L'analisi dei cariotipi</i>	»	40
1.9.4	<i>L'analisi dei profili di restrizione del DNA genomico associata all'ibridizzazione del DNA con sonde specifiche (fingerprinting)</i>	»	42
1.9.5	<i>La reazione di polimerizzazione a catena (PCR) associata alle sequenze δ</i>	»	42
1.9.6	<i>La PCR associata ai microsatelliti</i>	»	45
1.10	<i>L'ecologia dei lieviti dell'uva e del vino</i>	»	45
1.10.1	<i>La successione delle specie di lievito dall'uva al vino</i>	»	45
1.10.2	<i>L'ecologia dei ceppi di S. cerevisiae</i>	»	49
2.	Il metabolismo dei lieviti	»	55
2.1	<i>Introduzione</i>	»	55
2.2	<i>Le vie metaboliche della degradazione degli zuccheri</i>	»	56
2.2.1	<i>La glicolisi</i>	»	56
2.2.2	<i>La fermentazione alcolica</i>	»	59
2.2.3	<i>La fermentazione gliceropiruvica</i>	»	59
2.2.4	<i>La respirazione</i>	»	60
2.3	<i>La regolazione delle vie metaboliche di utilizzazione degli zuccheri</i>	»	64
2.3.1	<i>La regolazione fermentazione-respirazione: l'effetto Pasteur e l'effetto Crabtree</i>	»	64
2.3.2	<i>La regolazione fermentazione alcolica-fermentazione gliceropiruvica: accumulo di glicerolo</i>	»	65
2.3.3	<i>La formazione dei prodotti secondari della fermentazione gliceropiruvica a partire dal piruvato</i>	»	65
2.3.4	<i>La formazione e l'accumulo di acido acetico da parte del lievito</i>	»	67
2.3.5	<i>Gli altri prodotti secondari della fermentazione degli zuccheri</i>	»	72
2.3.6	<i>La degradazione dell'acido malico da parte del lievito</i>	»	73
2.4	<i>Il metabolismo dei costituenti azotati</i>	»	74
2.4.1	<i>Le vie di sintesi degli amminoacidi</i>	»	74
2.4.2	<i>I meccanismi di assimilazione dell'ammonio e degli amminoacidi</i>	»	77
2.4.3	<i>Il catabolismo degli amminoacidi</i>	»	78
2.4.4	<i>La formazione degli alcoli superiori e degli esteri</i>	»	79
3.	Le condizioni di sviluppo dei lieviti	»	83
3.1	<i>Introduzione</i>	»	83
3.2	<i>Il controllo della fermentazione</i>	»	83
3.2.1	<i>Il conteggio dei microrganismi</i>	»	83
3.2.2	<i>Il controllo della cinetica di fermentazione</i>	»	84
3.2.3	<i>La misura della temperatura</i>	»	84
3.2.4	<i>L'automazione delle fermentazioni</i>	»	86
3.2.5	<i>La prevenzione della formazione di schiuma</i>	»	87

	Pag.
3.3 Il ciclo di crescita dei lieviti e la cinetica della fermentazione	87
3.4 Il fabbisogno nutrizionale	» 89
3.4.1 <i>Le fonti di carbonio</i>	» 89
3.4.2 <i>Le fonti di azoto</i>	» 90
3.4.3 <i>Il fabbisogno di elementi minerali</i>	» 94
3.5 Gli attivatori della fermentazione	» 94
3.5.1 <i>I fattori di crescita</i>	» 94
3.5.2 <i>I fattori di sopravvivenza</i>	» 95
3.5.3 <i>Altri attivatori della fermentazione</i>	» 98
3.5.4 <i>L'inoculo con lieviti selezionati</i>	» 100
3.6 L'inibizione della fermentazione	» 101
3.6.1 <i>L'inibizione da etanolo</i>	» 101
3.6.2 <i>L'inibizione da parte dei sottoprodotti di fermentazione.</i> <i>L'impiego delle scorze di lievito</i>	» 102
3.6.3 <i>Inibizioni di diversa origine</i>	» 105
3.7 I fattori fisico-chimici che influiscono sulla crescita dei lieviti e il decorso della fermentazione	» 106
3.7.1 <i>L'effetto della temperatura</i>	» 106
3.7.2 <i>L'incidenza dell'ossigeno. Gli effetti dell'arieggiamento del mosto</i>	» 110
3.7.3 <i>L'incidenza della chiarifica dei mosti d'uva bianca</i>	» 113
3.8 Gli arresti di fermentazione	» 114
3.8.1 <i>Le cause degli arresti di fermentazione</i>	» 114
3.8.2 <i>Le conseguenze degli arresti di fermentazione</i>	» 117
3.8.3 <i>Gli interventi nel caso di arresto di fermentazione</i>	» 118
4. I batteri lattici	» 121
4.1 I diversi componenti della cellula batterica	» 121
4.1.1 <i>La parete</i>	» 121
4.1.2 <i>La membrana plasmatica</i>	» 124
4.1.3 <i>Il citoplasma</i>	» 127
4.1.4 <i>Il nucleo ed il materiale genetico</i>	» 128
4.1.5 <i>La moltiplicazione dei batteri</i>	» 128
4.2 La tassonomia dei batteri lattici	» 129
4.2.1 <i>La tassonomia fenotipica e la tassonomia molecolare. Filogenesi</i>	» 129
4.2.2 <i>La classificazione dei batteri lattici del vino. Descrizione dei generi</i>	» 130
4.3 L'identificazione dei batteri lattici	» 132
4.3.1 <i>I principi generali</i>	» 132
4.3.2 <i>L'analisi fenotipica</i>	» 133
4.3.3 <i>L'estrazione e la visualizzazione del DNA per lo studio</i> <i>del genoma</i>	» 136
4.3.4 <i>L'identificazione basata sul polimorfismo di restrizione</i>	» 137
4.3.5 <i>L'identificazione per ibridizzazione DNA/DNA con l'aiuto</i> <i>di sonde specifiche</i>	» 137
4.3.6 <i>L'identificazione con la reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	» 141
4.3.7 <i>L'identificazione in base alla composizione in acidi grassi e proteine</i>	» 142
5. Il metabolismo dei batteri lattici	» 145
5.1 Generalità - Richiami	» 145
5.2 Il metabolismo degli zuccheri	» 146
5.2.1 <i>Il metabolismo omofermentativo degli esosi</i>	» 146

Indice generale

5.2.2	<i>Il metabolismo eterofermentativo degli esosi</i>	Pag.	148
5.2.3	<i>Il metabolismo dei pentosi</i>	»	150
5.3	Il metabolismo dei principali acidi organici del vino	»	150
5.3.1	<i>La trasformazione dell'acido malico</i>	»	151
5.3.2	<i>Il metabolismo dell'acido citrico</i>	»	155
5.3.3	<i>Il metabolismo dell'acido tartarico</i>	»	157
5.4	Le altre trasformazioni suscettibili d'intervenire durante la vinificazione	»	159
5.4.1	<i>La degradazione del glicerolo</i>	»	159
5.4.2	<i>La formazione di ammine biogene</i>	»	160
5.4.3	<i>Il metabolismo dell'arginina</i>	»	163
5.4.4	<i>La sintesi di polisaccaridi esocellulari</i>	»	163
5.5	L'incidenza del metabolismo dei batteri lattici sulla composizione e la qualità dei vini	»	165
6.	Lo sviluppo dei batteri lattici nel vino	»	167
6.1	La nutrizione dei batteri lattici nel vino	»	167
6.1.1	<i>Le fonti d'energia</i>	»	167
6.1.2	<i>Nutrienti, vitamine ed oligoelementi</i>	»	168
6.2	I fattori fisico-chimici della crescita batterica	»	169
6.2.1	<i>L'influenza del pH</i>	»	169
6.2.2	<i>L'effetto del diossido di zolfo</i>	»	171
6.2.3	<i>L'influenza dell'etanolo</i>	»	172
6.2.4	<i>L'effetto della temperatura</i>	»	172
6.2.5	<i>Altri fattori. Adattamento dei batteri alla crescita nel vino</i>	»	173
6.3	L'evoluzione della microflora batterica lattica. Incidenza sulla composizione del vino	»	175
6.3.1	<i>L'evoluzione della popolazione totale dei batteri lattici</i>	»	175
6.3.2	<i>Lo stato vitale ma non coltivabile (VNC) dei batteri</i>	»	178
6.3.3	<i>L'evoluzione delle differenti specie batteriche</i>	»	178
6.3.4	<i>L'evoluzione della composizione del vino nelle diverse fasi dello sviluppo batterico</i>	»	180
6.4	Le interazioni microbiche durante l'elaborazione del vino	»	183
6.4.1	<i>Le interazioni tra i lieviti ed i batteri lattici</i>	»	183
6.4.2	<i>Le interazioni tra batteri lattici</i>	»	187
6.5	L'importanza dei batteriofagi	»	188
7.	I batteri acetici	»	191
7.1	Le caratteristiche principali. Citologia	»	191
7.2	La classificazione e l'identificazione	»	192
7.2.1	<i>La classificazione</i>	»	192
7.2.2	<i>L'isolamento e l'identificazione</i>	»	192
7.3	I caratteri fisiologici principali	»	193
7.4	Il metabolismo dei batteri acetici	»	194
7.4.1	<i>Il metabolismo degli zuccheri</i>	»	194
7.4.2	<i>Il metabolismo dell'etanolo</i>	»	195
7.4.3	<i>Il metabolismo dell'acido lattico e del glicerolo</i>	»	197
7.4.4	<i>La formazione di acetoino</i>	»	197
7.5	L'importanza dello sviluppo dei batteri acetici nel mosto d'uva	»	197
7.6	L'evoluzione dei batteri acetici durante la vinificazione e la conservazione dei vini. Incidenza sulla qualità	»	198

8.	L'impiego del diossido di zolfo (anidride solforosa) nel trattamento dei mosti e dei vini	Pag.	201
8.1	Introduzione	»	201
8.2	Gli effetti fisiologici	»	204
8.3	La chimica del diossido di zolfo	»	206
	8.3.1 <i>Il diossido di zolfo libero</i>	»	206
	8.3.2 <i>Il diossido di zolfo combinato</i>	»	208
8.4	Le molecole che combinano il diossido di zolfo	»	210
	8.4.1 <i>L'etanale</i>	»	210
	8.4.2 <i>Gli acidi chetonici</i>	»	211
	8.4.3 <i>Gli zuccheri ed i derivati degli zuccheri</i>	»	212
	8.4.4 <i>Le molecole dicarboniliche</i>	»	214
	8.4.5 <i>Le altre sostanze in grado di combinare la SO₂</i>	»	214
	8.4.6 <i>Il bilancio della combinazione del diossido di zolfo nei vini da uve bottrizzate</i>	»	215
8.5	Le conseguenze pratiche. Lo stato di combinazione del diossido di zolfo nei vini ..	»	218
	8.5.1 <i>Le reazioni di equilibrio</i>	»	218
	8.5.2 <i>L'influenza della temperatura</i>	»	219
	8.5.3 <i>Le leggi empiriche della combinazione</i>	»	219
8.6	Le proprietà antimicrobiche del diossido di zolfo	»	220
	8.6.1 <i>Le proprietà delle diverse forme</i>	»	220
	8.6.2 <i>L'azione della SO₂ nei confronti dei lieviti</i>	»	221
	8.6.3 <i>Le attività antibatteriche</i>	»	222
8.7	L'impiego del diossido di zolfo in vinificazione	»	223
	8.7.1 <i>Vantaggi ed inconvenienti</i>	»	223
	8.7.2 <i>La protezione dalle ossidazioni</i>	»	223
	8.7.3 <i>L'inibizione, l'attivazione e la selezione dei lieviti</i>	»	225
	8.7.4 <i>La selezione tra lieviti e batteri</i>	»	226
	8.7.5 <i>Il potere dissolvente e gli effetti generali sul sapore</i>	»	227
8.8	Le condizioni di impiego del diossido di zolfo	»	228
	8.8.1 <i>Le dosi di impiego in vinificazione</i>	»	228
	8.8.2 <i>Le dosi per la conservazione e l'imbottigliamento</i>	»	230
	8.8.3 <i>La diminuzione del diossido di zolfo per ossidazione durante la conservazione</i>	»	231
	8.8.4 <i>Le forme di impiego del diossido di zolfo</i>	»	233
	8.8.5 <i>La solfitazione per «méchage» dei fusti</i>	»	234
9.	I prodotti ed i processi che agiscono a complemento del diossido di zolfo	»	237
9.1	Introduzione	»	237
9.2	L'acido sorbico	»	238
	9.2.1 <i>Le proprietà fisiche e chimiche</i>	»	238
	9.2.2 <i>Le proprietà antimicrobiche</i>	»	238
	9.2.3 <i>La stabilità e l'influenza sulle caratteristiche sensoriali</i>	»	240
	9.2.4 <i>Le condizioni di impiego</i>	»	240
9.3	Gli acidi ottanoico e decanoico (acidi grassi a catena corta)	»	241
9.4	Il dimetildicarbonato (DMDC).....	»	242
9.5	Il lisozima.....	»	244
	9.5.1 <i>Natura e proprietà</i>	»	244
	9.5.2 <i>Applicazioni enologiche</i>	»	244

Indice generale

9.6	La distruzione termica dei lieviti (pastorizzazione)	Pag.	245
9.6.1	Introduzione	»	247
9.6.2	I dati teorici sulla termoresistenza dei lieviti nel vino	»	247
9.6.3	Le applicazioni pratiche	»	249
9.7	L'acido ascorbico	»	250
9.7.1	Le proprietà e le modalità di azione	»	250
9.7.2	La protezione dalle ossidazioni enzimatiche	»	252
9.7.3	La protezione dalla casse ferrica	»	252
9.7.4	La protezione delle caratteristiche sensoriali dei vini arieggiati	»	254
9.8	L'impiego dei gas inerti	»	255
9.8.1	La conservazione dei vini sotto gas inerti	»	255
9.8.2	La regolazione del contenuto in diossido di carbonio	»	257

Parte II - Vinificazioni

10.	L'uva e la sua maturazione.....	»	261
10.1	Introduzione	»	261
10.2	La descrizione dell'uva a maturità e la sua composizione	»	262
10.2.1	Il frutto della vite	»	262
10.2.2	La formazione del frutto	»	262
10.2.3	Le fasi di sviluppo dell'uva	»	264
10.2.4	La morfologia dell'uva	»	265
10.2.5	La composizione dell'uva a maturità	»	266
10.3	Le trasformazioni dell'uva nel corso della maturazione	»	269
10.3.1	Le caratteristiche generali della maturazione	»	269
10.3.2	L'accumulo degli zuccheri	»	270
10.3.3	L'evoluzione degli acidi organici	»	273
10.3.4	L'accumulo delle sostanze minerali	»	275
10.3.5	L'evoluzione delle sostanze azotate	»	276
10.3.6	La modificazione delle pareti cellulari	»	277
10.3.7	La sintesi dei composti fenolici	»	278
10.3.8	L'evoluzione delle sostanze aromatiche	»	280
10.4	La definizione di maturità ed il concetto di annata	»	283
10.4.1	La maturità	»	283
10.4.2	Il campionamento e lo studio della maturazione	»	284
10.4.3	La valutazione del livello di maturità e gli indici di maturazione	»	285
10.4.4	L'effetto della luce sui processi biochimici della maturazione	»	287
10.4.5	L'influenza della temperatura sui processi biochimici della maturazione ...	»	288
10.4.6	L'incidenza del regime idrico della vite sulla maturazione dell'uva	»	291
10.4.7	Le condizioni meteorologiche annuali ed il concetto di annata («millésime»)	»	298
10.5	L'influenza di altri fattori sulla maturazione	»	304
10.5.1	La varietà ed il portinnesto	»	304
10.5.2	La natura del suolo e la sua conservazione	»	307
10.5.3	Il sistema di allevamento	»	309
10.5.4	Il controllo della vegetazione da parte dell'uomo	»	309
10.5.5	Gli effetti delle malattie e delle avversità meteorologiche	»	312
10.6	L'intervento della <i>Botrytis cinerea</i>	»	312
10.6.1	La muffa grigia ed il marciume nobile	»	312
10.6.2	La sensibilità dell'uva alla <i>Botrytis cinerea</i>	»	313

10.6.3	<i>Il processo d'infezione nel caso del marciume nobile</i>	Pag.	316
10.6.4	<i>Le modifiche della composizione chimica delle uve attaccate da marciume nobile</i>	»	318
10.6.5	<i>La muffa grigia e le altre forme di muffa</i>	»	321
10.6.6	<i>La valutazione dello stato sanitario delle uve vendemmiate</i>	»	325
11.	La vendemmia e le trasformazioni dell'uva dopo la raccolta	»	329
11.1	Introduzione	»	329
11.2	Il miglioramento dell'uva per sovraturazione	»	330
11.2.1	<i>L'appassimento sulla pianta</i>	»	330
11.2.2	<i>L'appassimento dopo raccolta</i>	»	330
11.2.3	<i>La sovraturazione artificiale</i>	»	331
11.3	La scelta della data di vendemmia e le condizioni pratiche di realizzazione	»	331
11.3.1	<i>La vendemmia</i>	»	332
11.3.2	<i>Il trasporto dell'uva</i>	»	334
11.3.3	<i>La pulizia e la cernita delle uve</i>	»	337
11.3.4	<i>La selezione delle uve e l'estrazione selettiva dei mosti per pressatura a bassa temperatura</i>	»	337
11.4	Le correzioni dell'acidità del mosto	»	338
11.4.1	<i>L'acidificazione</i>	»	338
11.4.2	<i>La disacidificazione</i>	»	340
11.5	L'aumento del tenore zuccherino	»	342
11.5.1	<i>Le tecniche sottrattive</i>	»	342
11.5.2	<i>Le tecniche additive</i>	»	346
11.6	Le trasformazioni enzimatiche dell'uva dopo la raccolta	»	349
11.6.1	<i>Gli enzimi idrolitici</i>	»	349
11.6.2	<i>Gli enzimi di ossidazione</i>	»	353
11.7	L'utilizzo delle preparazioni enzimatiche industriali in vinificazione	»	357
11.7.1	<i>L'estrazione del succo</i>	»	357
11.7.2	<i>La chiarifica dei mosti</i>	»	358
11.7.3	<i>L'estrazione e la stabilizzazione del colore</i>	»	358
11.7.4	<i>La liberazione degli aromi</i>	»	359
12.	La vinificazione in rosso	»	361
12.1	Nozioni generali	»	361
12.2	Le operazioni meccaniche sulle uve	»	363
12.2.1	<i>Il ricevimento delle uve</i>	»	363
12.2.2	<i>La pigiatura delle uve</i>	»	365
12.2.3	<i>La diraspatura</i>	»	367
12.3	Il trasferimento in vasca	»	369
12.3.1	<i>Il trasferimento in vasca del pigiato e gli eventuali interventi</i>	»	369
12.3.2	<i>Le modalità di gestione del cappello di vinacce</i>	»	371
12.3.3	<i>La costruzione delle vasche</i>	»	372
12.3.4	<i>Le attrezzature delle vasche</i>	»	374
12.4	La conduzione della fermentazione alcolica	»	375
12.4.1	<i>L'incidenza delle condizioni ambientali</i>	»	375
12.4.2	<i>Il rimontaggio e l'arieggiamento del mosto</i>	»	378
12.4.3	<i>Il controllo della fermentazione e la valutazione del suo andamento</i>	»	381
12.5	La conduzione della macerazione	»	383
12.5.1	<i>Il ruolo della macerazione</i>	»	383

Indice generale

12.5.2	<i>I diversi tipi di macerazione</i>	Pag.	385
12.5.3	<i>I principi della macerazione</i>	»	385
12.5.4	<i>L'influenza del tempo di macerazione</i>	»	387
12.5.5	<i>L'influenza dei rimontaggi e delle follature</i>	»	389
12.5.6	<i>L'influenza della temperatura</i>	»	390
12.5.7	<i>L'influenza della solfitazione del mosto e dell'alcol formato dalla fermentazione</i>	»	392
12.5.8	<i>L'influenza di diversi processi meccanici e fisici che agiscono direttamente sulle vinacce (flash-détente) e dei campi elettrici pulsanti</i>	»	393
12.5.9	<i>La conduzione della macerazione: qualità delle uve e concentrazione tannica dei vini</i>	»	395
12.6	<i>La svinatura e la pressatura</i>	»	399
12.6.1	<i>La durata della macerazione</i>	»	399
12.6.2	<i>I fattori accidentali che giustificano una svinatura precoce</i>	»	401
12.6.3	<i>La realizzazione pratica della svinatura del vino, in vasca o in fusti</i>	»	404
12.6.4	<i>La pressatura delle vinacce</i>	»	405
12.6.5	<i>La composizione e l'utilizzazione dei vini di pressa</i>	»	407
12.7	<i>La conduzione della fermentazione malolattica</i>	»	409
12.7.1	<i>Cenni storici</i>	»	409
12.7.2	<i>Le trasformazioni del vino provocate dalla fermentazione malolattica</i>	»	413
12.7.3	<i>Il controllo della fermentazione malolattica</i>	»	415
12.7.4	<i>Le condizioni necessarie alla realizzazione della fermentazione malolattica</i>	»	417
12.7.5	<i>Le diverse possibilità di inoculo della fermentazione malolattica</i>	»	420
12.8	<i>I processi di vinificazione in rosso che comportano un'automazione delle operazioni</i>	»	425
12.8.1	<i>Introduzione</i>	»	425
12.8.2	<i>La vinificazione continua</i>	»	425
12.8.3	<i>La vinificazione con macerazione a caldo (termovinificazione)</i>	»	428
12.9	<i>La vinificazione con macerazione carbonica</i>	»	431
12.9.1	<i>Principio – basi teoriche</i>	»	431
12.9.2	<i>Gli scambi gassosi</i>	»	432
12.9.3	<i>Il metabolismo anaerobio</i>	»	432
12.9.4	<i>La trasformazione delle uve per macerazione carbonica</i>	»	436
12.9.5	<i>La microbiologia della macerazione carbonica</i>	»	437
12.9.6	<i>La conduzione della macerazione carbonica</i>	»	437
12.9.7	<i>Le caratteristiche dei vini a macerazione carbonica</i>	»	440
13.	La vinificazione in bianco	»	443
13.1	<i>I caratteri distintivi della vinificazione in bianco</i>	»	443
13.1.1	<i>Il ruolo essenziale delle operazioni prefermentative nella vinificazione dei vini bianchi secchi</i>	»	443
13.1.2	<i>La diversità di tipi di vini bianchi ed i principali stili attuali</i>	»	444
13.2	<i>I criteri di qualità e la raccolta delle uve bianche</i>	»	447
13.2.1	<i>Lo stato sanitario</i>	»	447
13.2.2	<i>La maturità dell'uva e la data della vendemmia</i>	»	451
13.2.3	<i>Le vendemmie</i>	»	454
13.3	<i>L'estrazione del mosto</i>	»	456
13.3.1	<i>Principi generali</i>	»	456
13.3.2	<i>L'estrazione immediata in continuo</i>	»	457

13.3.3	<i>L'estrazione immediata discontinua senza pigiatura</i>	Pag. 458
13.3.4	<i>L'opportunità della pigiatura e della diraspatura nell'estrazione immediata</i>	» 464
13.3.5	<i>La macerazione pellicolare</i>	» 464
13.3.6	<i>La crioselezione e la sovraestrazione</i>	» 468
13.4	<i>La protezione dei mosti contro l'ossidazione</i>	» 468
13.4.1	<i>La diversità delle pratiche attuali</i>	» 468
13.4.2	<i>Richiami sui meccanismi di ossidazione dei mosti</i>	» 469
13.4.3	<i>Le tecniche di protezione dei mosti contro l'ossidazione</i>	» 473
13.5	<i>La sfecciatura</i>	» 474
13.5.1	<i>La formazione e la composizione delle fecce</i>	» 474
13.5.2	<i>L'incidenza della sfecciatura sulla composizione dei vini bianchi secchi</i>	» 475
13.5.3	<i>L'incidenza della sfecciatura sullo svolgimento delle fermentazioni</i>	» 478
13.5.4	<i>La pratica della sfecciatura</i>	» 481
13.5.5	<i>I processi di illimpidimento dei depositi fecciosi</i>	» 483
13.6	<i>La correzione dei mosti e l'opportunità del trattamento con bentonite</i>	» 483
13.7	<i>La conduzione delle fermentazioni</i>	» 484
13.7.1	<i>La vasca di fermentazione</i>	» 484
13.7.2	<i>L'aggiunta di lieviti</i>	» 484
13.7.3	<i>L'aggiunta di sali di ammonio e l'aerazione dei mosti</i>	» 485
13.7.4	<i>Il controllo delle temperature</i>	» 486
13.7.5	<i>Il completamento della fermentazione alcolica</i>	» 487
13.7.6	<i>L'eventualità e la conduzione della fermentazione malolattica</i>	» 488
13.8	<i>L'elaborazione dei vini bianchi secchi in barrique</i>	» 489
13.8.1	<i>Principi</i>	» 489
13.8.2	<i>Il ruolo dei colloidi esocellulari e parietali dei lieviti</i>	» 489
13.8.3	<i>I fenomeni di ossidoriduzione associati alla presenza di fecce</i>	» 491
13.8.4	<i>La natura e la trasformazione da parte dei lieviti delle sostanze volatili cedute dal legno</i>	» 494
13.8.5	<i>L'elaborazione dei vini bianchi in fusto</i>	» 494
13.9	<i>Il controllo dei difetti olfattivi di riduzione nel corso dell'affinamento dei vini bianchi</i>	» 496
13.9.1	<i>L'evoluzione dei composti solforati volatili in un vino bianco secco nel corso dell'affinamento in vasca o in barrique</i>	» 496
13.9.2	<i>L'affinamento dei vini bianchi secchi sulle fecce in vasca di grande volume</i>	» 498
14.	Alcune vinificazioni particolari	» 501
14.1	<i>I vini rosati</i>	» 501
14.1.1	<i>Definizione</i>	» 501
14.1.2	<i>L'importanza del colore per la caratterizzazione dei diversi tipi di vino rosato</i>	» 502
14.1.3	<i>Vinificazione dei vini rosati mediante pressatura diretta</i>	» 504
14.1.4	<i>La vinificazione dei vini rosati per macerazione pellicolare o per salasso</i> ..	» 504
14.2	<i>I vini bianchi liquorosi derivati da uve affette da marciume nobile (Sauternes, Tokay)</i>	» 506
14.2.1	<i>Introduzione</i>	» 506
14.2.2	<i>Il marciume nobile</i>	» 507
14.2.3	<i>La costituzione dei mosti provenienti da uve affette da marciume nobile (10.6.3) e dei rispettivi vini</i>	» 508

Indice generale

14.2.4	<i>L'estrazione dei mosti da marciume nobile</i>	Pag.	510
14.2.5	<i>La conduzione della fermentazione</i>	»	514
14.2.6	<i>L'affinamento e la stabilizzazione</i>	»	515
14.2.7	<i>Il Tokay</i>	»	516
14.3	<i>Lo Champagne ed i vini spumanti</i>	»	517
14.3.1	<i>Introduzione</i>	»	517
14.3.2	<i>La vinificazione dei vini di base</i>	»	518
14.3.3	<i>La presa di spuma nel metodo champenois</i>	»	521
14.3.4	<i>La composizione dei vini di Champagne</i>	»	524
14.3.5	<i>Altri procedimenti di presa di spuma</i>	»	529
14.4	<i>I vini liquorosi</i>	»	531
14.4.1	<i>Introduzione</i>	»	531
14.4.2	<i>I vini dolci naturali di Francia</i>	»	532
14.4.3	<i>I vini di Porto</i>	»	535
14.5	<i>I vini sotto velo</i>	»	537
14.5.1	<i>Definizione</i>	»	537
14.5.2	<i>I vini di Xérès</i>	»	538
14.5.3	<i>I vini gialli del Jura</i>	»	541
	Bibliografia	»	542
	Indice analitico	»	563

PARTE PRIMA
Microbiologia del vino

1 I lieviti*

1.1 Introduzione

Sebbene l'Uomo fabbrichi il pane e le bevande fermentate da tempi remoti, il ruolo dei lieviti nella fermentazione alcolica, in particolare nella trasformazione dell'uva in vino, non è stato chiaramente stabilito fino alla metà del secolo XIX. Gli Antichi spiegavano l'ebollizione della fermentazione (dal latino *fervere*, bollire) come dovuta al contatto, al momento della pigiatura dell'uva, di corpi che reagiscono tra loro per produrre un'effervescenza. Fu un mercante di tessuti olandese, Antoni van Leeuwenhoek, che nel 1680, con l'aiuto di un microscopio di fabbricazione propria, fece le prime osservazioni di lieviti a partire da un mosto di birra, senza stabilire peraltro un legame tra questi corpuscoli e la fermentazione alcolica. Fu necessario attendere la fine del XVIII secolo perché avesse inizio, grazie ai lavori di Lavoisier, lo studio chimico della fermentazione alcolica, proseguito nel secolo successivo da Gay-Lussac. La prima interpretazione della composizione chimica dei fermenti alcolici si deve a Fabroni, uno studioso italiano che nel 1785 li qualifica come sostanza vegeto-animale. Questa sostanza, che secondo lui è confrontabile con il glutine della farina, si troverebbe in vescicole speciali, in particolare sull'uva o sul grano; il suo contatto con gli zuccheri del mosto sarebbe la causa della fermentazione alcolica. Ma la prima dimostrazione che il lievito è un organismo vivente, capace di moltiplicarsi, appartenente al regno

vegetale, la cui attività vitale è all'origine della fermentazione dei liquidi zuccherini, fu presentata da un fisico francese, Charles Cagnard de La Tour, nel 1837. Questa teoria fu confermata dal naturalista tedesco Schwann, il quale dimostrò inoltre che la fermentazione alcolica può essere interrotta con il calore o con certi prodotti chimici; egli chiamò il lievito di birra «Zuckerpilz», cioè «fungo dello zucchero», e da tale denominazione proviene il termine *Saccharomyces*, utilizzato per la prima volta da Meyen nel 1838.

Questa concezione vitalistica o biologica del ruolo del lievito nella fermentazione alcolica, che oggi ci sembra evidente, tardò ad imporsi, in particolare contro l'opinione di alcuni chimici organici (tra i quali niente di meno che Liebig), convinti che certe reazioni chimiche, piuttosto che l'attività di cellule viventi, potessero spiegare la fermentazione degli zuccheri. È finalmente Louis Pasteur che, nelle sue due famose opere *Studi sul vino* (1866) e *Studi sulla birra* (1876), accredita definitivamente la tesi vitalistica della fermentazione alcolica. Pasteur dimostra che i lieviti responsabili della fermentazione spontanea del pigiato o del mosto provengono dalla superficie dell'uva e che esistono diverse razze e specie che si possono isolare. Ipotizza anche che i caratteri gustativi dei vini possano essere influenzati dalla natura dei lieviti che realizzano la fermentazione alcolica. Egli puntualizza, inoltre, l'effetto dell'ossigeno sull'assimilazione degli

* Aggiornamento dell'edizione francese a cura di ISABELLE MASNEUF, ALINE LONVAUD e MARINA BELY. Traduzione italiana di EMILIA GARCIA MORUNO

1. I lieviti

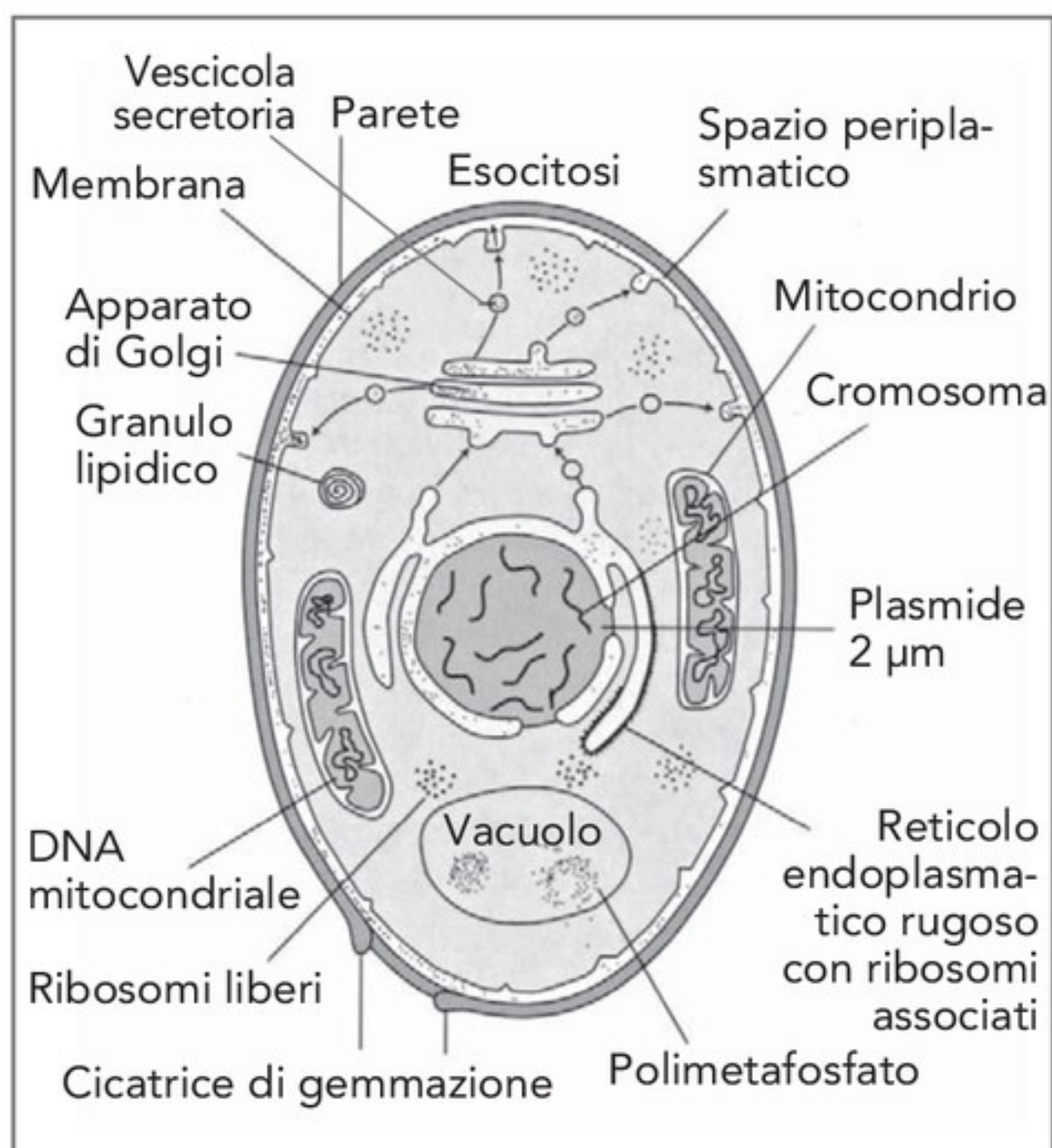


Fig. 1.1 - Disegno schematico di una cellula di lievito (da Gaillardin e Heslot, 1987).

zuccheri da parte dei lieviti e presenta la prova che questi, oltre all'alcol e al gas carbonico, producono altre sostanze in minor quantità, tra le quali il glicerolo.

Dopo Pasteur, i lieviti e la fermentazione alcolica hanno ispirato un numero considerevole di lavori, contribuendo ai costanti progressi della microbiologia, della biochimica e attualmente della genetica e della biologia molecolare.

Dal punto di vista della tassonomia, i lieviti si definiscono come funghi unicellulari, che si riproducono per gemmazione o scissione. Certi funghi pluricellulari, nei quali il ciclo biologico comporta una fase unicellulare, sono assimilati ai lieviti. Gruppo complesso ed eterogeneo, i lieviti si trovano ripartiti in tre classi di funghi, che si caratterizzano per il loro modo di riproduzione: gli Ascomiceti, i Basidiomiceti ed i Funghi Imperfetti. I lieviti dell'uva e del vino appartengono solamente agli Ascomiceti ed ai Funghi Imperfetti. Negli Ascomiceti le spore o ascospore aploidi sono contenute negli aschi, specie di sacchi formati a partire dalla cellula vegetativa. I lieviti asporigeni, nei quali non si è potuto mettere in evidenza un modo di riproduzione sessuale, sono classificati tra i Funghi Imperfetti.

In questo primo capitolo, tratteremo in succes-

sione la citologia, la riproduzione, la tassonomia e l'ecologia dei lieviti dell'uva e del vino.

La citologia è lo studio morfologico e funzionale dei componenti strutturali della cellula (Rose e Harrison, 1991).

Il lievito è il più semplice degli organismi eucariotici. La sua cellula possiede dei rivestimenti cellulari, un citoplasma contenente alcuni organuli ed un vero nucleo, circondato da una membrana e racchiudente i cromosomi (Fig. 1.1).

Come tutte le cellule vegetali, il lievito possiede due rivestimenti cellulari: la parete e la membrana plasmatica. Lo spazio tra la parete e la membrana plasmatica è chiamato spazio periplasmatico. L'insieme citoplasma-membrana plasmatica costituisce il protoplasma. Il termine protoplasto, o sferoplasto, designa una cellula cui si è tolta «artificialmente» la parete. Tenendo conto del ruolo importante che giocano i rivestimenti cellulari del lievito, tanto nello svolgimento della fermentazione alcolica del mosto d'uva che nella composizione del vino, al quale cedono alcuni dei loro costituenti, è importante che il vinificatore o l'enologo abbiano una conoscenza approfondita di questi organuli.

1.2 La parete cellulare

1.2.1 Il ruolo generale della parete

Nel corso degli ultimi venti anni, le conoscenze sulla parete dei lieviti sono progredite considerevolmente (Fleet, 1991; Klis, 1994; Stratford, 1994; Klis *et al.*, 2002).

La parete del lievito rappresenta dal 15 al 25% del peso secco della cellula; di natura essenzialmente polisaccaridica, è un rivestimento rigido ma dotato di una certa elasticità.

La parete assicura la protezione della cellula. Senza parete, la cellula esploderebbe sotto la spinta della pressione osmotica interna, determinata dalla composizione del mezzo. Per esempio, i protoplasti di lievito posti in acqua pura vengono immediatamente lisati. L'elasticità della parete può essere facilmente messa in evidenza collocando in un mezzo ipertonico (NaCl) lieviti interi, prelevati durante la fase di crescita: il volume cellulare decresce

circa del 50%, la parete appare più spessa, mentre la membrana citoplasmatica praticamente non se ne distacca. Ricollocate in un mezzo isotonico, le cellule riacquistano la forma iniziale.

La parete non si può considerare però come una «armatura» semi-rigida inerte; si tratta invece di un organulo dinamico multifunzionale, la composizione e le funzioni del quale si evolvono nel corso della vita della cellula e secondo le condizioni dell'ambiente. Oltre ad avere un ruolo di protezione, la parete, grazie alla sua organizzazione macromolecolare, conferisce alla cellula la propria forma. È anche il luogo in cui si trovano le molecole che determinano certe interazioni cellulari, quali l'unione sessuale, la flocculazione, il fattore killer, che saranno trattati più avanti in questo capitolo. Infine, numerosi enzimi, generalmente delle idrolasi, sono associati alla parete o alloggiati nello spazio periplasmatico; i loro substrati sono costituiti da sostanze nutritive dell'ambiente esterno e dalle macromolecole della parete stessa, costantemente rimaneggiate durante la morfogenesi cellulare.

1.2.2 La struttura chimica della parete e la funzione dei costituenti parietali

La parete del lievito è formata da due componenti principali: i β -glucani e le mannoproteine. La chitina è presente in minor misura. I lavori più dettagliati sulla parete dei lieviti sono stati realizzati su *Saccharomyces cerevisiae*, il principale lievito responsabile della fermentazione alcolica del mosto d'uva.

- **I glucani** rappresentano circa il 60% del peso secco della parete di *S. cerevisiae*. Possono essere chimicamente frazionati in tre categorie.
 1. Un β -1,3 glucano insolubile in acqua, in alcali e in acido acetico. È debolmente ramificato e nei punti di ramificazione si trovano dei legami β -1,6. Il suo grado di polimerizzazione è di 1500. In microscopia elettronica questo glucano appare fibroso. Esso è responsabile della forma e della rigidità della parete. Si trova sempre associato alla chitina.

2. Un β -1,3 glucano, di approssimativamente 1500 unità di glucosio, insolubile in acqua, solubile in alcali. Poco ramificato come il glucano precedente, presenta, oltre i rari punti di ramificazione, un piccolo numero di legami glucosidici β -1,6. Il suo aspetto è amorfo in microscopia elettronica. Ad esso si attribuisce l'elasticità della parete. Serve da ancoraggio alle mannoproteine e può costituire una sostanza di riserva al di fuori del protoplasma.

3. Un β -1,6 glucano liberato dal glucano insolubile in alcali per estrazione con acido acetico; il prodotto così purificato è amorfo, solubile in acqua. È altamente ramificato, con legami glucosidici β -1,3; il suo grado di polimerizzazione è di 140. Serve da unione tra i diversi costituenti della parete. È anche un sito recettore del fattore killer (1.7).

Presumibilmente il β -1,3 glucano fibroso, insolubile in alcali, risulta da un'incorporazione di chitina nel β -1,3 glucano amorfo.

- **Le mannoproteine** costituiscono dal 25 al 50% della parete di *S. cerevisiae*. Possono essere estratte da cellule intere o da pareti isolate con metodi chimici o enzimatici. I metodi chimici utilizzano il trattamento in autoclave con alcali o con tampone citrato a pH 7. I metodi enzimatici liberano le mannoproteine per digestione dei glucani. Sono meno denaturanti per la struttura delle mannoproteine rispetto ai metodi chimici. La preparazione enzimatica più correntemente utilizzata per estrarre le mannoproteine parietali di *S. cerevisiae* è la zimoliasi ottenuta da un batterio (*Arthrobacter luteus*). L'efficacia di questo complesso enzimatico si deve essenzialmente alla sua attività β -1,3 glucanasica, ma non si può escludere che qualche attività proteasica contaminante la zimoliasi possa concorrere alla liberazione delle mannoproteine. Abbiamo dimostrato (Dubourdieu e Moine, 1995) che anche un'altra preparazione industriale di β -glucanasi (Glucanex), prodotta da un fungo (*Trichoderma harzianum*) ed avente attività endo- ed eso- β -1,3-glucanasica ed endo- β -1,6-glucanasica, permette di estrarre facilmente le mannoproteine dalla parete delle cellule di *S. cerevisiae*.

zare che *in vivo* la catena di glucomannano contenga anche residui di glucosio legati in β -1,3.

Il quarto tipo di glicosilazione delle mannoproteine del lievito è l'ancoraggio glicosil-fosfatidilinositolo (GPI). Questo legame, tra la parte carbossilica terminale della catena peptidica e un fosfolipide della membrana, permette a certe mannoproteine, che attraversano la parete, di essere ancorate alla membrana plasmatica. La regione d'unione contiene la seguente sequenza caratteristica (Fig. 1.2): etanolamina-fosfato-6-mannosio- α -1,2-mannosio- α -1,6-mannosio- α -1,4-glucosammina- α -1,6-inositolo-fosfolipide. La presenza di tale ancora in certe mannoproteine non significa che queste rimangano legate alla membrana. Le mannoproteine possono staccarsi per rottura enzimatica del fosfolipide. Una fosfolipasi C, specifica per il fosfatidilinositolo, quindi capace di realizzare questa rottura, è stata messa in evidenza in *S. cerevisiae* (Flit e Thorner, 1993). Anche diverse mannoproteine ad ancoraggio GPI sono state identificate nella parete di *S. cerevisiae*.

- **La chitina**, un polimero lineare di residui di N-acetil-glucosammina legati in β -1,4, è generalmente poco rappresentata nella parete dei lieviti. In *S. cerevisiae* la chitina costituisce dall'1 al 2% della parete e si trova localizzata per la maggior parte, anche se non esclusivamente, nella zona dell'anello cicatriziale di gemmazione, una sorta di cratere sopraelevato, ben visibile in microscopia elettronica sulla cellula madre (Fig. 1.3). Questa cicatrice di chitina è essenziale per l'integrità della parete e la sopravvivenza delle cellule. Così, i lieviti trattati con polioossina D, antibiotico che inibisce specificamente la sintesi di chitina, non sono vitali: essi scoppiano, infatti, dopo la gemmazione.

La presenza di lipidi nella parete non è stata dimostrata chiaramente. Certamente ne contengono le pareti preparate in laboratorio (dal 2 al 15% in *S. cerevisiae*); può trattarsi però di una contaminazione da parte dei lipidi della membrana citoplasmatica, assorbiti dalle pareti nel corso del loro isolamento. La parete potrebbe anche fissare i lipidi del mezzo esterno, in particolare i differenti acidi grassi attivatori e inibitori della fermentazione (3.6.2).

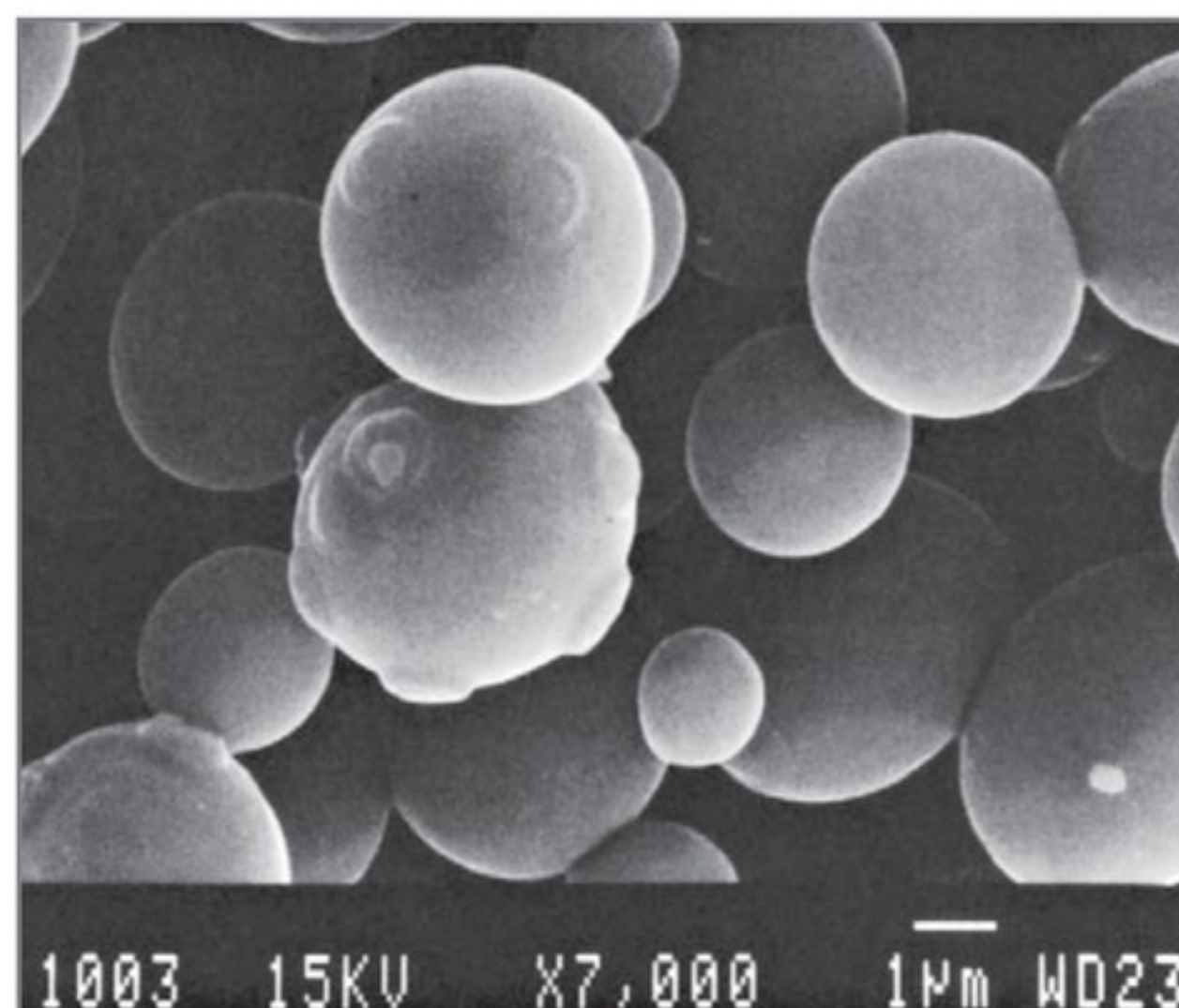


Fig. 1.3 - Fotografia in microscopia elettronica a scansione di cellule proliferanti di *Saccharomyces cerevisiae*. Si distinguono gli anelli cicatriziali di gemmazione sulle cellule madri (Fotografia: M. Mercier, dipartimento di Microscopia Elettronica dell'Università di Bordeaux I).

- **Diversi enzimi** sono associati alla parete o alloggiati nello spazio periplasmatico. Uno tra i meglio caratterizzati in *S. cerevisiae* è l'invertasi o β -fruttofuranosidasi, che catalizza l'idrolisi di saccarosio in glucosio e fruttosio. L'invertasi è una mannoproteina termostabile ancorata su un β -1,6 glucano della parete. La sua massa molecolare è di 270.000 Da ed è costituita approssimativamente dal 50% di mannosio e dal 50% di proteina. Anche la fosfatasi acida periplasmatica è una mannoproteina.

Sono stati segnalati altri enzimi periplasmatici: β -glucosidasi, α -galattosidasi, melibiasi, trealasi, amminopeptidasi, esterasi. La parete dei lieviti contiene anche endo- ed eso- β -glucanasi del tipo 1,3 e 1,6. Questi enzimi sono implicati nei rimaneggiamenti della parete durante la crescita e la gemmazione delle cellule. La loro attività è massima durante la fase di crescita esponenziale delle popolazioni e diminuisce in maniera notevole subito dopo. Ciononostante, le cellule in fase stazionaria e i lieviti morti contenuti nelle fecce possiedono ancora nella loro parete delle attività β -glucanasiche, parecchi mesi dopo la fine della fermentazione. Questi enzimi endogeni intervengono nell'autolisi della parete dei lieviti nel corso della conservazione dei vini sulle fecce, fenomeno sul quale tor-

1. I lieviti

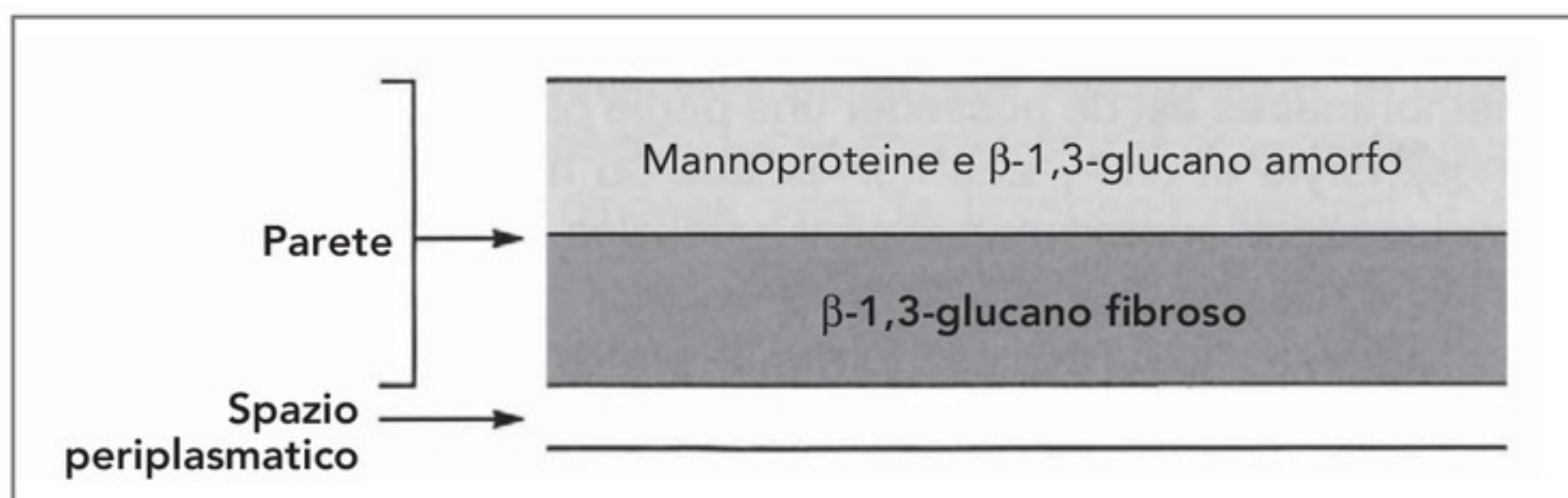


Fig. 1.4 - Rappresentazione schematica dell'organizzazione della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*.

neremo ancora a proposito della vinificazione dei vini bianchi.

1.2.3 L'organizzazione generale della parete ed i fattori che influiscono sulla sua composizione

La parete di *S. cerevisiae* è formata da uno strato esterno di mannoproteine associate ad una matrice di β -1,3 glucano amorfo, che ricopre uno strato interno di β -1,3 glucano fibroso, il quale è associato a piccole quantità di chitina (Fig. 1.4). Il β -1,6 glucano serve presumibilmente da unione tra questi due strati. La rigidità e la forma della parete sono dovute all'armatura interna di β -1,3 glucano fibroso, mentre la sua elasticità si deve allo strato esterno amorfo. La struttura intermolecolare delle mannoproteine dello strato esterno (legami idrofobi, ponti bisolfuro) determina anche la porosità della parete alle micromolecole (di pesi molecolari inferiori a 4.500) e la sua impermeabilità alle macromolecole. Questa impermeabilità può essere influenzata dal trattamento delle pareti con certi agenti chimici, come il β -mercaptoetanolo, che provocando la rottura dei ponti bisolfuro distruggono l'assetto intermolecolare tra le catene di mannoproteine.

La composizione della parete è fortemente influenzata dalle condizioni nutritive e dall'età delle cellule. La proporzione di glucano nella parete aumenta con il tenore in zucchero del mezzo di coltura. Certe carenze, per esempio in mesoinositolo, comportano anche un aumento della proporzione di glucano rispetto alle mannoproteine. Le pareti delle cellule vecchie sono più ricche in glucani e chitina e meno provviste di mannoproteine di quelle delle cellule giovani; per questa ragione sono più resisten-

ti agli agenti fisici ed enzimatici utilizzati per degradarle. Infine, la composizione delle pareti si modifica profondamente con i cambiamenti morfogenetici (coniugazione e sporulazione).

1.3 La membrana plasmatica

1.3.1 La composizione chimica e l'organizzazione della membrana

Barriera altamente selettiva che controlla gli scambi tra la cellula vivente ed il mezzo esterno, la membrana plasmatica è un organulo essenziale per la vita del lievito.

Come tutte le membrane biologiche, la membrana plasmatica dei lieviti è costituita principalmente da lipidi e proteine. La membrana plasmatica di *S. cerevisiae* contiene circa il 40% di lipidi ed il 50% di proteine; glucani e mannani non sono presenti che in piccola quantità (qualche punto percentuale).

I lipidi della membrana sono essenzialmente fosfolipidi e steroli, molecole anfipatiche, che possiedono cioè una parte idrofila ed una parte idrofoba.

I tre principali fosfolipidi delle membrane plasmatiche del lievito (Fig. 1.5) sono la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilcolina (PC) ed il fosfatidilinositolo (PI), che rappresentano dal 70 all'85% del totale; la fosfatidilserina (PS) ed il difosfatidilglicerolo o cardiolipina (PG) sono meno rappresentati. Gli acidi grassi liberi e l'acido fosfatidico si segnalano frequentemente nelle analisi di membrane plasmatiche. Si tratta presumibilmente di artefatti d'estrazione, risultanti dall'attività di certi enzimi di degradazione dei lipidi.

Gli acidi grassi dei fosfolipidi delle membra-

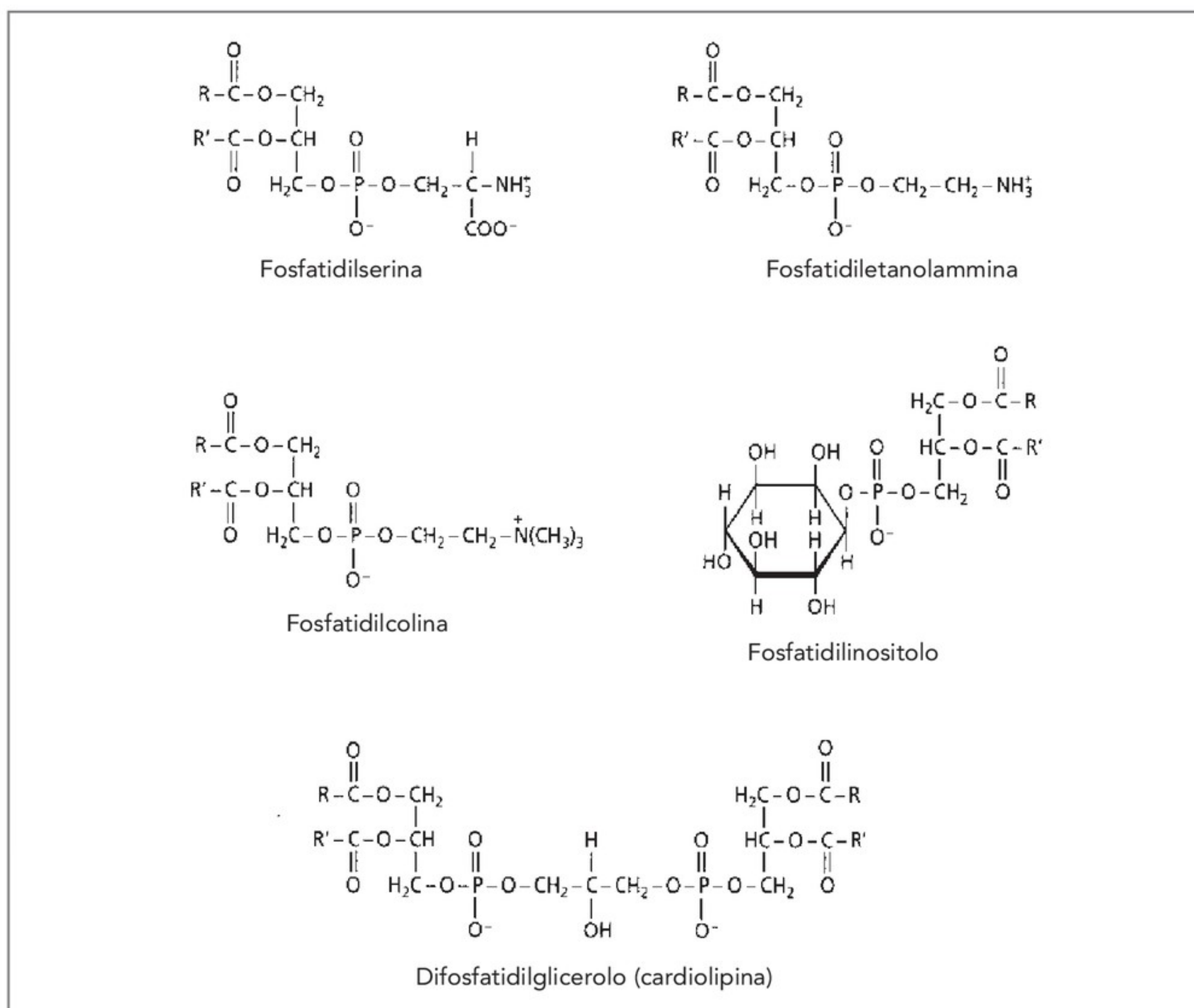


Fig. 1.5 - Fosfolipidi di membrana dei lieviti.

ne contengono un numero pari (da 14 a 24) di atomi di carbonio; gli acidi C16 e C18 sono i più abbondanti. Possono essere saturi, come l'acido palmitico (C16) e l'acido stearico (C18), oppure insaturi, come l'acido oleico (C18, un doppio legame Δ^9), l'acido linoleico (C18, due doppi legami Δ^9, Δ^{12}) e l'acido linolenico (C18, tre doppi legami $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$). Bisogna ricordare che una caratteristica comune a tutti i fosfolipidi di membrana è quella di possedere una parte polare (o idrofila), costituita dall'alcol fosforilato, ed una parte apolare (o idrofoba), formata dalle due catene di acidi grassi approssimativamente parallele l'una all'altra. La loro rappresentazione schematica si può osservare in figura 1.6. A causa del carattere anfipatico, i fosfolipidi formano spontaneamente nei mezzi acquosi dei film bimolecolari o doppi strati lipidici. I doppi

strati lipidici sono delle strutture non covalenti cooperative, cioè mantenute da interazioni che si rinforzano mutuamente: interazioni idrofobe, forze di attrazione di van der Waals tra le code apolari, interazioni idrostatiche e ponti d'idrogeno tra le teste polari e le molecole d'acqua. L'esame in microscopia elettronica di strati fini di membrane plasmatiche di lieviti mostra anche una struttura classica a doppio strato lipidico di circa 7,5 nm di spessore. La superficie della membrana si presenta segnata da profondi ripiegamenti, soprattutto durante la fase stazionaria, ma il significato fisiologico di questa caratteristica anatomica rimane sconosciuto. La membrana plasmatica presenta, inoltre, una depressione sottostante la cicatrice di nascita.

Il principale sterolo della membrana plasmatica del lievito è l'ergosterolo; è possibile trovare

1. I lieviti

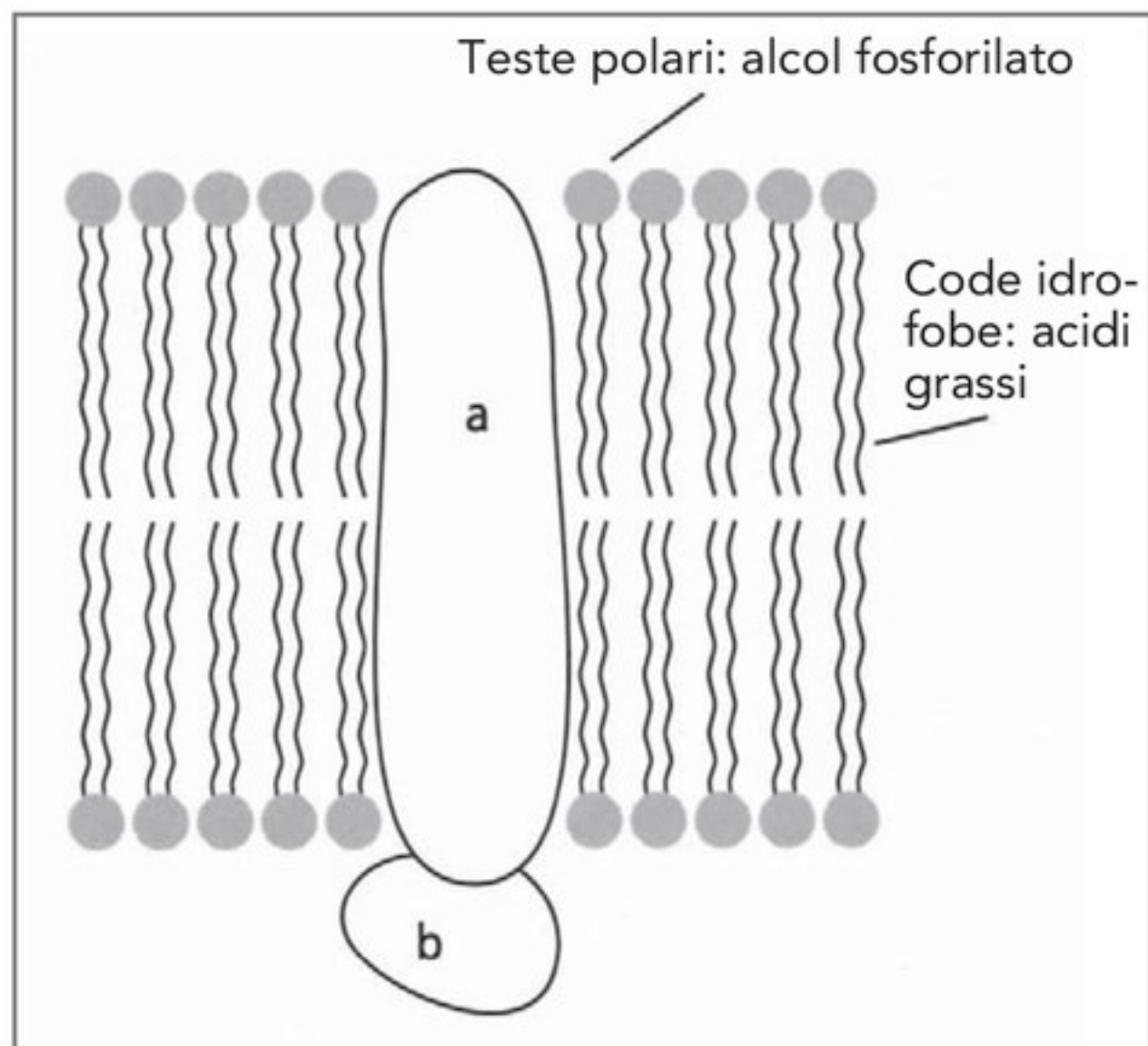


Fig. 1.6 - Rappresentazione schematica del doppio strato lipidico di membrana. Le proteine intrinseche (a) sono strettamente associate alla regione idrofoba del doppio strato. Le proteine estrinseche (b) sono legate alle proteine intrinseche.

anche il (24)-(28)-deidroergosterolo e quantità minori di zimosterolo (Fig. 1.7). Gli steroli sono sintetizzati nei mitocondri esclusivamente in aerobiosi, durante la fase di crescita dei lieviti. Come i fosfolipidi, gli steroli della

membrana sono anfipatici: la parte idrofila è costituita dal gruppo idrossilico in C-3, mentre il resto della molecola è idrofobo, in particolare la coda idrocarbonata flessibile.

La membrana plasmatica contiene anche numerose proteine o glicoproteine, che presentano una vasta gamma di pesi molecolari (da 10.000 a 120.000). Tutto lascia presumere che l'organizzazione della membrana plasmatica dei lieviti somigli al modello a mosaico fluido proposto per le membrane biologiche da Singer e Nicolson (1972), cioè a soluzioni in due dimensioni di proteine e di lipidi orientati. Certe proteine, chiamate intrinseche o integrali, attraversano lo spessore della membrana (Fig. 1.6) ed interagiscono fortemente con la parte apolare del doppio strato lipidico. Le proteine estrinseche o periferiche sono legate alle precedenti da legami idrogeno; la loro localizzazione è asimmetrica, sia sulla superficie esterna che sulla superficie interna della membrana plasmatica. Le molecole di proteine e di lipidi della membrana, costantemente in movimento laterale, sono capaci di diffondere rapidamente nel piano della membrana.

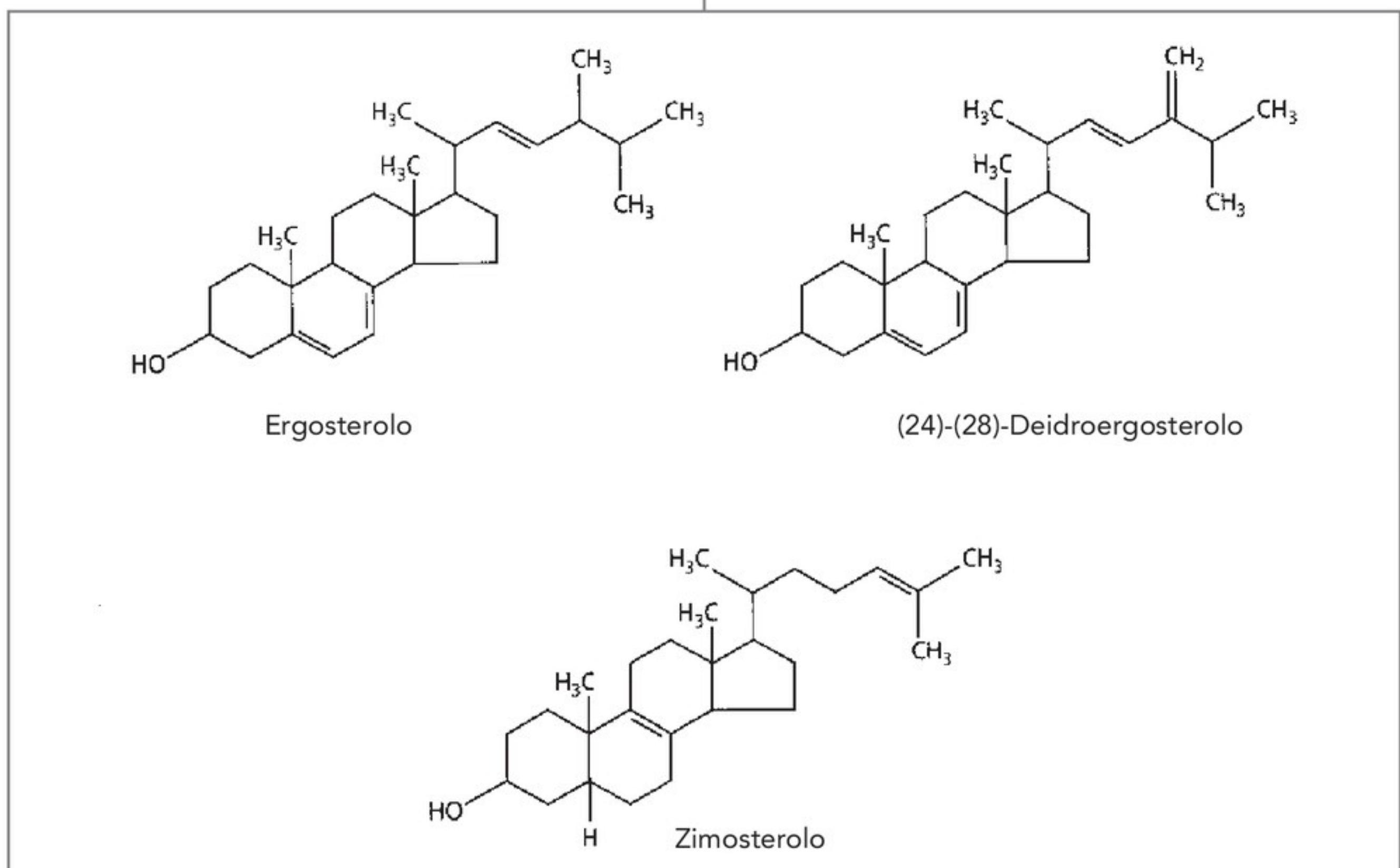


Fig. 1.7 - I principali steroli di membrana dei lieviti.

Alcune proteine della membrana del lievito sono state particolarmente studiate. Si tratta dell'adenosina trifosfatasi (ATPasi), delle proteine di trasporto dei soluti (zuccheri ed amminoacidi) e degli enzimi implicati nella sintesi di glucani e chitina delle pareti.

Il lievito possiede tre ATPasi, una nei mitocondri, una nel vacuolo e la terza nella membrana plasmatica. L'ATPasi della membrana plasmatica è una proteina integrale di peso molecolare prossimo a 100.000 Da. L'idrolisi dell'ATP catalizzata da questo enzima fornisce l'energia necessaria per il trasporto attivo dei soluti attraverso la membrana. Ricordiamo che s'intende per trasporto attivo il movimento di un composto contro il suo gradiente di concentrazione. Simultaneamente, l'idrolisi dell'ATP crea un passaggio di protoni dall'interno verso l'esterno della cellula.

La penetrazione degli amminoacidi e degli zuccheri nel lievito mette in azione dei sistemi di trasporto della membrana chiamati permeasi. In questa maniera, il sistema di permeasi non specifico per gli amminoacidi (GAP), costituito da tre proteine di membrana, assicura il trasporto di numerosi amminoacidi neutri; esso è represso quando il lievito cresce in presenza di una fonte d'azoto facilmente assimilabile, come l'ammonio.

La fluidità delle membrane è regolata dalla loro composizione in acidi grassi e dal loro contenuto in steroli. Le catene idrofobe degli acidi grassi dei fosfolipidi a doppio strato di membrana possono trovarsi allo stato ordinato e rigido oppure allo stato relativamente disordinato e fluido. Allo stato rigido tutti i legami tra atomi di carbonio degli acidi grassi sono *trans*; allo stato fluido certi legami diventano *cis*. La transizione dallo stato rigido allo stato fluido avviene quando la temperatura è più alta di quella di fusione. Questa temperatura di transizione dipende dalla lunghezza delle catene degli acidi grassi e dal loro grado d'insaturazione. Le catene idrofobe rettilinee degli acidi grassi saturi interagiscono fortemente tra loro, tanto di più quanto più sono lunghe. La temperatura di transizione aumenta quindi con la lunghezza delle catene degli acidi grassi. I doppi legami degli acidi grassi insaturi possiedono generalmente una configurazione *cis*, che fa piegare la catena idrofoba (Fig. 1.8). Questo

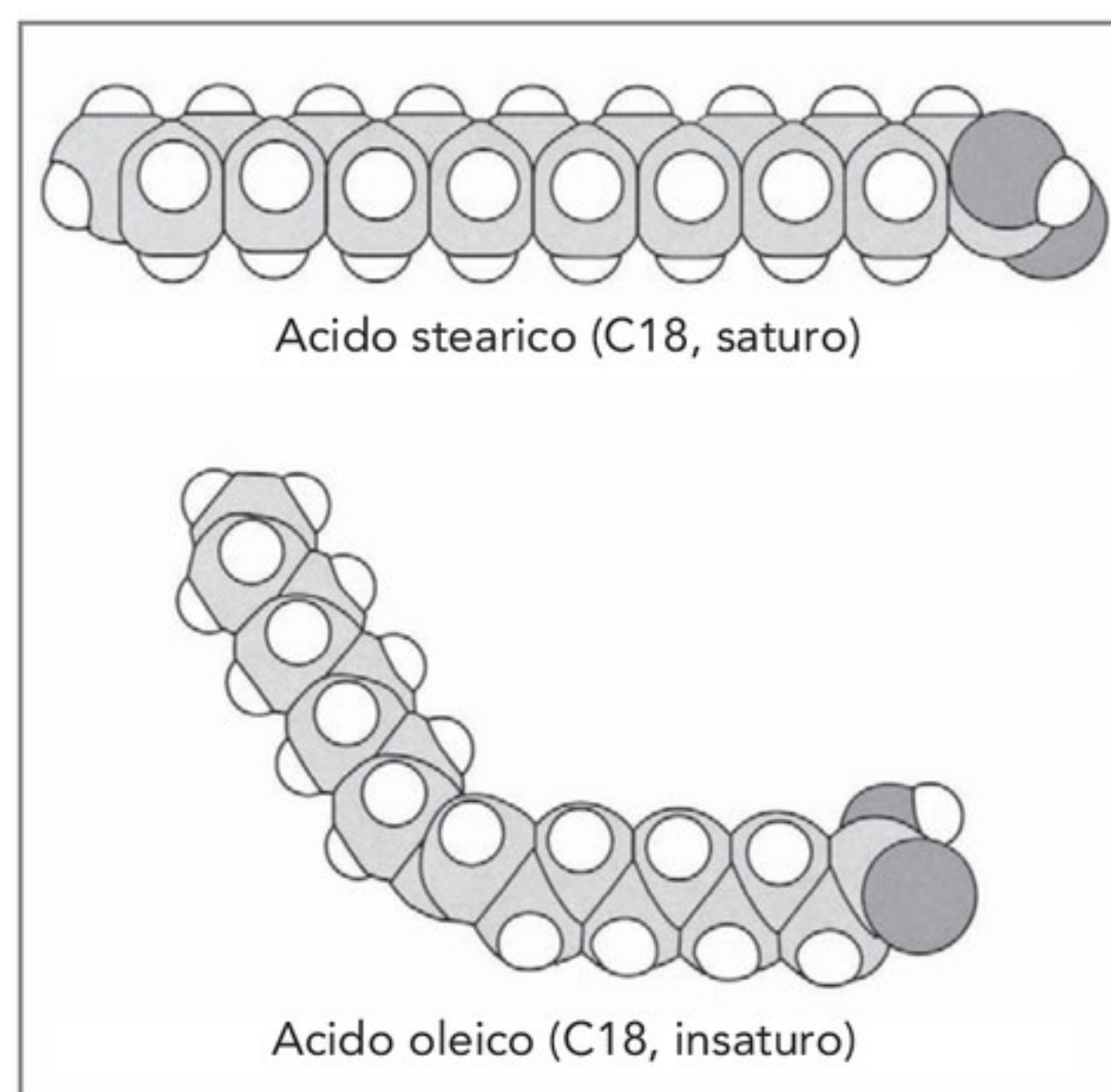


Fig. 1.8 - Modelli molecolari della struttura tridimensionale dell'acido stearico e dell'acido oleico. La configurazione *cis* del doppio legame dell'acido oleico determina la curvatura della catena di atomi di carbonio.

incurvamento rompe l'accatastamento ordinato delle catene di acidi grassi ed abbassa la temperatura di transizione. Come il colesterolo nelle membrane delle cellule dei mammiferi, così l'ergosterolo è un importante regolatore della fluidità della membrana del lievito. L'ergosterolo s'interpone nel doppio strato perpendicolarmente al piano della membrana, in maniera che il suo gruppo idrossilico si unisce attraverso legami idrogeno alla testa polare del fosfolipide e la sua coda apolare s'inserisce nella regione idrofoba del doppio strato. In questa maniera gli steroli della membrana ostacolano, a bassa temperatura, la cristallizzazione delle catene di acidi grassi interponendosi tra loro; al contrario, possono però moderare un eccesso di fluidità della membrana quando la temperatura è elevata, riducendo per ingombro sterico il movimento di queste stesse catene.

1.3.2 Le funzioni della membrana plasmatica

La prima funzione della membrana plasmatica è quella di costituire, grazie a fosfolipidi e steroli, una barriera idrofoba stabile tra il citoplasma e l'ambiente circostante la cellula. Questa barriera presenta una certa imperme-

1. I lieviti

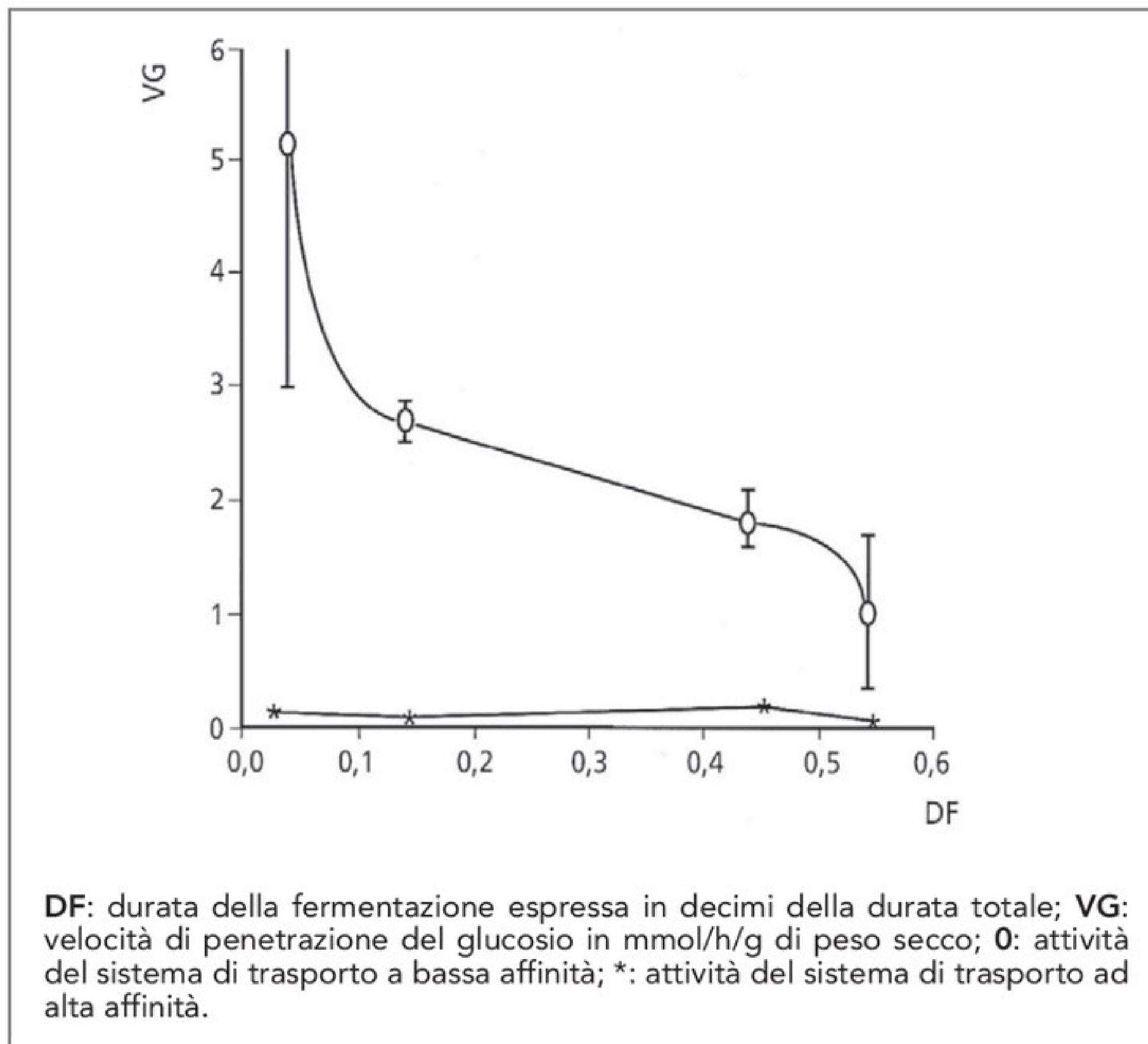


Fig. 1.9 - Evoluzione dell'attività del sistema di trasporto del glucosio in *Saccharomyces cerevisiae*, fermentante un mezzo modello (Salmon *et al.*, 1993).

abilità ai soluti, alla quale sono legate le proprietà osmotiche.

Inoltre, grazie al sistema di permeasi, la membrana plasmatica regola gli scambi tra la cellula ed il mezzo. Il funzionamento di queste proteine di trasporto è fortemente influenzato dalla composizione in lipidi, che agisce sulla fluidità delle membrane. In un mezzo modello definito, l'arricchimento dei fosfolipidi di membrana in acidi grassi insaturi (oleico e linoleico) favorisce la penetrazione e l'accumulo di certi aminoacidi, nonché l'azione della permeasi generale degli aminoacidi (GAP), (Henschke e Rose, 1991). Per contro, gli steroli di membrana sembrano influire meno sul trasporto degli aminoacidi che il grado d'insaturazione dei fosfolipidi. La sintesi degli acidi grassi insaturi, che è un processo di ossidazione, necessita l'aerazione del mezzo di coltura all'inizio della fermentazione alcolica. In semi-anaerobiosi, condizione della vinificazione, è presumibile che il contenuto dell'uva o del mosto in acidi grassi insaturi possa agire favorevolmente sui meccanismi di trasporto degli aminoacidi attraverso la membrana.

I sistemi di trasporto degli zuccheri attraverso la membrana sono lontani dall'essere totalmente chiari, ma è accertato che esistono almeno due tipi di trasportatori, uno con alta affinità per il glucosio, l'altro con un'affinità dieci volte minore (Bisson, 1991). Il trasportatore con bassa affinità è attivo durante la fase di crescita e la sua attività diminuisce in fase stazionaria. Il sistema con alta affinità è invece represso a concentrazioni elevate di glucosio, come nel caso del mosto d'uva (Salmon *et al.*, 1993) (Fig. 1.9). L'attività di trasporto degli zuccheri dipende dall'attività di sintesi proteica delle cellule. Quando quest'attività diminuisce o cessa, si osserva una diminuzione nell'attività di trasporto degli zuccheri (fenomeno denominato inattivazione catabolica) (Busturia *et Lagunas*, 1986, Salmon *et al.*, 1993). In condizioni enologiche, la sintesi proteica comincia a decrescere già durante la fermentazione alcolica, quando finisce la crescita cellulare. Il fenomeno d'inattivazione catabolica dei sistemi di trasporto degli zuccheri si attiva in questo momento, in modo più intenso in carenza di azoto assimilabile (Salmon

1989). Il tenore di steroli nelle membrane, particolarmente di ergosterolo, così come il tasso d'insaturazione dei fosfolipidi di membrana favoriscono l'entrata di glucosio nella cellula, soprattutto durante le fasi stazionaria e di declino; questo fenomeno spiega l'influenza determinante dell'aerazione durante la fase di moltiplicazione dei lieviti sul decorso della fermentazione alcolica (3.7.2).

La presenza di etanolo in un mezzo di coltura rallenta la velocità d'entrata nella cellula dell'arginina e del glucosio e limita il flusso di protoni risultante dall'attività ATPasica della membrana (Alexandre *et al.*, 1993; Charpentier, 1995). Al tempo stesso, la presenza di etanolo favorisce la sintesi dei fosfolipidi di membrana ed il loro tenore di acidi grassi insaturi (in particolare acido oleico).

La temperatura e l'etanolo agiscono in maniera sinergica sull'attività dell'ATPasi di membrana; l'annullamento del flusso di protoni dovuto all'etanolo del mezzo avviene a concentrazioni di etanolo tanto più basse quanto più la temperatura è elevata. Ma non è del tutto certo che questa modificazione dell'attività dell'ATPasi di membrana da parte dell'etanolo sia all'origine della bassa permeabilità della membrana plasmatica in mezzo alcolico. Il ruolo chiave dell'ATPasi di membrana nella resistenza dei lieviti all'etanolo non è stato chiaramente dimostrato. Un'altra funzione della membrana plasmatica è la sintesi del glucano e della chitina della parete, grazie a due enzimi della membrana, la β -1,3-glucano sintetasi e la chitina sintetasi, che catalizzano la polimerizzazione del glucosio e della N-acetil-glucosammina a partire dalle loro forme attivate (uridina difosfato o UDP). Le mannoproteine sono essenzialmente prodotte nel reticolo endoplasmatico (1.4.2) e trasportate poi da vescicole che, fondendosi con la membrana plasmatica, depositano il loro contenuto all'esterno di questa.

Infine, certe proteine di membrana agiscono come recettori cellulari specifici, che permettono al lievito di reagire a diversi stimoli esterni come gli ormoni sessuali o i cambiamenti di concentrazione dei nutrienti esterni. L'attivazione di queste proteine di membrana scatena la liberazione nel citoplasma di composti, come l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP),

che agiscono come messaggeri secondari per scatenare altre reazioni intracellulari. Le conseguenze di questi meccanismi cellulari sullo sviluppo delle fermentazioni alcoliche meriterebbero uno studio approfondito.

1.4 Il citoplasma e i suoi organuli

Il citoplasma è limitato dalla membrana plasmatica e dalla membrana nucleare, contiene la sostanza citoplasmatica di base, o citosol, e gli organuli (reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, vacuoli e mitocondri), che sono isolati dal citosol mediante membrane.

1.4.1 Il citosol

Si tratta di una soluzione tamponata a pH 5-6, contenente enzimi solubili, glicogeno e ribosomi.

Gli enzimi sono quelli della glicolisi e della fermentazione alcolica (2.2.1, 2.2.2), nonché la trealasi, enzima che catalizza l'idrolisi del trealosio. Questo disaccaride di riserva, anch'esso citoplasmatico, garantisce la vitalità dei lieviti durante le fasi di disidratazione e di reidratazione, mantenendo l'integrità delle membrane. La fase di latenza, che precede la crescita in mezzo zuccherino, è caratterizzata da una rapida degradazione del trealosio, legata ad un aumento dell'attività trealasi, la quale è correlata ad un aumento della concentrazione di cAMP nel citoplasma. Questo composto è prodotto da un enzima di membrana, l'adenilico ciclasi, in risposta alla stimolazione di un recettore di membrana da parte di un fattore ambientale. Il glicogeno è la principale sostanza di riserva glucidica del lievito. Di struttura simile a quella del glicogeno animale, si accumula durante la fase stazionaria sotto forma di granuli sferici di circa 40 nm di diametro.

Osservato al microscopio elettronico, il citoplasma del lievito appare ricco di ribosomi, piccole granulazioni formate da acidi ribonucleici e da proteine, che costituiscono i siti della sintesi proteica. Associati in polisomi, diversi ribosomi migrano lungo l'RNA messaggero traducendolo simultaneamente, per

1. I lieviti

produrre ciascuno una catena polipeptidica completa.

1.4.2 Il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi ed i vacuoli

Il reticolo endoplasmatico (RE) è un sistema di doppia membrana che suddivide il citoplasma; è collegato alla membrana citoplasmatica e alla membrana nucleare, di cui rappresenta una sorta di estensione. Sebbene meno sviluppato nel lievito che nelle cellule esocrine degli Eucarioti superiori, il RE ha la stessa funzione: garantisce l'indirizzarsi delle proteine sintetizzate dai ribosomi ad esso associati. Infatti, i ribosomi si possono trovare sia liberi nel citosol che legati al RE. Mentre le proteine sintetizzate dai ribosomi liberi rimangono nel citosol, come gli enzimi della glicolisi, quelle prodotte nei ribosomi associati al RE hanno tre destinazioni possibili: il vacuolo, la membrana plasmatica, il mezzo esterno (secrezione). È la presenza di una sequenza d'avvio (una successione particolare di amminoacidi) all'estremità N-terminale della proteina nascente che determina l'associazione al reticolo endoplasmatico dei ribosomi inizialmente liberi nel citosol; la proteina sintetizzata attraversa allora la membrana del RE per un fenomeno di trasporto attivo, chiamato traslocazione, che necessita l'idrolisi dell'ATP. Arrivate nello spazio interno del RE, le proteine subiscono alcune modifiche tra cui l'obbligatoria rottura del peptide segnale ad opera di una peptidasi e, in molti casi, una glicosilazione. Le glicoproteine del lievito, in particolare le mannoproteine parietali strutturali o enzimatiche, contengono delle catene laterali glucidiche (1.2.2), alcune delle quali sono legate all'asparagina con legami N-glicosidici. Questo legame oligosaccaridico si forma all'interno del RE per addizione in sequenza di zuccheri attivati (in forma di derivati UDP) a un trasportatore lipidico idrofobo, il dolicol fosfato; l'insieme è trasferito in blocco ad un residuo di asparagina della catena polipeptidica, rigenerando il dolicol fosfato.

L'apparato di Golgi, sorta di impilamento di sacchetti delimitati da membrana (cisterne) e di vescicole associate, è un prolungamento del RE. Le proteine provenienti da quest'ultimo

sono trasportate dalle vescicole di trasferimento alle cisterne dell'apparato di Golgi, il quale ha un doppio ruolo: realizzare la glicosilazione delle proteine e smistarle poi, per mezzo di vescicole specializzate, sia verso il vacuolo sia verso la membrana plasmatica. La destinazione delle proteine verso il vacuolo è determinata da una sequenza peptidica N-terminale (propeptide) messa in evidenza nei precursori di due enzimi: la carbossipeptidasi Y e la proteinasi A. Al contrario, le vescicole che trasportano le proteine della membrana plasmatica o i granuli di secrezione, così come quelle che trasportano l'invertasi periplasmatica, hanno destinazioni predefinite.

Il vacuolo è un organulo sferico, di 0,3-3 μm di diametro, circondato da una membrana semplice. A seconda della fase del ciclo cellulare, il lievito possiede uno o più vacuoli. Prima della gemmazione, un grande vacuolo si fraziona in piccole vescicole; alcune penetrano nella gemma mentre le altre si raggruppano all'estremità opposta della cellula e si fondono per formare uno o due vacuoli di grosse dimensioni. La membrana vacuolare, o tonoplasto, possiede la medesima struttura generale a «mosaico fluido» della membrana plasmatica, ma è più elastica e ha una composizione chimica un po' diversa: è meno ricca in steroli, contiene meno proteine e glicoproteine e più fosfolipidi, che hanno, inoltre, un tasso d'insaturazione maggiore. Il vacuolo è un luogo di immagazzinamento di certe idrolasi della cellula, in particolare la carbossipeptidasi Y, le proteasi A e B, l'ammino-peptidasi I, la X-prolildipeptidilammino-peptidasi e la fosfatasi alcalina. A questo riguardo, il vacuolo del lievito può essere comparato con il lisosoma delle cellule animali. Le proteasi vacuolari giocano un ruolo essenziale nel rinnovamento (*turn-over*) delle proteine cellulari. In più la proteasi A è indispensabile nella maturazione delle altre idrolasi vacuolari: assicura la conversione dei precursori (proenzimi) in enzimi attivi, per scissione di una piccola sequenza peptidica. Le proteasi vacuolari sono anche responsabili, dopo la morte della cellula, dei fenomeni di autolisi dei quali si parlerà a proposito della conservazione dei vini bianchi sulle fecce. La seconda importante

funzione dei vacuoli è l'immagazzinamento di metaboliti in attesa di essere utilizzati; essi contengono, infatti, un quarto del «pool» amminoacidico della cellula, tra cui molta arginina ed S-adenosilmetionina. Contengono inoltre potassio, adenina, isoguanina, acido urico e cristalli di polifosfati che intervengono nella cattura degli amminoacidi basici. Il trasporto di questi metaboliti attraverso la membrana vacuolare è assicurato da permeasi specifiche. L'energia necessaria al movimento dei composti immagazzinati contro il gradiente di concentrazione viene fornita per mediazione di un'ATPasi associata al tonoplasto, diversa da quella della membrana plasmatica, ma che produce, come quest'ultima, un flusso di protoni.

Il RE, l'apparato di Golgi ed i vacuoli devono essere considerati come differenti componenti di un sistema interno di membrane, chiamato vacuoma, che partecipa al flusso delle glicoproteine destinate ad essere escrete o immagazzinate.

1.4.3 I mitocondri

Distribuiti alla periferia del citoplasma, i mitocondri (mt) sono altri organuli di forma sferica o a bastoncino avvolti da due membrane, la più interna delle quali forma delle creste caratteristiche. La loro organizzazione generale è la stessa dei mitocondri delle piante superiori e delle cellule animali. Le membrane delimitano due compartimenti: lo spazio intermembrana e la matrice. I mitocondri sono i veri organuli respiratori del lievito. In aerobiosi la cellula di *S. cerevisiae* ne contiene una cinquantina. In anaerobiosi questi organuli degenerano, la loro superficie interna diminuisce, le creste spariscono. L'addizione nel mezzo di coltura di ergosterolo e acidi grassi insaturi limita la degenerazione dei mitocondri in anaerobiosi. Ad ogni modo, se le cellule formate in anaerobiosi vengono messe in condizioni di aerobiosi, i mitocondri ritrovano il loro aspetto normale. Nel mosto d'uva, anche se arieggiato, il contenuto in zuccheri del mezzo provoca la repressione della sintesi degli enzimi respiratori e comporta la perdita della corrispondente funzione dei mitocondri. Questo fenomeno è chiamato repressione catabolica del glucosio (2.3.1).

Le membrane mitocondriali sono ricche di fosfolipidi, principalmente fosfatidilcolina, fosfatidilinositolo e fosfatidiletanolamina (Fig. 1.5). La cardiolipina (difosfatidilglicerolo), poco abbondante nella membrana plasmatica, è predominante nella membrana mitocondriale interna. Gli acidi grassi dei fosfolipidi mitocondriali appartengono al tipo C16: 0, C16: 1, C18: 0, C18: 1. In aerobiosi predominano i residui insaturi. Quando le cellule vengono coltivate in anaerobiosi, senza supplemento lipidico, i residui saturi a corta catena diventano predominanti; la cardiolipina e la fosfatidiletanolamina regrediscono, mentre la percentuale di fosfatidilinositolo aumenta. In aerobiosi la temperatura di crescita influisce sul tasso di insaturazione dei fosfolipidi, che è tanto più alto quanto più bassa è la temperatura.

Le membrane mitocondriali contengono anche steroli, nonché numerose proteine ed enzimi (Guerin, 1991).

Le due membrane, interna ed esterna, contengono gli enzimi implicati nella sintesi dei fosfolipidi e degli steroli. Questa attitudine caratteristica dei mitocondri del lievito a sintetizzare importanti quantità di lipidi non viene limitata né da mutazioni di deficienza respiratoria, né dalla repressione catabolica del glucosio.

La membrana esterna è permeabile alla maggior parte dei piccoli metaboliti provenienti dal citosol, poiché contiene la porina, una proteina transmembrana di 29 kDa, che forma una sorta di canale; la porina è presente nei mitocondri di tutti gli Eucarioti, nonché nella membrana esterna dei batteri.

Lo spazio tra le due membrane contiene l'adenilatochinasi, che assicura l'interconversione di ATP, ADP e AMP.

La fosforilazione ossidativa ha luogo nella membrana mitocondriale interna, mentre la matrice è il luogo in cui avvengono le reazioni del ciclo degli acidi tricarbossilici e l'ossidazione degli acidi grassi.

La maggior parte delle proteine dei mitocondri è codificata da geni del nucleo e sintetizzata dai polisomi liberi del citoplasma. Ma anche i mitocondri possiedono il proprio apparato per la sintesi proteica. Infatti, ciascu-

1. I lieviti

no di loro possiede una molecola circolare di DNA a doppia elica di 75 kb e dei ribosomi. Il DNAm_t è estremamente ricco di basi A (adenina) e T (timina); esso contiene alcune decine di geni codificanti, in particolare, per la sintesi di certi pigmenti ed enzimi respiratori, come il citocromo b, e diverse sub-unità della citocromo ossidasi e del complesso ATP sintetasi. Mutazioni che riguardano questi geni possono comportare la resistenza del lievito a certi inibitori mitocondriali specifici, come l'oligomicina; tale proprietà viene sfruttata per marcare geneticamente i ceppi di lieviti di vinificazione. Alcuni mutanti mitocondriali, con deficienze respiratorie, formano colonie di piccole dimensioni su mezzo solido agarizzato; questi mutanti, chiamati «piccoli», non vengono utilizzati in vinificazione, non fosse altro che per l'impossibilità di produrli a livello industriale per via respiratoria.

1.5 Il nucleo

Di forma sferica, da 1 a 2 μm di diametro, il nucleo dei lieviti è appena visibile in microscopia ottica a contrasto di fase. È situato in prossimità del vacuolo principale nelle cellule non proliferanti. L'involucro nucleare, formato da una doppia membrana collegata al RE, è dotato di numerosi pori effimeri a ubicazione mutevole, che permettono scambi di piccole proteine tra il nucleo ed il citoplasma. Contrariamente a quanto avviene negli Eucarioti superiori, l'involucro nucleare dei lieviti non si disperde durante la mitosi. Per colorazione specifica, si può evidenziare nel nucleo una parte basofila a forma di mezzaluna, il nucleolo, dove si svolge, come in tutti gli Eucarioti, la sintesi degli RNA ribosomali. Il nucleo del lievito, schematizzato (Williamson, 1991) in figura 1.10, presenta inoltre, durante la divisione cellulare, un fuso mitotico rudimentale (*spindle*) composto da microtubuli di tubulina, alcuni discontinui ed altri continui; questi ultimi sono tesi tra i due poli del fuso (*spindle pole bodies*, SPB), costituiti da corpuscoli inclusi permanentemente nella membrana nucleare e che corrispondono ai centrioli degli organismi superiori. Dai poli del fuso partono anche

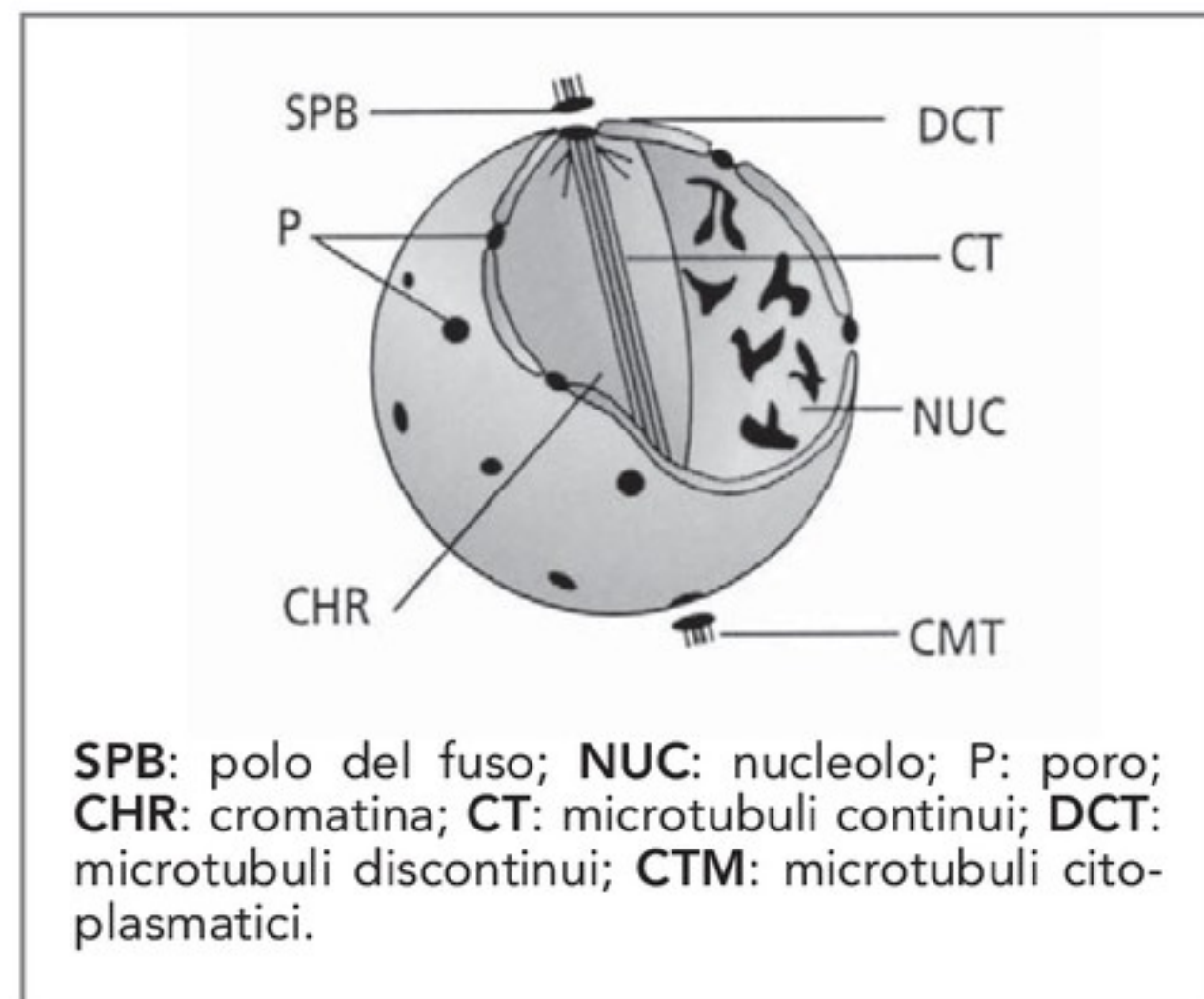


Fig. 1.10 - Rappresentazione schematica del nucleo del lievito (Williamson, 1991).

dei microtubuli citoplasmatici in direzione del citoplasma.

La quantità di DNA nucleare del lievito, circa 14.000 kb in un ceppo aploide, è piccola se si paragona a quella degli Eucarioti superiori. Questa quantità rappresenta appena 3 volte il genoma di *Escherichia coli*, ma il materiale genetico è organizzato in veri cromosomi, ciascuno dei quali contiene una sola molecola di DNA lineare a doppia elica, associato a proteine basiche, gli istoni, per formare la cromatina, nella quale si trovano delle unità di ripetizione, i nucleosomi. A causa delle piccole dimensioni e della scarsa condensazione, i cromosomi del lievito non possono essere osservati in microscopia.

L'elettroforesi a campo pulsante (Carle e Olson, 1984; Schwartz e Cantor, 1984) permette di separare in *S. cerevisiae* 16 cromosomi di dimensioni comprese tra 200 e 2.000 kb. Questa specie è caratterizzata da un gran polimorfismo cromosomico; l'analisi dei cariotipi è quindi uno dei principali criteri d'identificazione dei ceppi di *S. cerevisiae* (1.9.3). Nel 1996 è stata determinata la sequenza completa del DNA cromosomico di *S. cerevisiae* (S288C). Questa comprende 6275 geni, il 23% dei quali è in comune con il genoma umano (Goffeau *et al.*, 1996). Il genoma del ceppo diploide di lievito del vino, EC 1118, è stato completamente sequenziato nel 2009, evidenziando meccanismi di trasferimento di geni tra *Saccharomyces*

e non-*Saccharomyces*. Questi lavori mostrano che il genoma del lievito enologico può essere costantemente rimodellato a causa dell'apporto di geni esogeni (Novo *et al.*, 2009). Questa conoscenza dettagliata del genoma del lievito costituirà un potente strumento, sia per la comprensione a livello molecolare della fisiologia sia per la selezione ed il miglioramento dei ceppi di vinificazione.

I cromosomi del lievito contengono relativamente poche sequenze ripetute e la maggior parte dei geni non è presente che in una sola copia in un genoma aploide. I geni degli RNA ribosomali sono tuttavia altamente ripetitivi (un centinaio di copie).

Il genoma di *S. cerevisiae* contiene anche degli elementi trasponibili o trasposoni, come gli elementi Ty. Questi ultimi sono costituiti da una regione centrale ϵ di 5,6 kb circondata da una sequenza ripetuta chiamata sequenza δ (0,25 kb). Le sequenze δ sono suscettibili di ricombinarsi tra di loro, con la conseguente perdita della regione centrale e di una sequenza δ . Le sequenze δ sono presenti in circa 100 copie nel genoma del lievito. Gli elementi Ty codificano per particelle di un retrovirus non infettivo, che contiene l'RNA messaggero dei Ty nonché una trascrittasi inversa capace di copiare l'RNA in DNA complementare. Quest'ultimo può reinserirsi in un sito qualunque del cromosoma. L'escissione e l'inserzione aleatoria degli elementi Ty nel genoma del lievito possono così modificare i geni e giocare quindi un ruolo importante nell'evoluzione dei ceppi.

Un solo plasmide, chiamato plasmide 2 μ m, è stato identificato nel nucleo del lievito. Si tratta di una molecola circolare di DNA contenente 6 kb, presente in quantità di 50-100 copie per cellula, di cui non è nota la funzione biologica. In compenso è uno strumento molto utile ai biologi molecolari che l'utilizzano per costruire dei plasmidi artificiali e trasformare geneticamente i ceppi di lievito.

1.6 La riproduzione ed il ciclo biologico dei lieviti

S. cerevisiae, come gli altri lieviti sporigeni appartenenti alla classe degli Ascomiceti, è

1.6 La riproduzione ed il ciclo biologico dei lieviti

capace di moltiplicarsi, sia asessualmente per via vegetativa, sia sessualmente formando delle ascospore. Per definizione, i lieviti appartenenti alla classe dei Funghi Imperfetti non si riproducono che per via vegetativa.

1.6.1 La moltiplicazione vegetativa

La maggior parte dei lieviti si moltiplica in maniera vegetativa per gemmazione. Alcuni, come le specie appartenenti al genere *Schizosaccharomyces*, si moltiplicano per divisione binaria o scissione.

La figura 1.11 (Tuite e Oliver, 1991) fornisce la rappresentazione schematica del ciclo vitale di una cellula di *Saccharomyces cerevisiae* diviso nelle quattro fasi classiche: M, G1, S, G2. M corrisponde alla mitosi, G1 al periodo precedente la sintesi del DNA (S) e G2 al periodo prima della mitosi. Fin dall'insorgere della gemma, all'inizio della fase S, si può osservare, in microscopia elettronica, lo sdoppiamento del polo del fuso (SPB) nella membrana nucleare, nel momento in cui alcuni microtubuli citoplasmatici si dirigono verso la gemma nascente. Questi microtubuli guidano verosimilmente le numerose vescicole che appaiono nella zona di gemmazione e che sono implicate nel rimaneggiamento della parete. Mentre la

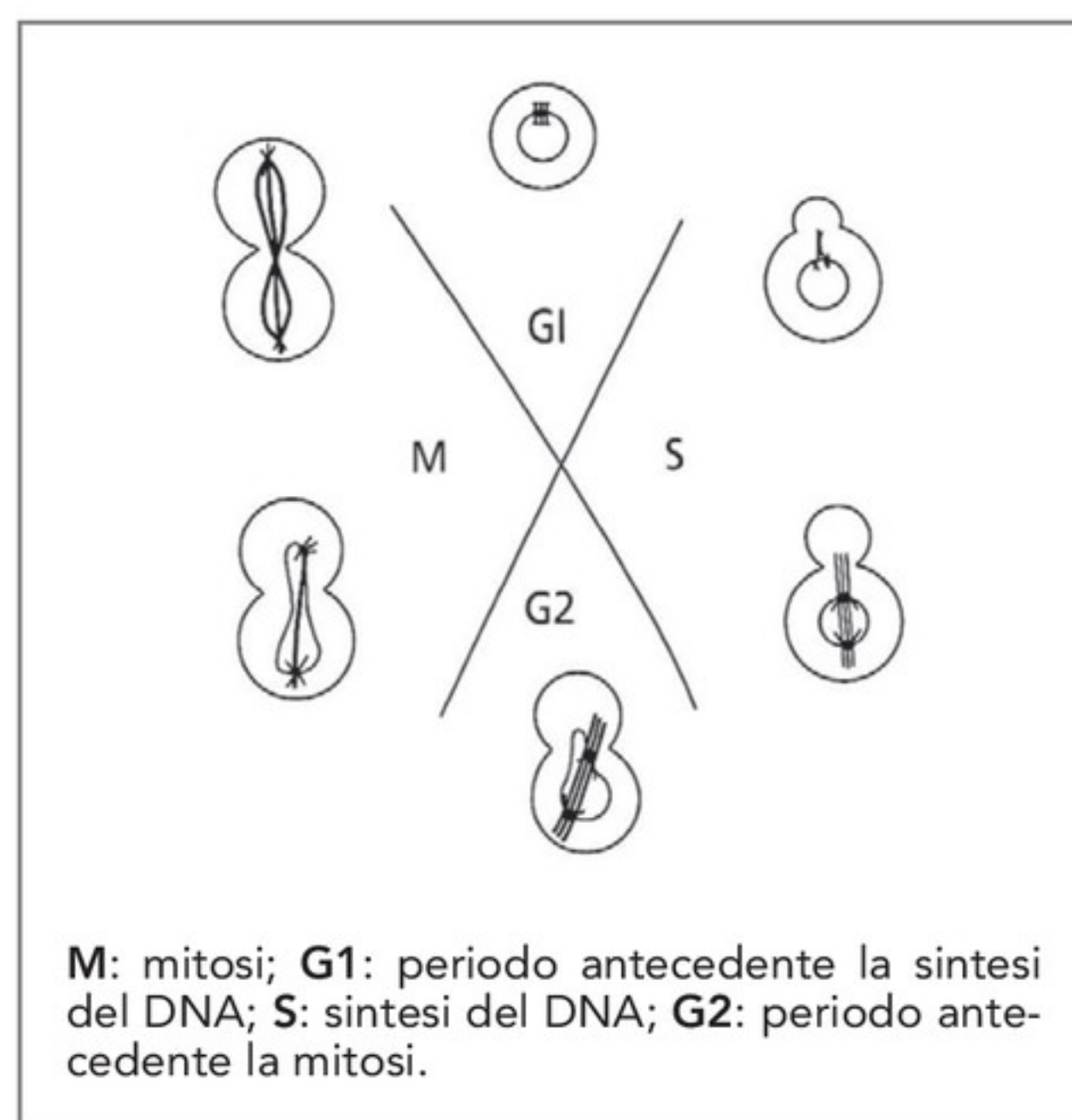


Fig. 1.11 - Ciclo cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* (moltiplicazione vegetativa) (Tuite e Oliver, 1991).

1. I lieviti

gemma cresce, appaiono i microtubuli nucleari discontinui; i più lunghi finiscono per formare il fuso mitotico tra i due SPB. Al termine della fase G2, il nucleo comincia ad estendersi per penetrare nella gemma. Anche una parte dei mitocondri passa nella gemma con alcuni piccoli vacuoli, mentre all'altro polo della cellula si forma un grosso vacuolo, la cui espansione sembra spingere il nucleo nella gemma. La mitosi propriamente detta è contraddistinta dall'allungamento massimo del nucleo e dalla separazione della cellula madre dalla cellula figlia, dopo la costruzione della parete di separazione e il deposito di un anello di chitina sulla cicatrice di gemmazione della cellula madre. Il movimento dei cromosomi nel corso della mitosi è difficile da osservare nel lievito, ma una connessione microtubulo-centromero deve certamente guidare i cromosomi. Nel mosto d'uva, la gemmazione dura da una a due ore, di modo che nella fase di crescita attiva dei lieviti durante la fermentazione, il numero di cellule raddoppia in due ore.

1.6.2 La riproduzione sessuale

Quando le cellule diploidi di lieviti sporigeni si trovano in un mezzo nutritivo ostile, per esempio sprovvisto di zucchero fermentescibile, povero in azoto e molto aerato, smettono di moltiplicarsi ed alcune di esse si trasformano in aschi, una sorta di sacchi con parete spessa contenente ciascuno quattro ascospore aploidi prodotte dalla divisione meiotica del nucleo. Il succo d'uva ed il vino non sono adatti alla sporulazione dei lieviti, che di norma non vi è mai stata osservata. Tuttavia Mortimer *et al.* (1994) hanno potuto constatare la sporulazione di certi ceppi di lieviti del vino anche su mezzi ricchi di zuccheri. Anche noi abbiamo spesso osservato degli aschi in colture «vecchie» su terreni di agar conservati per diverse settimane in frigorifero o a temperatura ambiente (Fig. 1.12). Si ignorano tuttavia le condizioni naturali nelle quali i lieviti selvaggi di vinificazione si riproducono mediante spore e la frequenza di questo fenomeno. In laboratorio i mezzi agarizzati o liquidi, tradizionalmente utilizzati per indurre la sporulazione, sono a base di acetato di sodio (1%). In

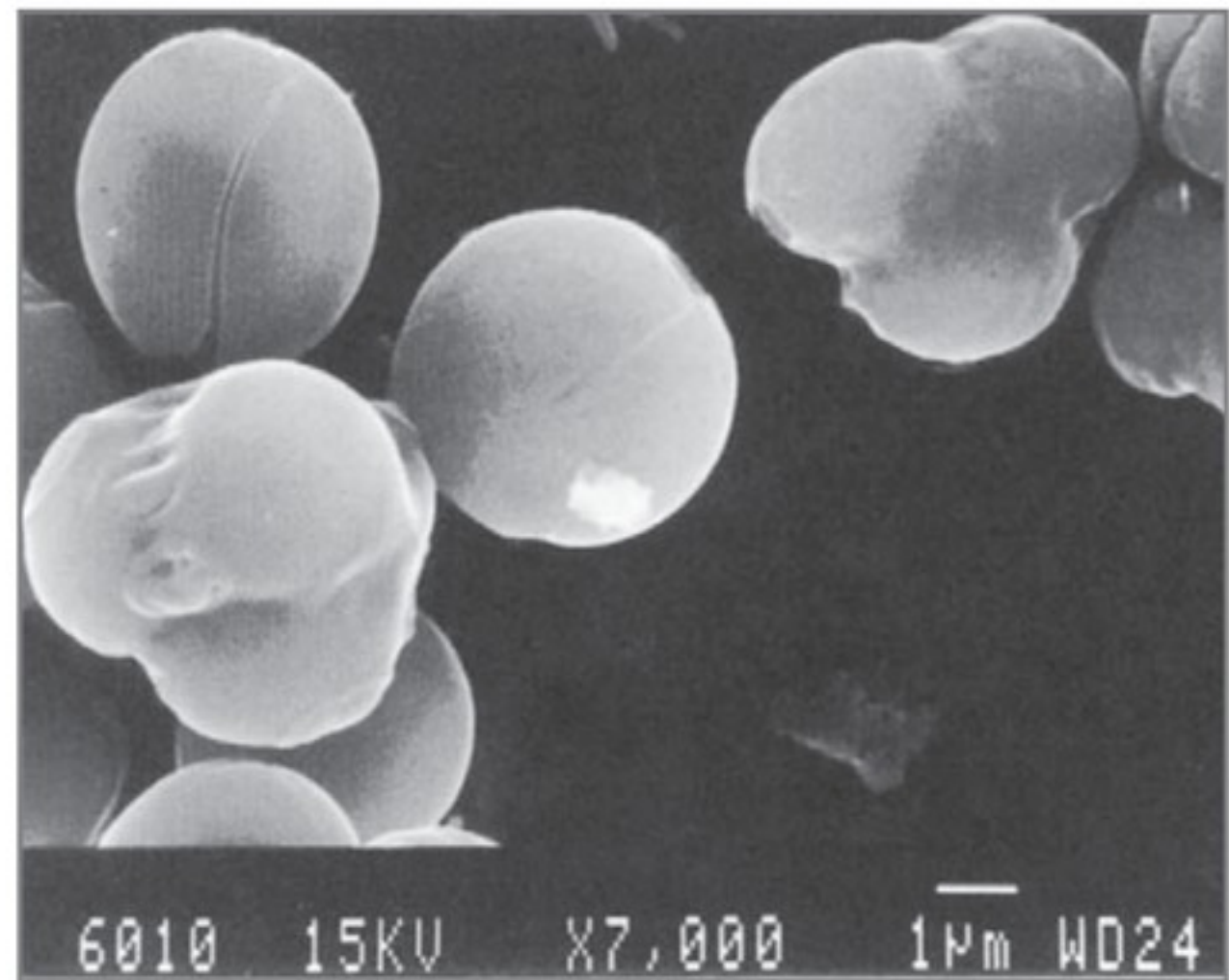


Fig. 1.12 - Fotografia di microscopia elettronica a scansione di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* mantenute per diverse settimane su terreno agarizzato in presenza di zucchero. Si osservano degli aschi contenenti ascospore (Fotografia: M. Mercier, dipartimento di Microscopia Elettronica dell'Università di Bordeaux I).

S. cerevisiae, la capacità di sporulazione varia molto a seconda del ceppo e non raramente si trovano lieviti di vinificazione, sia selvaggi che selezionati, in cui è difficile provocare la sporulazione o le cui spore non sono vitali.

Lo svolgimento della meiosi nel lievito e negli Eucarioti superiori (Fig. 1.13) presenta alcune similitudini. Alcune ore dopo il trasferimento di cellule vegetative diploidi nel mezzo di sporulazione, si osserva, durante la fase S di replicazione del DNA, uno sdoppiamento del SPB. Contemporaneamente appare nel nucleo, vicino al nucleolo, un corpo denso (DB) che evolve in complessi sinaptonemici, strutture che permettono l'appaiamento dei cromosomi omologhi e la loro ricombinazione. Dopo 8 o 9 ore nel mezzo di sporulazione, i due SPB si separano e si forma il fuso; questo stadio corrisponde alla metafase I della meiosi, ma i cromosomi non sono visibili. Poi, mentre la membrana nucleare rimane intatta, gli SPB si sdoppiano. Nella metafase II, un secondo fuso mitotico si tende e si formano le pareti delle ascospore. Lo stiramento dei fusi e lo sviluppo della parete delle ascospore avvengono simultaneamente; gemme nucleari, citoplasma ed organuli migrano nelle ascospore, le cui pareti stanno finendo di formarsi; infine, quando la divisione è completata, i fusi spariscono.

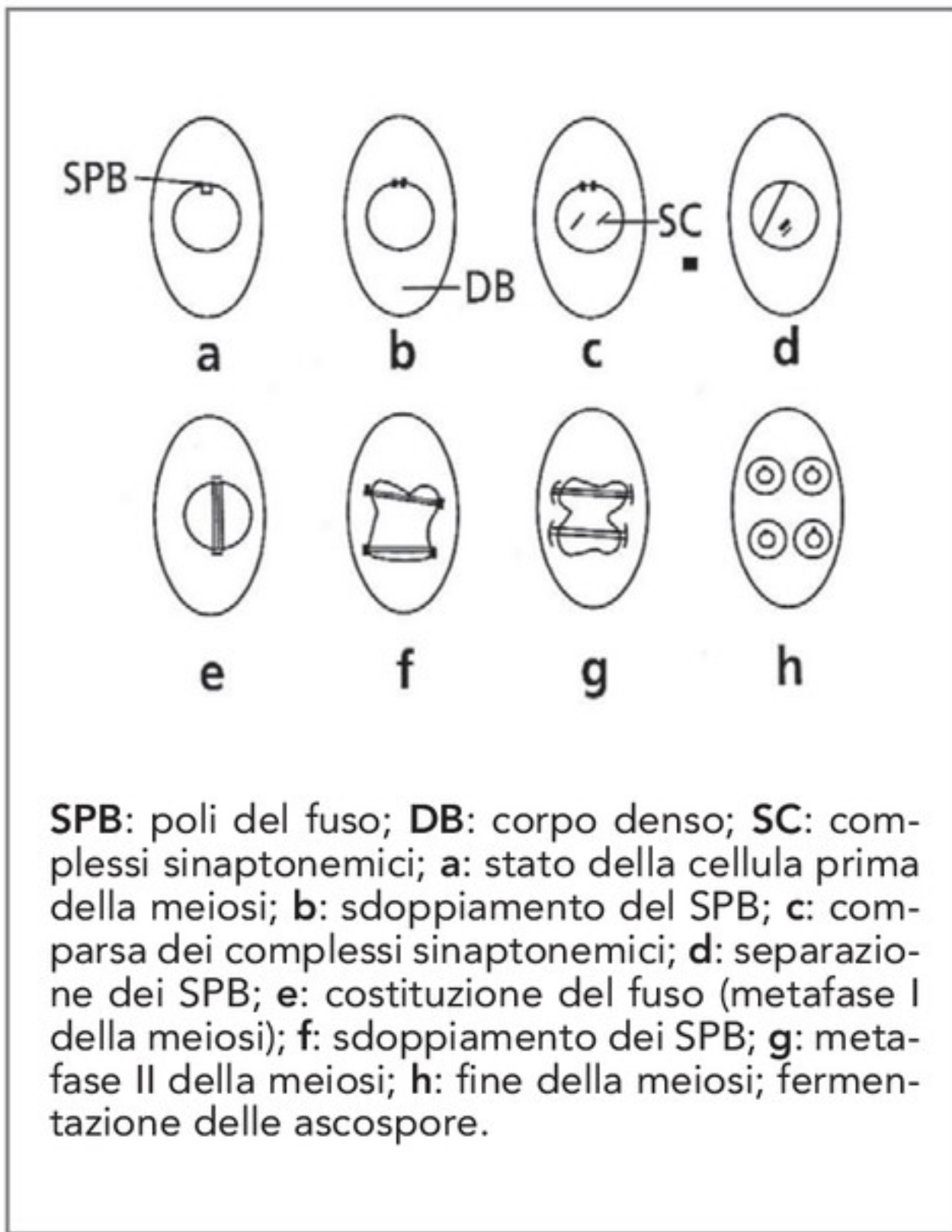


Fig. 1.13 - Svolgimento della meiosi in *Saccharomyces cerevisiae* (Tuite e Oliver, 1991).

Messe in condizioni favorevoli, cioè in mezzi nutritivi zuccherini, le ascospore germinano, rompono la parete dell'asco e cominciano a moltiplicarsi. In *S. cerevisiae* le cellule aploidi presentano due tipi sessuali (*mating types*): *a* e α . L'asco contiene così due ascospore *a* e due ascospore α (Fig. 1.14). Le cellule di tipo *a* (MAT *a*) producono il feromone sessuale *a*, peptide di 12 amminoacidi, chiamato fattore sessuale *a*. Allo stesso modo, quelle di tipo α producono il fattore sessuale α , peptide di 13 amminoacidi. Il fattore *a*, emesso dalle cellule MAT *a*, blocca nella fase G1 la moltiplicazione delle cellule MAT α ; reciprocamente, il fattore α prodotto dalle cellule α arresta il ciclo biologico delle cellule *a*. L'appaiamento sessuale ha luogo tra due cellule di tipo sessuale opposto, la cui agglutinazione permette la fusione cellulare e nucleare, e mette in azione delle glicoproteine parietali, le agglutinine *a* e α . La cellula diploide vegetativa formata (*a*/ α) non può più produrre feromoni sessuali ed è insensibile alla loro azione; si moltiplica per gemmazione.

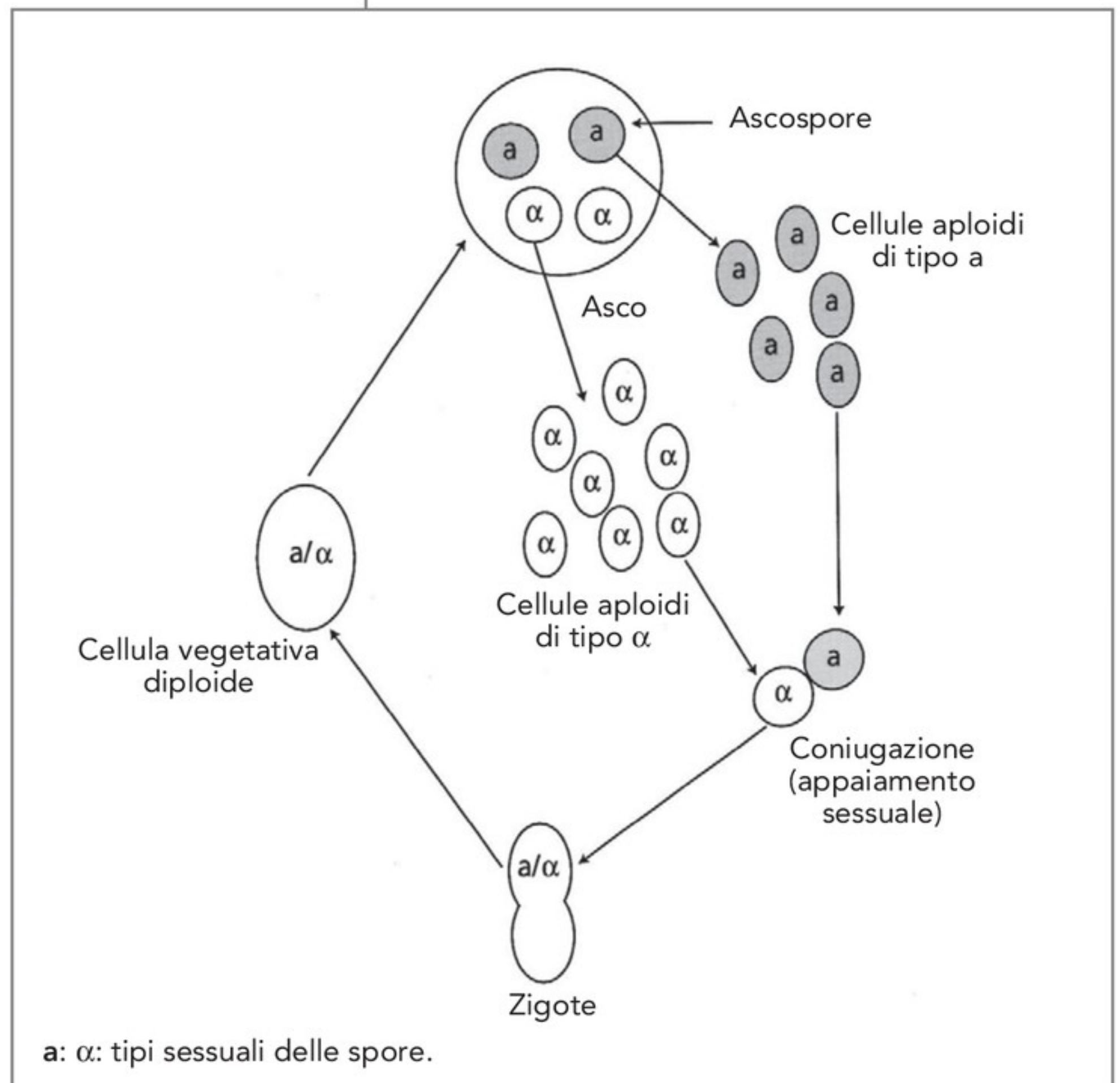


Fig. 1.14 - Ciclo di un ceppo di lievito eterotalico.