

DOCUMENTO  
TECNICO

**Giovanni Antonio Farris  
Giacomo Zara  
Severino Zara  
Marilena Budroni**

*Dipartimento di Scienze  
Ambientali Agrarie e  
Biotecnologie Agroalimentari,  
Sezione di Microbiologia  
Generale ed Applicata,  
Università degli Studi - Sassari*



*Da sinistra:  
G. Zara,  
G.A. Farris,  
S. Zara,  
M. Budroni*

## ARRESTI DI FERMENTAZIONE E METABOLISMO LIPIDICO NEL LIEVITO SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Eccessive chiarificazioni abbinate ad un basso tempo di contatto con le bucce possono ridurre drasticamente il contenuto lipidico del mosto e generare un arresto di fermentazione. Grazie allo studio del metabolismo lipidico è tuttavia possibile selezionare ceppi starter di *S. cerevisiae* capaci di adattarsi anche a mosti poveri di composti lipidici.

### Introduzione

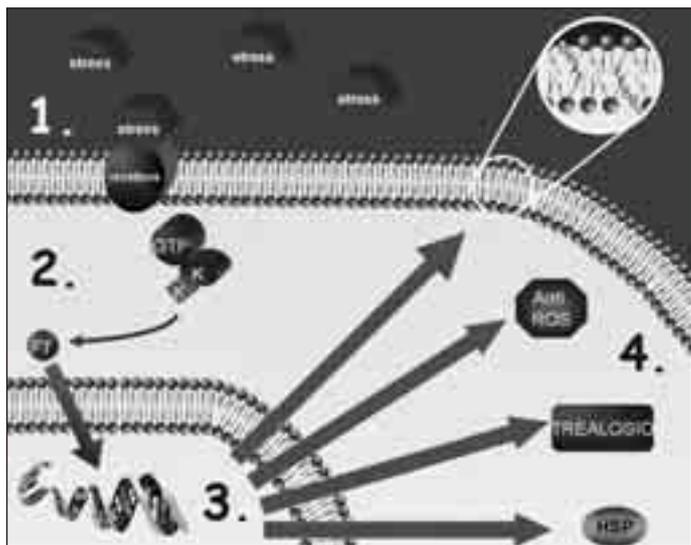
Durante la fermentazione alcolica del mosto d'uva la quantità di zuccheri che viene convertita in etanolo dipende sia dal numero di cellule di lievito che dall'efficienza fermentativa di ciascuna di esse. Eventuali problemi nell'adattamento dei lieviti all'ambiente mosto ed al processo stesso di vinificazione possono comportare una riduzione dell'attività fermentativa e generare una fermentazione lenta: in tal caso la completa

conversione degli zuccheri richiede un periodo di tempo superiore alle 3-4 settimane (Monteiro e Bisson, 1991). Per l'industria enologica il problema conseguente è legato sia alla immobilizzazione delle vasche di fermentazione per tempi molto lunghi, sia all'insorgenza di possibili alterazioni del vino (Allen e Auld, 1998). Inoltre, se le cellule di lievito non sono in grado di sopravvivere a condizioni estreme, quali temperature troppo basse o eccessiva carenza di nutrienti, si può

verificare un arresto della fermentazione. In tal caso il residuo zuccherino finale, superiore allo 0,4%, comporta l'impossibilità di garantire la stabilità microbiologica del vino, con conseguente rischio di rifermentazioni indesiderate nel prodotto imbottigliato (Bisson, 1999).

**Stress cellulare durante la fermentazione alcolica.** I fattori che possono influenzare negativamente l'attività dei lieviti durante la fermentazione alcolica sono nume-

## Fig. 1 - Adattamento delle cellule di lievito agli stress ambientali



(1) il fattore di stress viene recepito a livello della membrana plasmatica; (2) attraverso delle proteine citoplasmatiche il segnale di stress viene trasmesso al DNA nel nucleo; (3) la cellula attiva la trascrizione di geni deputati alla risposta allo stress; (4) l'azione di questi geni porta alla sintesi di proteine da shock termico (HSP), di trealosio, di enzimi anti-ossidanti ed induce modificazioni nella componente lipidica della membrana plasmatica

rosi: (i) composizione chimica del mosto, (ii) modalità di gestione del processo fermentativo e (iii) presenza di metaboliti tossici nel mezzo. Nel primo gruppo possono essere annoverati il basso pH, l'elevata concentrazione zuccherina, la carenza di fonti azotate prontamente assimilabili e la scarsità di sostanze necessarie per il lievito quali biotina, fenilalanina, acidi grassi, ergosterolo, trealosio, prolina, ecc. (Henschke e Jiranek, 1993; Thomas et al., 1994; Mansure et al., 1997). Per quanto riguarda le modalità di gestione del processo fermentativo, diverse pratiche enologiche possono rendere problematica l'attività metabolica dei lieviti. Innanzitutto le chiarifiche del mosto che, se eccessive, comportano una notevole perdita di nutrienti quali sostanze azotate e lipidi insaturi. Anche le temperature a cui viene regolata la fermentazione possono raggiungere valori lontani dai 25-30°C che rappresentano l'optimum per lo sviluppo del lievito (Fleet e Heard, 1992; Boulton e Singleton, 1996; Valero et al., 1998; Alexander e Charpentier, 1998). Infine non va tra-

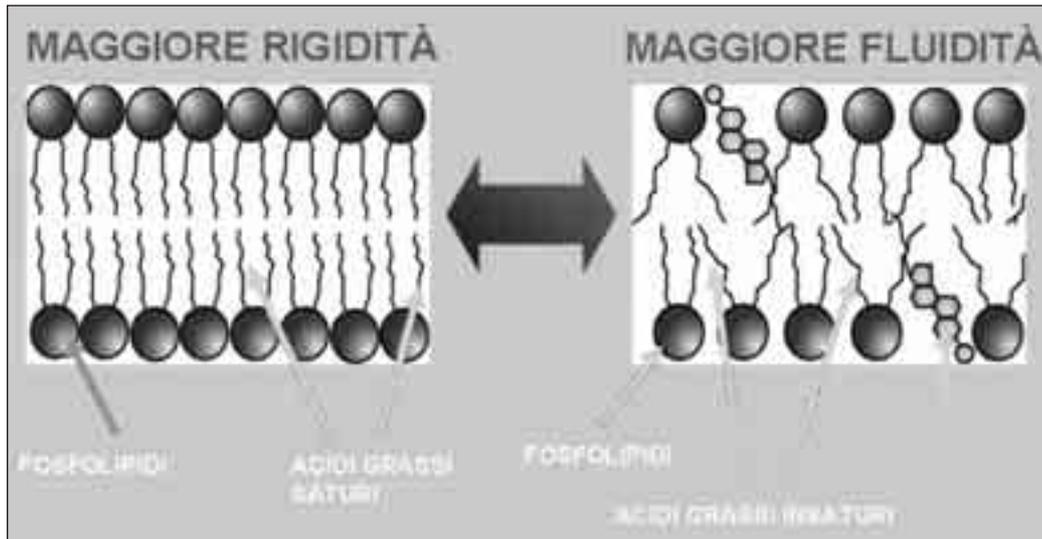
scurata la produzione di quei prodotti e sottoprodotti del metabolismo fermentativo che, rilasciati nel mosto/vino, si accumulano diventando tossici per il lievito. Fra questi composti i più importanti sono l'etanolo, l'acetaldeide e gli acidi grassi saturi a catena media e corta (Lloyd et al., 1993; Piper, 1995; Viegas et al., 1989). Poiché questi fattori possono agire sinergicamente ed in combinazione, risultano essere più dannosi di quanto non lo siano singolarmente. Ad esempio, il minimo ed il massimo di temperatura tollerabile dalle cellule di lievito dipendono dalla presenza di etanolo e di acidi organici (Viegas e Sa-Correa, 1997).

Per adattarsi alla presenza dei fattori sopra elencati e quindi essere in grado di completare correttamente la fermentazione del mosto, *Saccharomyces cerevisiae* ha sviluppato, nel corso dell'evoluzione, diversi sistemi di difesa. In particolare è stato osservato come il lievito sia in grado di percepire lo stress extracellulare e, trasferendo questo messaggio al nucleo, di attivare specifici programmi di risposta in grado di garantire la sopravvivenza delle cellule. I sistemi di ricezione e trasferimento del segnale di stress includono una o più proteine recettoriali presenti nella membrana plasmatica e moduli proteici citoplasmatici in grado di attivare specifici regolatori dell'espressione genica quali Msn2p, Msn4p, ecc. (Gagliano et al., 2002; Bauer e Pretorius, 2000). I meccanismi di risposta adottati dal lievito comprendono la sintesi di proteine da shock termico, di enzimi antiossidanti, di composti lipidici (acidi grassi insaturi ed ergosterolo) e di metaboliti ad azione protettiva quali il trealosio e il glicerolo (Chi e Arenborg, 1999; Morano et al., 1998; Moradas-Ferreira et al., 1996; Mansure et al., 1994). In questo complesso sistema la parete cellulare e la membrana plasmatica giocano un ruolo essenziale. La parete cellulare funziona infatti da barriera

protettiva, dal momento che fornisce protezione meccanica e permette l'assorbimento selettivo di certe macromolecole (de Nobel et al., 1990; Cid et al., 1995; Cabib et al., 1997). Inoltre, cambiamenti qualitativi nello strato di mannoproteine di parete si sono rivelati necessari per la crescita di *S. cerevisiae* in anaerobiosi (Abramova et al., 2001). Per quanto riguarda la membrana plasmatica, la sua corretta funzionalità è fondamentale per l'attività sia dei trasportatori di glucosio e fruttosio sia delle proteine coinvolte nella percezione del segnale di stress (figura 1).

## Nutrizione lipidica

Numerosi autori si sono interessati agli arresti di fermentazione con l'intento di proporre degli interventi preventivi atti a ridurne, se non eliminarne, l'incidenza (Beltran et al., 2005; Chaney et al., 2006). Come è ormai noto uno dei fattori di stress più importanti per il lievito nel mosto è la carenza di fonti azotate prontamente assimilabili. È infatti diventata una pratica diffusa l'aggiunta di sostanze azotate al momento dell'inoculo del ceppo starter in modo da favorirne l'attività fermentativa. Allo stesso modo sono stati proposti altri interventi da effettuare sul mosto per permettere il normale decorso della fermentazione: aggiunta di vitamine (biotina e tiamina), microaerazione, aggiunta di scorze di lievito, ecc. Nonostante questi interventi siano ormai pratica comune in molte cantine, il problema degli arresti di fermentazione continua a verificarsi soprattutto su certe tipologie di vino ed in certe annate. Per questo motivo alcuni autori hanno rivolto la loro attenzione alla nutrizione lipidica ed alla biosintesi di acidi grassi ed ergosterolo nel lievito (Bardi et al., 1998; Bardi et al., 1999). Infatti i lipidi costituiscono un gruppo di molecole biologiche estremamente importanti per la vi-

**Fig 2 - Variazioni nella fluidità della membrana plasmatica**

La cellula è in grado di adattarsi a diverse condizioni di stress modificando la fluidità della membrana plasmatica variando il rapporto acidi grassi saturi/insaturi ed il contenuto di ergosterolo

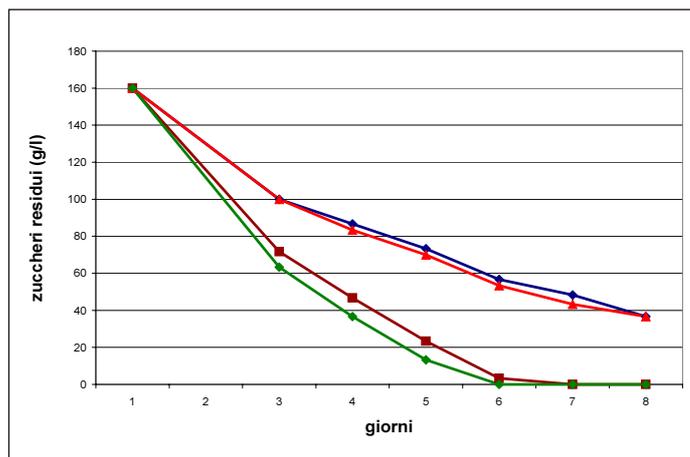
talità cellulare. Questo è ancor più vero in condizioni enologiche nelle quali alcuni dei sistemi adottati dalla cellula per difendersi dai fattori di stress richiedono una modificazione della composizione lipidica della membrana. Thomas et al. (1978) hanno dimostrato per primi come l'arricchimento della membrana plasmatica con l'acido grasso linolenico comporti una maggiore resistenza all'etanolo. Alexandre et al. (1994) hanno evidenziato come l'incremento nella quantità cellulare di ergosterolo e di acidi grassi insaturi sia responsabile della tolleranza all'etanolo.

Inoltre Sajbidor et al. (1995) hanno osservato come la cellula reagisca ad elevate concentrazioni di etanolo inducendo la sintesi di ergosterolo ed incrementando il rapporto fra acidi grassi insaturi (palmitoleico e oleico) e saturi (palmitico e stearico). Infine, ricerche condotte da Chi e Arenborg (1999) hanno dimostrato come ceppi di *S. cerevisiae* resistenti ad elevate concentrazioni di etanolo siano caratterizzati da un elevato rapporto ergosterolo/fosfolipidi, un maggior contenuto di acidi grassi a lunga catena ed una maggiore percentuale di acidi grassi insaturi nella membrana plasmatica (figura 2).

## Composti lipidici del mosto

I composti lipidici necessari per l'adattamento di *S. cerevisiae* possono provenire dal mosto oppure essere sintetizzati dagli stessi lieviti. Durante la fermentazione vinaria in condizioni ipossiche le cellule di lievito possono assimilare i fitosteroli provenienti principalmente dalla buccia degli acini (Le Fur et al., 1994). Analisi quantitative della composizione chimica delle uve hanno indicato come la frazione lipidica della polpa rappresenti lo 0,10% del peso fresco, mentre nelle bucce la quantità presente è tre volte superiore (Higgins e Peng, 1976). Per quanto riguarda il contenuto di acidi grassi, è stato osservato da Miele e collaboratori (1993) che nella polpa e nella buccia degli acini di Cabernet Sauvignon predominano i fosfolipidi, mentre i lipidi neutri sono presenti nei semi. È stato inoltre riportato come il contenuto lipidico sia differente a seconda della varietà delle uve, in particolare è maggiore nelle uve a buccia nera rispetto a quelle a buccia bianca (Miele et al., 1993). Tale osservazione è stata confermata da Garrido et al. (1998) che hanno dimostrato come la concentrazione totale

di acidi grassi nel mosto ottenuto da uve Garnacha (a buccia rossa) sia di 70,4 mg/litro e che gli acidi grassi insaturi ritrovati (palmitoleico, oleico, linoleico e linolenico) rappresentino il 41,8% del totale. Nella cultivar Viura (a buccia bianca) gli acidi grassi sono solo 32,2 mg/litro di mosto. Luparia et al. (2004) hanno constatato come l'eccessiva chiarificazione del mosto abbia un effetto negativo sulle performance fermentative dei lieviti, come conseguenza di un notevole impoverimento di sostanze nutritive e di composti lipidici. Queste osservazioni sono in accordo con quanto descritto da altri autori che riportano come i mosti ottenuti da una pressatura soffice, in associazione con altre condizioni sfavorevoli, siano soggetti agli arresti di fermentazione (Ribèreau-Gayon et al., 2003). Inoltre Ancin et al. (1996) indicano come una fase di prefermentazione, favorendo il contatto fra succo e bucce prima della pigiatura e della pressatura, possa consentire una maggiore estrazione di acidi grassi e quindi la fermentazione completa degli zuccheri in tempi più rapidi. Considerato che per la vinificazione in bianco è previsto quando richiesto un breve tempo di macerazione in fase pre-fermentativa e che spesso le operazioni di illimpidimento del mosto sono necessarie per favorirne la finezza aromatica, risulta chiaro come in questa tipologia di vini sia elevato il rischio di un arresto di fermentazione come conseguenza di uno scarso contenuto di lipidi nel mosto. In questi casi è quindi importante individuare dei ceppi starter di *S. cerevisiae* in grado di completare la fermentazione anche in tali "difficili" condizioni. Dal nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con altre Università Italiane, sono stati quindi intrapresi diversi studi volti alla caratterizzazione di ceppi vinari di *S. cerevisiae* con il fine di individuare le caratteristiche genetiche e fisiologiche che un ceppo starter deve possedere per resistere agli

**Fig. 3 - Fermentazione su mosto di uve bianche**

In condizioni tecnologiche di microvinificazione (100l di mosto da uve miste a buccia bianca) il ceppo 1 (verde) ed il ceppo 2 (marrone) di *S. cerevisiae* sono stati in grado di completare la fermentazione dopo 7 giorni mentre i ceppi 3 e 4 sono andati incontro ad arresto di fermentazione.

arresti di fermentazione (Mannazzu et al., in preparazione; Zara et al., in preparazione). È infatti risaputo che ceppi diversi di *S. cerevisiae* possono presentare una differente suscettibilità agli arresti di fermentazione e la capacità di sintetizzare lipidi insaturi (acidi grassi ed ergosterolo) potrebbe rappresentare proprio l'elemento discriminante fra un ceppo sensibile ed un ceppo resistente.

## Ceppi starter

**Ceppi starter resistenti agli arresti di fermentazione.** Il momento cruciale nella biosintesi lipidica è la fase iniziale della fermentazione. Infatti per la produzione di acidi grassi insaturi ed ergosterolo è necessario che i lieviti siano in presenza di adeguate concentrazioni di ossigeno molecolare, così come avviene nei primi 2-3 giorni di fermentazione. A supporto di questa ipotesi, Rosenfeld et al. (2003) hanno dimostrato come l'aggiunta di ossigeno (5 mg/l di mosto) a 45 ore dall'inoculo del ceppo starter incrementi l'attività fermentativa, mentre aggiunte tardive non influenzano affatto l'azione dei lieviti. Inoltre gli stessi autori osservano come l'aggiunta di una fonte di acido oleico e di ergosterolo

permetta, anche in anaerobiosi, il corretto evolversi della fermentazione. Durante la fermentazione alcolica, le prolungate condizioni di anaerobiosi rendono impossibile la desaturazione degli acidi grassi e comportano, conseguentemente, l'arresto della biosintesi lipidica con rilascio nel mezzo di intermedi (acidi grassi saturi a catena corta e media) ad azione tossica nei confronti delle cellule (Bardi 1996; Bardi et al., 1998; Bardi et al., 1999). Al contrario di quanto precedentemente supposto dalla scienza enologica, la presenza di tali composti nel mosto rappresenterebbe quindi una conseguenza e non una causa dell'arresto del metabolismo del lievito (Bardi et al., 1999). Da queste considerazioni ne consegue che l'aggiunta delle scorze di lievito, costituite da frammenti della parete cellulare e da residui della membrana plasmatica, faciliterebbe il riavvio della fermentazione non solo sottraendo acidi grassi tossici, come descritto da Lafon-Lafourcade et al. (1984), ma soprattutto fornendo alle cellule lipidi insaturi necessari per il loro metabolismo. Se questi studi da un lato confermano l'importanza della nutrizione lipidica e della biosintesi di tali composti, dall'altro non sottolineano a sufficienza l'importanza della

scelta del ceppo di lievito da utilizzare come starter. A tale proposito è stato condotto dal nostro gruppo di ricerca uno studio volto a determinare la capacità di ceppi enologici di *S. cerevisiae* di completare la fermentazione in condizioni di anaerobiosi senza apporti lipidici e a valutare l'importanza, in questo processo, della biosintesi lipidica (Zara et al., in preparazione). I risultati ottenuti mostrano come, fra i quattro ceppi commerciali testati, solo uno sia in grado di completare la fermentazione sia in mosto sintetico sia in prove di microvinificazione condotte su mosto di uve bianche (figure 3 e 4). Inoltre l'analisi dell'espressione genica evidenzia, in tale ceppo, una precoce ed elevata attivazione del gene ACC1. Questo gene, che codifica per una proteina necessaria nel primo passaggio enzimatico della sintesi degli acidi grassi, rappresenta un vero e proprio collo di bottiglia nella sintesi dei composti lipidici. I risultati ottenuti indicano quindi come la diversa capacità fermentativa mostrata dai ceppi testati potrebbe dipendere da una più efficiente utilizzazione dell'ossigeno disponibile nelle prime fasi della fermentazione. Inoltre la bassa espressione di ACC1 osservata nei ceppi sensibili agli arresti di fermentazione potrebbe essere correlata con l'elevata presenza di acido acetico segnalata nei mosti difficili da fermentare (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

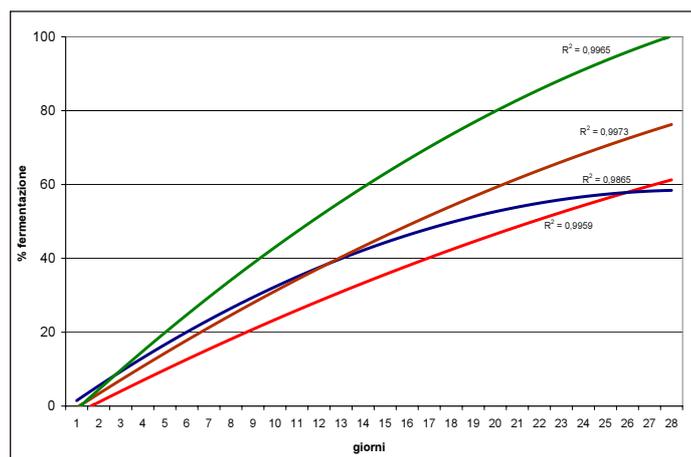
## Considerazioni conclusive

Il contenuto lipidico del mosto rappresenta un fattore importante, ma spesso trascurato, per assicurare una corretta attività metabolica dei lieviti e quindi un regolare decorso della fermentazione. È stato infatti riportato da più autori come l'aggiunta di lipidi, o alternativamente la microossigenazione del mosto, diminuisca notevolmente il rischio di un arresto o rallentamento della fermentazione.

Tuttavia la legislazione italiana impedisce la correzione del mosto mediante l'aggiunta di composti lipidici e, per quanto riguarda la microossigenazione, i sistemi attualmente commercializzati sono ancora costosi per le piccole cantine. In questi casi sarebbe auspicabile poter disporre di lieviti starter capaci di completare la fermentazione anche in condizioni sfavorevoli per la corretta attività metabolica delle cellule. Risultati preliminari mostrano come, grazie allo studio del metabolismo dei lieviti, sia possibile individuare ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* capaci di adattarsi perfettamente anche a mosti che presentano scarsità di composti lipidici.

## Bibliografia

- Abramova N., Cohen B. D., Sertil O., Kapoor R., Davies K. J., Lowry C. V. (2001). Regulatory mechanisms controlling expression of the DAN/TIR manoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157(3), 1169-1177.
- Alexandre H. e Charpentier C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 20, 20-27.
- Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. (1994). Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 20, 173-183.
- Allen M.S. e Auld P.W. (1998). Stuck Chardonnay ferments: experience in the Hunter and Mudge regions. *Aust. Grapegrower Winemaker*, 411, 8-11.
- Ancin C., Ayestaran B., Corroza M., Garrido J., Gonzalez A. (1996). Influence of pre-fermentation clarification on the higher alcohol contents of wines. *Food Chem.*, 55 (3), 241-249.
- Bardi L. (1996). Risultati preliminari sull'importanza della composizione del mezzo nutritivo della precoltura per la crescita e la vitalità di lieviti enologici. *Biologia Oggi*, 10 (3-4), 131-136.
- Bardi L., Crivelli C., Marzonna M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of

**Fig. 4 - Fermentazione su mosto sintetico**

In condizioni di laboratorio (mosto sintetico con 200 g/l zuccheri, fermentazione a 15°C in assenza di apporti lipidici esogeni e di ossigeno) si è enfatizzata la difficoltà dei ceppi di completare la fermentazione. Infatti solo il ceppo 1 (verde) di *S. cerevisiae* è stato in grado di completare la fermentazione, seppure dopo 26 giorni, mentre gli altri ceppi sono andati incontro ad arresto di fermentazione.

medium chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Can. J. Microbiol.*, 44(12), 1171-1176.

Bardi L., Cocito C., Marzona M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int. J. Food Microbiol.*, 47(1-2), 133-140.

Bauer F.F. e Pretorius I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 27-51.

Beltran G., Esteve-Zaroso B., Rozes N., Mas A., Guillamon J.M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 53(4), 996-1002.

Bisson L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(1), 107-119.

Boulton R.B. e Singleton V.I. (1996). Principles and Practices of Wine Making. 604 pp Chapman Hali, New York

Cabib E., Drgon T., Drgonova J., Ford R.A., Kollar R. (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 200-204.

Chaney D., Rodriguez S., Fugelsang K., Thornton R. (2006).

Managing high-density commercial scale wine fermentations. *J. Appl. Microbiol.*, 100(4), 689-98

Chi Z. e Arneborg N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 86(6), 1047-1052.

Cid V.J., Duran A., del Rey F., Snyder M.P., Nombela C., Sanchez M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, 59(3), 345-386.

de Nobel J.G., Klis F.M., Priem J., Munnik T., van den Ende H. (1990). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6(6), 491-499.

Fleet G.H., Heard G.M. (1992). Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.). Harwood Academic Publisher, Sydney, Australia. pp 27-54.

Gagiano M., Bauer F.F., Pretorius I.S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2(4), 433-70.

Garrido J., Ayestarán B., Ancín C., García A. (1998). Evolution of fatty acid contents in Garnacha and Viura musts during fermentation and aging of wine. *Eur. Food Res. Tech-*

*nol.*, 206, 143-147

Henschke P.A. e Jiranek V. (1993). Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.). Harwood Academic Publisher, Sydney, Australia. pp 77-174.

Higgins P.A. e Peng A.C. (1976). Lipid composition of Concord grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 32-35.

Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribereau-Gayon P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(6), 1246-1249.

Le Fur Y., Hory C., Bard M.H., Olsson A. (1994). Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening. *Vitis*, 33, 127-131

Lloyd D., Morrell S., Carlsen H.N., Degn H., James P.E., Rowlands C.C. (1993). Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 825-833.

Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65(1), 25-32.

Mansure J.J., Souza R.C., Panek A.D. (1997). Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 19, 1202-1203.

Mansure J.J., Panek A.D., Crowe L.M., Crowe J.H. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1191(2), 309-316.

Miele A., Bouard J., Bertrand A. (1993). Fatty acids from lipid fractions of leaves and different tissues of Cabernet Sauvignon grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 180-186.

Monteiro F.F. e Bisson L.F. (1991). Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 47-57.

Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast.

*Mol. Microbiol.*, 19, 651-658.

Morano K.A., Liu P.C., Thiele D.J. (1998). Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(2), 197-203.

Piper P.W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134, 121-127.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2003). Trattato di enologia I e II. Edagricole, Bologna

Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B., Salmon J.M. (2003). Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: effect on fermentation kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 113-21.

Sajbidor J., Ciesarova Z., Smogrovicova D. (1995). Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 40(5), 508-510.

Thomas K.C., Hossack J.A., Rose A.H. (1978). Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 117, 239-245.

Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M. (1994). Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5), 1519-1524.

Valero E., Millan M.C., Mauricio J.C., Ortega J.M. (1998). Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49(2), 119-124.

Viegas C.A., Rosa M.F., Sa-Correia I., Novais J.M. (1989). Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acid produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1), 21-28.

Viegas C.A. e Sa-Correia I. (1997). Effects of low temperatures (9-33 degrees C) and pH (3.3-5.7) in the loss of *Saccharomyces cerevisiae* viability by combining lethal concentrations of ethanol with octanoic and decanoic acids. *Int. J. Food Microbiol.*, 34(3), 267-277.