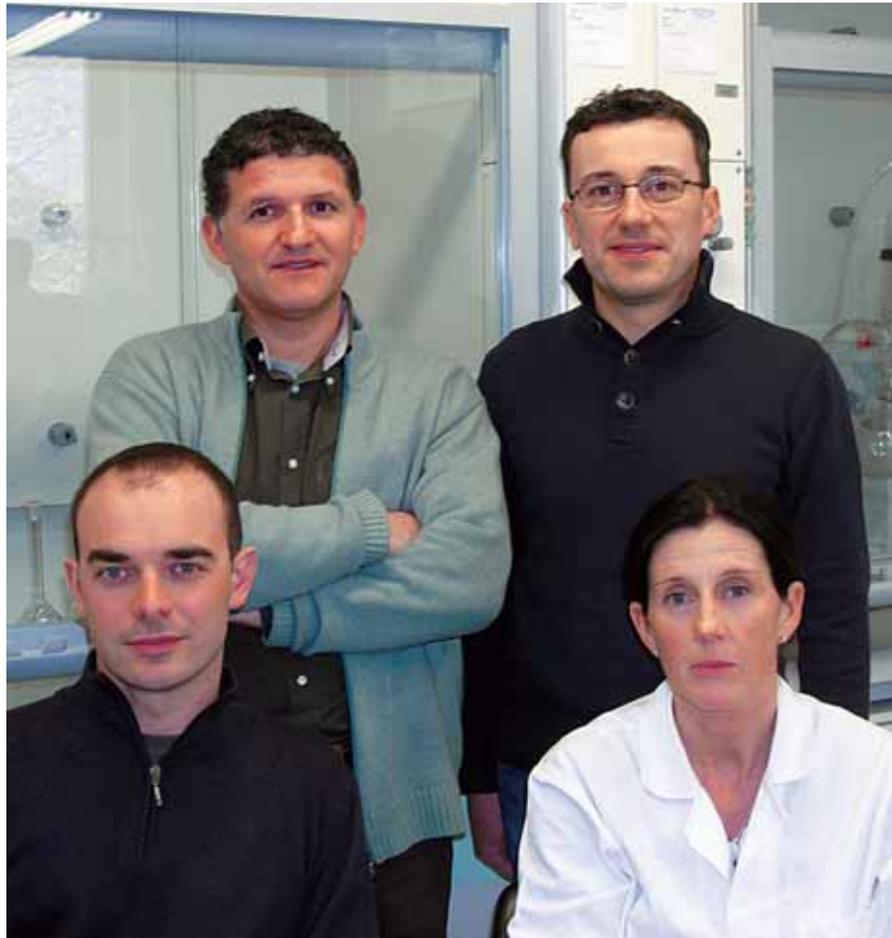


DOCUMENTO
TECNICO

Raffaele Guzzon
Giovanna Facchinelli
Mario Malacarne
Roberto Larcher
Giorgio Nicolini

*Laboratorio Chimico e
 Consulenza Enologica.
 Centro Trasferimento
 Tecnologico, FEM-IASMA,
 San Michele all'Adige (TN).*



*Da sinistra:
 Guzzon,
 Larcher,
 Malacarne,
 Facchinelli*

SELEZIONE DI LIEVITI AZIENDALI PER IL MANTENIMENTO DELLA BIODIVERSITA' NATURALE

La selezione di lieviti con buone caratteristiche enologiche provenienti dalle vinificazioni condotte nella propria cantina senza l'ausilio di inoculi commerciali è un'interessante strategia per la creazione "ad hoc" di una riserva aziendale di microrganismi da utilizzarsi, di routine o in emergenza, senza compromettere la biodiversità intrinseca alle produzioni di ciascuna realtà enologica.

Introduzione

L'interesse per produzioni enologiche maggiormente legate ai territori di origine sta portando molti produttori di vino a ripensare le modalità di conduzione della fermentazione alcolica fino al farla avvenire senza l'ausilio di colture commerciali di lieviti selezionati. Questo approccio potrebbe sembrare un passo indietro rispetto al progresso scientifico e tecnologico degli ultimi anni ma, vista la sua diffusione e al di là di mere

considerazioni di ordine economico, merita comunque attenzione e approfondimento.

Sia l'uva che la cantina sono popolate da numerose specie di lieviti e batteri che evolvono durante il processo produttivo in funzione delle condizioni ambientali e delle scelte tecnologiche. È comune osservare sulle uve giunte a maturazione e nei mosti una popolazione di lieviti nell'ordine delle 10^5 cellule/g, composta principalmente da lieviti appartenenti ai generi *Pichia*, *Candida*,

Torulaspora e *Saccharomyces*. Questi microrganismi sono in grado di avviare nel giro di 24-48 ore la fermentazione alcolica. È ampiamente noto come il conseguente innalzamento del tenore alcolico del mosto/vino selezioni la flora microbica facendo in modo che, dopo lo sviluppo di 5-6 gradi alcolici, *Saccharomyces cerevisiae* domini la popolazione microbica portando a termine la degradazione degli zuccheri. Se le fermentazioni "spontanee" sono ben gestite dal punto di

Tab. 1 - Caratteristiche dei mosti/ vini (varietà Syrah, zona di produzione: provincia di Cortona) fonte di isolamento dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

Codice del campione	Data di prelievo	Data di vendemmia	Data di inizio della fermentazione alcolica	Temperatura al campionamento (°C)	Densità a 20°C del vino al campionamento (g/L)
V1	26-09	17-09	20-09	26,6	992
V3	04-10	26-09	29-09	24,2	999
V4	27-09	16-09	19-09	23,1	992
V6	05-10	24-09	27-09	24,0	997
V8	30-09	19-09	21-09	24,5	993
V11	30-09	21-09	23-09	26,0	993
V13	03-10	20-09	22-09	23,3	992
V15	29-09	16-09	20-09	22,5	992

vista tecnologico e analitico è possibile ottenere vini qualitativamente comparabili con quelli ottenuti mediante l'inoculo di lieviti secchi attivi. Esiste però il fondato rischio che la microflora indigena, anche a causa della presenza di fattori avversi sia ambientali che tecnologici, non porti a termine la fermentazione alcolica o possa produrre limitati aromi fermentativi o addirittura *off-flavours*. A compromettere il prosieguo del processo di vinificazione sono in particolare la scarsa resistenza all'alcol dei lieviti indigeni, le esigenze nutrizionali e la produzione di composti secondari come l'anidride solforosa.

La selezione e il conseguente utilizzo di lieviti aziendali può essere un approccio interessante per far fronte a questi problemi, senza ricorrere all'uso di prodotti commerciali. L'evoluzione della tecnologia analitica ha ridotto l'onerosità del processo di isolamento, caratterizzazione e conservazione dei microrganismi enologici, mettendo a disposizione anche di piccole cantine strumenti che fino ad ieri erano ad esclusivo appannaggio di realtà economicamente importanti.

In questa nota si riporta un protocollo di isolamento e selezione sperimentato durante l'annata 2010 presso un'azienda toscana, augurandosi che tale approccio possa costituire una traccia operativa anche per altri imprenditori vitivinicoli.

L'isolamento in cantina

L'attività di selezione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* è iniziata durante la vendemmia 2010 in un'azienda di Cortona, in Provincia di Arezzo, che ha incentrato la sua attività sulla produzione di vino da uve Syrah. L'azienda opera in vigna e cantina seguendo un disciplinare biodinamico e sin dalle prime vinificazioni svolte negli anni 2000 non ha mai utilizzato colture commerciali per l'inoculo della fermentazione alcolica. L'isolamento dei lieviti è stato svolto a partire da campionamenti di mosto/vino effettuati sulle vasche (Tab. 1) dopo il 90% della fermentazione alcolica per permettere la raccolta dei lieviti con la maggiore attitudine fermentativa e resistenza all'etanolo. Un prelievo più tardivo, a fermentazione conclusa, avrebbe comportato una significativa perdita di biodiversità (Renouf et al., 2006). Viste la logistica sfavorevole e la distanza tra laboratorio e cantina si è proceduto alla semina diretta di aliquote di mosto/vino su bottiglie per microbiologica contenenti un terreno sintetico solido con una specifica composizione chimica tale da consentire lo sviluppo e il mantenimento per alcune settimane dei lieviti e bloccare, nel contempo, lo sviluppo dei batteri e delle muffe. Terminati i campionamenti, le bottiglie sono state spedite al-

l'Unità Laboratorio Chimico e Consulenza Enologica della Fondazione E. Mach (San Michele all'Adige, TN).

La selezione in laboratorio

I campioni sono stati trasferiti in terreno YM liquido (OIV, 2010) per favorire una rapida crescita dei lieviti presenti e successivamente su terreno solido WL Agar (OIV, 2010) per permettere l'isolamento dei singoli ceppi. Sono stati isolati 100 individui, diversi tra loro per morfologia di colonia e di cellula. Dato che il target dell'attività era l'isolamento di *Saccharomyces cerevisiae* si è provveduto a eliminare gli individui non appartenenti a questa specie mediante test di crescita su un terreno sintetico discriminante Agar Lisina (OIV, 2010).

La caratterizzazione dei diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* è stata svolta mediante l'analisi delle sequenze interdelta (ISA-PCR) (Charpentier et al., 2009; Legras e Karst, 2003). Tale tecnica ha permesso di ottenere dei profili genetici caratteristici di ciascun ceppo microbico garantendo così la discriminazione dei ceppi presenti e permettendo in futuro di rintracciarli durante la fermentazione.

I ceppi puri sono stati conservati in un apposito terreno sintetico a - 80°C. Successivamente è stata svolta una serie di test fisiologici per valu-

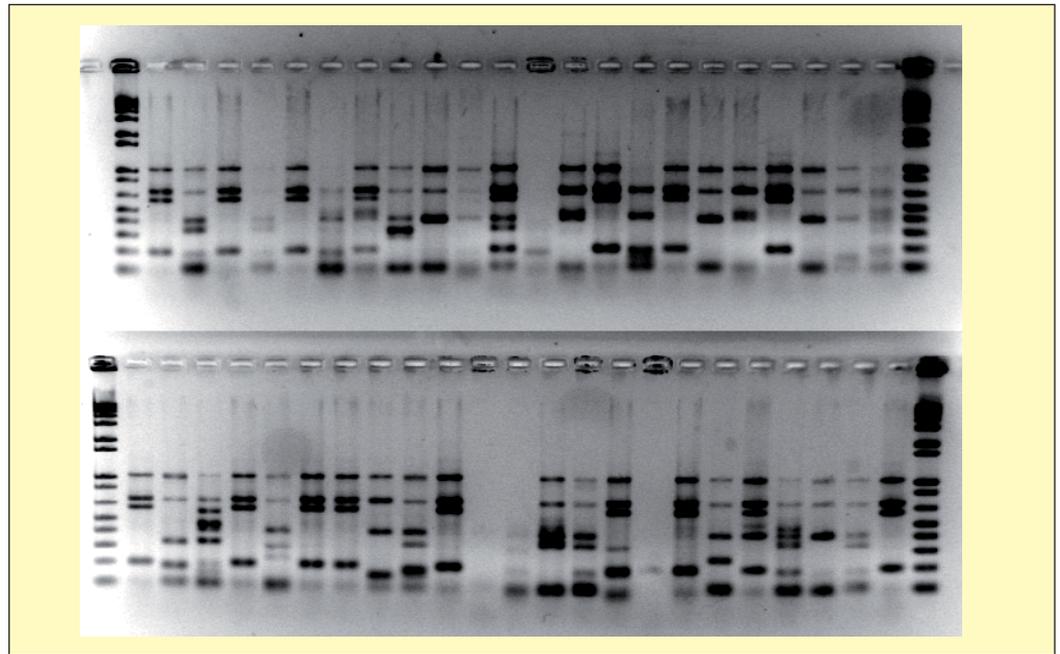
tare le prestazioni enologiche dei ceppi ed eliminare quelli non efficienti. I test fisiologici hanno riguardato sia l'attività fermentativa su mosti aventi dotazioni zuccherine e pH in un ampio intervallo enologico, privilegiando mosti a elevata concentrazione zuccherina, sia la produzione di anidride solforosa durante la fermentazione alcolica. Tutte le fermentazioni sono state condotte su mosto d'uva opportunamente corretto. La dotazione iniziale di azoto prontamente assimilabile (APA) è stata mantenuta in un intervallo medio - basso, compreso tra 120 e 140 mg/L. L'evoluzione delle fermentazioni è stata monitorata mediante misura di calo del peso dei campioni (Cavazza et al., 2010) e i principali parametri chimici dei vini sono stati misurati immediatamente al termine delle fermentazioni stesse.

La biodiversità in cantina

Il protocollo messo a punto ha consentito, nonostante la distanza temporale e geografica tra il luogo di campionamento e il laboratorio, l'isolamento di una complessa popolazione microbica. L'osservazione delle piastre Petri ottenute dai campioni di vino ha evidenziato una notevole varietà di lieviti presenti nei vini, sebbene sia noto come l'aumento dell'alcol imponga un forte stress ai microrganismi presenti nel vino (Le Jeune et al., 2006; Alexandre et al., 1994). La crescita su terreni selettivi ha permesso di discriminare i lieviti *Saccharomyces cerevisiae*, ottenendo un totale di 45 isolati. Tali isolati sono stati avviati all'analisi ISA-PCR che ha consentito di ottenere un profilo genetico caratteristico per ciascun isolato (Fig. 1). Dal confronto dei profili è stato possibile giungere ad identificare 11 diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* presenti nei mosti/vini al momento del campionamento.

Non si è ravvisata una correlazione tra i singoli ceppi e

Fig. 1 - Profili genetici ottenuti mediante analisi ISA-PCR sui 45 lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* isolati al termine di fermentazioni di vino Syrah



le partite di mosto/vino. Questo risultato è ragionevole considerando le piccole dimensioni dell'azienda e la necessità di utilizzare le stesse attrezzature enologiche con abbondanti contaminazioni incrociate. È però possibile affermare come, viste le dimensioni contenute della produzione, la biodiversità osservata sia piuttosto elevata, in accordo con quanto già osservato in altre realtà operanti in assenza di colture microbiche starter (Guzzon et al., 2010a). I ceppi, nominati da A1 ad A11, sono stati avviati alle prove fisiologiche.

Le fermentazioni sperimentali

Il metodo proposto per testare l'attitudine fermentativa dei ceppi di lievito era già stato precedentemente validato dai ricercatori della Fondazione Edmund Mach (Guzzon et al., 2010b).

Nel primo set di prove sono stati utilizzati 4 mosti in cui potenziale alcolico (crescente da 9.5 a 13.5 % v/v) e pH (da 3.14 a 3.81) sono stati corretti per simulare le condizioni tipiche di mosti provenienti da uve a diversi gradi

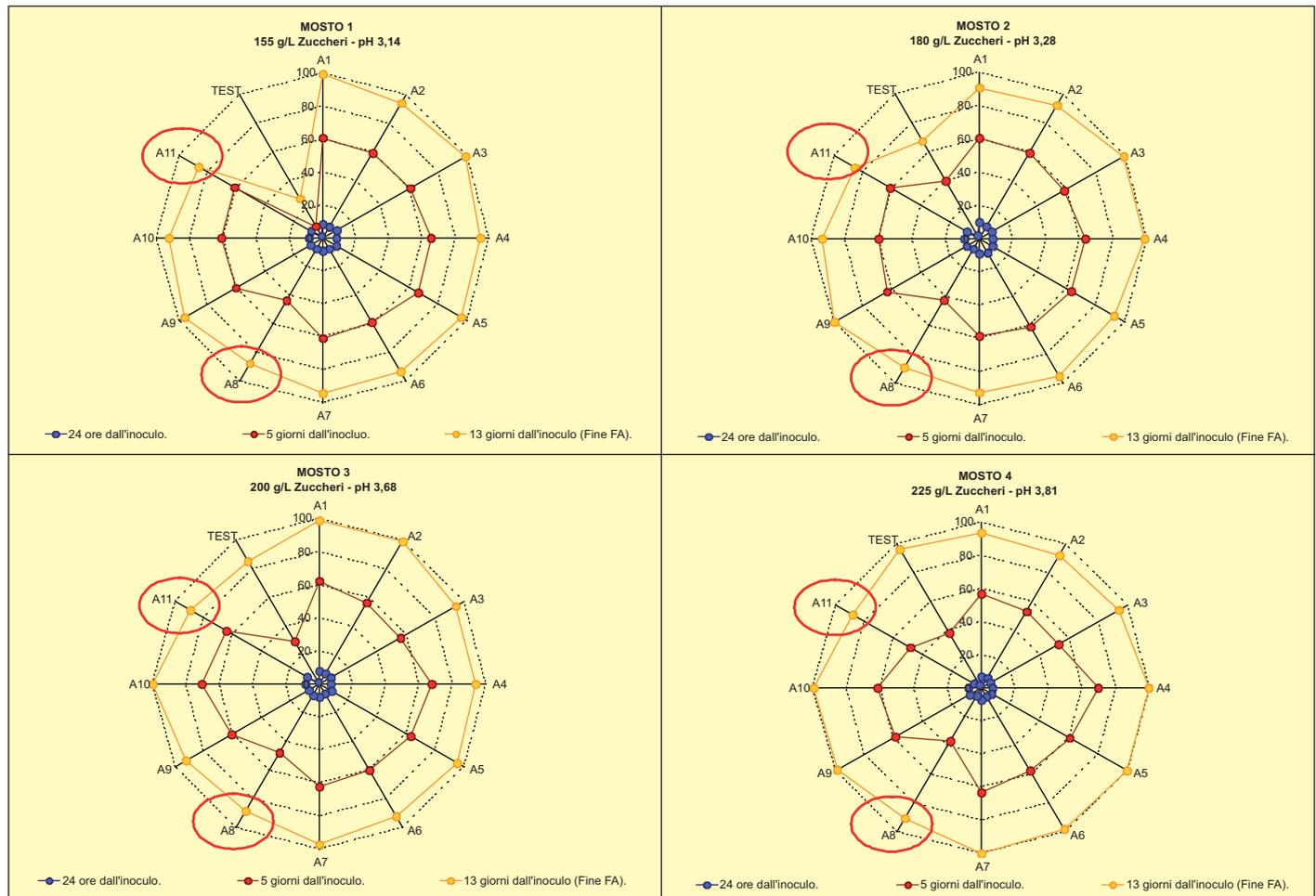
di maturazione. I risultati sono riportati nella Fig. 2 dove si è scelto di focalizzare l'attenzione su tre momenti: l'avvio (24 h), la metà (5 giorni) e la conclusione della fermentazione (arbitrariamente stabilita a 13 giorni). L'inoculo è stato pari alle 105 ufc/mL e pertanto non si sono osservati problemi nelle prime fasi della fermentazione alcolica. Come atteso, il TEST, ovvero il mosto non inoculato, ha presentato un avvio di fermentazione più lento, non ben quantificabile al primo monitoraggio ma trascinato poi almeno fino al 5° giorno di fermentazione. Tra gli 11 ceppi testati quelli codificati A8 e A11 hanno dato maggiori problemi nella conclusione della fermentazione in diversi mosti e pertanto sono stati esclusi dalle successive prove.

Il successivo set di fermentazioni ha visto l'impiego di mosti con concentrazioni zuccherine più elevate, fino a 240 g/L di zucchero, corrispondenti a una gradazione alcolica potenziale attorno a 14.5 % vol. Tali condizioni - oltre ad aumentare i rischi di arresto della fermentazione - sono in grado di causare alle cellule di lievito un forte

stress dovuto alla pressione osmotica, con conseguente aumento di acidità volatile (Bisson et al., 2000). La maggiore pressione selettiva esercitata in questa prova ha portato a un incremento dei risultati insoddisfacenti (Tab. 2). Diversi arresti di fermentazione sono stati osservati nei mosti a gradazione maggiore, segno che non tutti i ceppi erano caratterizzati da una effettiva resistenza a concentrazioni di etanolo elevate. I ceppi A3, A4, A5, A7 e A9 hanno dimostrato una miglior capacità di consumare gli zuccheri presenti, lasciando nelle condizioni sperimentali e al termine del periodo di controllo arbitrariamente stabilito in 13 giorni, concentrazioni inferiori a 5 g/L.

Altri due parametri hanno fornito utili indicazioni circa l'attitudine enologica dei ceppi isolati. Circa l'acido malico, non si sono evidenziate differenze significative nel suo consumo - nel complesso contenuto - da parte dei diversi lieviti. Al contrario, la produzione di acido acetico da parte del ceppo A4 è stata notevolmente più alta della media dei ceppi dotati di buona efficienza fermentativa. Negli altri casi l'acidità

Fig. 2 - Percentuale di zucchero consumata nel corso delle fermentazioni alcoliche di mosti a diversa concentrazione zuccherina e pH, da parte di 10 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, rispetto ad un mosto senza inoculo (TEST). Sono evidenziati in rosso i ceppi che hanno dato arresti di fermentazione



volatile si è mantenuta decisamente bassa nonostante le elevate gradazioni zuccherine, un dato questo sicuramente interessante dal punto di vista enologico.

La produzione di anidride solforosa

Sono numerosi i metabolismi secondari svolti dai lieviti con un forte impatto sulla qualità del vino. Molti di questi dipendono però fortemente dalle condizioni ambientali e dalla presenza di substrati particolari e sono quindi difficilmente analizzabili in laboratorio. Al contrario il livello di produzione di anidride solforosa è una caratteristica abbastanza conservata per ogni ceppo anche in diverse condizioni ambientali. *Saccharomyces cerevisiae* produce anidride solfo-

rosa, durante la degradazione degli zuccheri, come metabolita secondario della degradazione di molecole solforate, quali gli aminoacidi (Beljak et al., 2008). Tale fenomeno ha riflessi negativi sulla vinificazione perché le elevate concentrazioni di SO_2 raggiunte nel vino possono compromettere la successiva fermentazione malolattica. Da precedenti lavori si è osservato che lieviti presenti sul mercato sono in grado di apportare al vino anche più di 50 mg/L di SO_2 , una concentrazione in grado di causare stress alla microflora batterica (Guzzon et al., 2009; Fugelsang, 1997) se sommata a quella derivante dalle aggiunte effettuate dall'enologo al mosto.

I test svolti in un mosto portato a contenuti crescenti di zuccheri (Fig. 3), hanno dimostrato che la produzione

di anidride solforosa da parte dei lieviti isolati è significativa ma solo in rari casi in grado di causare un effettivo stress alla flora batterica. Tra i ceppi identificati come ad "elevata attitudine fermentativa", evidenziati in verde nella Fig. 3, non si sono osservate produzioni di anidride solforosa superiori alla media dei ceppi testati in questo lavoro, con la sola eccezione del ceppo A4, già scartato dalla selezione a causa dell'elevata produzione di acido acetico.

L'uso dei ceppi in cantina

Una coltura microbica, utilizzata come starter di fermentazione, è efficace quando è in grado di prendere rapidamente il sopravvento sulla popolazione microbica

presente nel mezzo di fermentazione, dirigendo i processi biologici che in esso avvengono. A tal fine sono essenziali due condizioni:

1. la coltura microbica deve essere scelta in modo che le sue caratteristiche fisiologiche si adattino all'ambiente in cui si troverà ad agire,

2. deve essere inoculata nelle migliori condizioni fisiologiche di alta concentrazione ed elevata vitalità.

Solitamente in enologia sono impiegate colture di lievito disidratate (Lieviti Secchi Attivi) che hanno una concentrazione di lievito superiore ai 10 miliardi di cellule per grammo (Guzzon et al., 2010b). Considerando che la dose di utilizzo medio è pari a 30 grammi per ettolitro di mosto, si ottiene così una concentrazione finale in mosto di alcuni milioni di cellule per millilitro, sufficiente a garantire una rapido avvio della fermentazione alcolica.

Le colture fresche hanno solitamente una concentrazione cellulare molto più bassa per unità di volume o peso perché non sono state sottoposte ai processi di concentrazione ed essiccazione tipici delle colture disidratate. Tuttavia, non essendo state stressate da processi di essiccazione, queste biomasse garantiscono comunque buona efficacia se conservate e utilizzate seguendo le appropriate pratiche, che possono essere riassunte in 5 punti.

1. Conservare le colture prima dell'uso in condizioni di costante refrigerazione (< 10°C), evitando contaminazioni esogene.

2. Programmare l'uso delle colture fresche, evitando inoculi affrettati che ne vanificherebbero l'azione.

3. Prevedere un'opportuna riattivazione delle colture prima dell'uso.

4. Monitorare il processo di riattivazione mediante analisi microbiologiche o osservazioni empiriche, basate su esperienze pregresse.

5. Inoculare la corretta dose di coltura fresca nel mosto/vino.

Nel protocollo operativo dell'esperienza oggetto del

Tab. 2 - Analisi compositiva dei vini ottenuti dalla fermentazione di mosti a elevata gradazione zuccherina con i ceppi *Saccharomyces cerevisiae* oggetto di selezione

Ceppo	Mosto	Etanolo (% vol)	Ac. Volatile (g/L)	Zuccheri riduttori (g/L)	Acido tartarico (g/L)	Acido malico (g/L)	Acido lattico (g/L)
A1	1	13,3	0,22	4,0	2,05	2,73	0,25
	2	12,9	-	18,7	-	-	-
	3	14,2	0,31	3,3	1,87	2,52	0,20
A2	1	13,5	0,26	3,8	1,90	2,94	< 0,20
	2	13,3	0,31	6,5	1,81	2,66	< 0,20
	3	13,7	-	28	-	-	-
A3	1	12,9	0,16	5,5	2,08	2,55	0,20
	2	14,1	0,14	3,0	1,98	2,35	< 0,20
	3	14,5	0,17	2,1	1,85	2,84	0,20
A4	1	13,1	1,06	4,0	2,11	2,92	0,30
	2	13,6	1,12	4,7	2,01	2,82	< 0,20
	3	14,3	1,21	3,5	1,95	2,57	< 0,20
A5	1	13,4	0,23	4,1	2,04	2,42	< 0,20
	2	13,5	0,28	4,8	1,99	2,36	0,27
	3	14,4	0,31	5,0	1,98	2,31	< 0,20
A6	1	13,3	0,20	3,7	2,03	2,19	0,34
	2	11,9	-	31,2	-	-	-
	3	13,1	-	34,1	-	-	-
A7	1	13,2	0,17	4,5	2,05	2,56	0,27
	2	13,9	0,17	5,1	1,95	2,39	0,42
	3	14,8	0,20	5,0	1,82	2,1	0,37
A9	1	12,3	0,34	4,6	2,15	2,86	< 0,20
	2	13,7	0,42	5,2	2,05	2,67	< 0,20
	3	14,4	0,47	5,1	1,94	2,31	0,24
A10	1	11,9	-	17,0	-	-	-
	2	12,3	-	28,2	-	-	-
	3	13,8	-	10,4	-	-	-

Le prove in grassetto hanno evidenziato arresti di fermentazione (zuccheri totali > 10 g/L dopo 25 giorni dall'inoculo). Mosto 1: zuccheri 220 g/L; Mosto 2: zuccheri 230 g/L; Mosto 3: zuccheri 240 g/L.

presente lavoro, la coltura di lievito "aziendale" selezionata viene inviata in cantina in apposite bottiglie per microbiologia contenenti uno specifico terreno agarizzato solido in cui il lievito rimane vivo e vitale per almeno 3 mesi se mantenuto a temperature inferiori a 10°C.

Il terreno di crescita è del tutto atossico, tuttavia si ritiene inopportuna la sua aggiunta diretta al vino. Si consiglia pertanto una serie di inoculi successivi su masse di mosto via via crescenti per stimolare la moltiplicazione e contestualmente l'adattamento del microrganismo all'ambiente di fermentazione. È opportu-

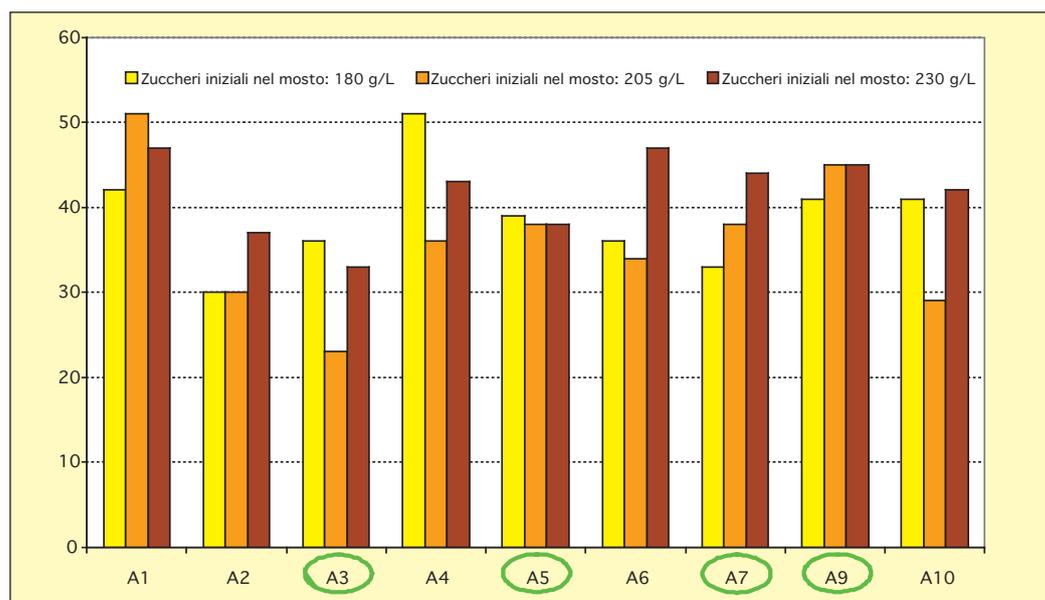
no ricordare che in questa fase la coltura microbica è in rapida crescita e abbisogna di un costante apporto di zuccheri, di ossigeno, di nutrienti azotati e vitamine che dovranno essere aggiunti al mosto se questi ne risultasse carente. Una coltura di lievito così ottenuta ha solitamente una concentrazione cellulare nell'ordine di alcune decine di milioni di cellule per millilitro. Un inoculo nella massa di un campione pari al 2% del volume finale è sufficiente a garantire l'avvio della fermentazione alcolica in mosti aventi limitata carica spontanea. Va da sé che la disponibilità di una buona com-

petenza microbiologica in azienda è comunque fondamentale per l'ottenimento dei migliori risultati.

Considerazioni conclusive

Obiettivo dei test svolti era quello di verificare se nella flora microbica indigena presente nei mosti/vini della cantina committente fossero presenti ceppi di lievito a buona attitudine enologica, isolabili e moltiplicabili in laboratorio, da utilizzarsi come starter autoctoni nelle successive vendemmie. I risultati emersi dal lavoro di isola-

Fig. 3 - Concentrazione di anidride solforosa totale (mg/L) nei vini al termine di fermentazioni alcoliche condotte con i *Saccharomyces cerevisiae* oggetto di selezione



Le prove sono condotte in un mosto a 3 livelli crescenti di concentrazione zuccherina iniziale. Sono evidenziati in verde i ceppi ritenuti idonei all'inoculo in cantina

mento, purificazione e caratterizzazione fisiologica sono confortanti. Dalla complessa popolazione microbica presente è stato possibile isolare almeno 4 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* dotati di elevata resistenza all'etanolo, buona vigoria fermentativa, scarsa produzione di acido acetico e anidride solforosa. Tali ceppi, conservati nella collezione del Laboratorio di Microbiologia della Fondazione Edmund Mach saranno messi a disposizione del committente per l'inoculo delle fermentazioni alcoliche negli anni successivi. Al termine delle fermentazioni è opportuno un re-isolamento per verificare l'effettiva prevalenza dei ceppi selezionati sulla microflora presente nei mosti/vini.

Senza voler sminuire l'indiscussa importanza tecnologica dell'uso dei LSA, si ritiene che la procedura applicata in questo lavoro possa permettere anche a singole cantine - a fronte di costi non particolarmente elevati - di disporre di lieviti "aziendali" propri grazie ai quali garantire il mantenimento di una rilevante parte della biodiversità intrinseca alle produzioni di ciascuna realtà enologica.

Sommario

Parole chiave: Fermentazione spontanea, lieviti indigeni, selezione microbica, biodiversità.

Negli ultimi anni si è registrato un rinnovato interesse verso fermentazioni condotte senza l'inoculo di colture commerciali. Tale approccio può esporre la produzione a rischi di deviazioni microbiologiche, soprattutto in annate difficili. L'isolamento e la caratterizzazione di lieviti provenienti dalle vinificazioni condotte in azienda senza l'ausilio di inoculi commerciali consente di creare un'utile riserva di microrganismi dotati di buone prestazioni enologiche da utilizzarsi, di routine o in emergenza, senza compromettere la biodiversità intrinseca alle produzioni di ciascuna realtà enologica.

Summary

SELECTING YOUR OWN WINE YEAST FOR CONSERVING NATURAL BIODIVERSITY

Key words: Spontaneous fermentation, indigenous yeasts, microbial selection, biodiversity.

In the recent years a renewed interest regarding oenological fermentations conducted

without the addition of selected yeast cultures was observed. This approach may expose the wines to the risk of microbiological spoilage, especially in difficult vintages. The isolation and the characterization of yeasts from one's own winery allow to create a useful reserve of yeast having good fermentative performances to be used, for routinely or emergency alcoholic fermentation inoculums, without compromising the biological diversity peculiar of each winery.

Ringraziamenti. Si ringrazia l'Az. Agricola Stefano Amerighi (Cortona, Italia) per la preziosa collaborazione. ■

Bibliografia

Cavazza A., Poznanski E., Guzzon R. **2010** Must treatments and wild yeast growth before and during alcoholic Fermentation. *Annals of Microbiology*. 61, 41-48.
 Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. **1994** Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 20, 173-183.
 Beljak J., Jeromel A., Herjavec S., Orlic S. **2008** In-

fluence of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains on the sulfur dioxide concentration in wine. *Journal of Central European Agriculture*. 9, 289-295.

Bisson L.F., Butzke C.E. **2000** Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51, 168-177.

Charpentier C., Colin A., Alais A., Legras, J. **2009** French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95, 263-273.

Fugelsang K.C. **1997** The lactic acid bacteria. In: Fugelsang, K.C. (Ed.), *Wine Microbiology*, Chapman & Hall, New York, 159-168.

Guzzon R., Poznanski E., Conterno L., Vagnoli P., Krieger-Weber S., Cavazza A. **2009** Selection of a new highly resistant strain for malolactic fermentation under difficult conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture* 30(2), 41-49.

Guzzon R., Widmann G., Malacarne M. **2010a** Lieviti spontanei alla prova. *VQ vite, vino e qualità*. 8, 38-43.

Guzzon R., Nicolini G., Nardin T., Larcher R., Malacarne M. **2010b** Qualità microbiologica e prestazioni enologiche di starter per la fermentazione alcolica. *L'Enologo*. 46(1/2), 87-92.

Le Jeune C., Erny C., Demuyter C., Lollier, M. **2006** Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*. 23, 709-716.

Legras J.L., Karst F. **2003** Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization, *FEMS Microbiology Letters*. 221, 249-255.

OIV **2010** Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. *Organisation Internationale de la Vigne e du Vin*, Paris (F).

Renouf V., Perello M.C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A. **2006** Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking, *Journal International Science Vigne Vin*. 40, 101-116.