

UNO STRUMENTO INNOVATIVO PER IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE: INOCULO SEQUENZIALE DI UN LIEVITO NON-SACCHAROMYCES COMPATIBILE CON UN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Céline RAYNAL¹, Forbes WARDROP², Olivier PILLET¹, Ann DUMONT²
Perrine LANGUET¹, Anne ORTIZ-JULIEN¹

¹ Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France

² Lallemand Inc., 1620, rue Préfontaine, Montréal, Canada H1W 2N8

1. Introduzione

Fino a qualche decennio fa, la fermentazione alcolica nella grande maggioranza dei casi era svolta da parte di lieviti indigeni presenti nel mosto. Pertanto la conversione degli zuccheri in alcol e la produzione di composti aromatici secondari avveniva come risultato di un processo aleatorio, con esiti difficilmente prevedibili. I rischi qualitativi quali deviazioni aromatiche, spunto acetico, o problemi legati all'andamento della fermentazione erano relativamente frequenti.

Gli studi ecologici evidenziano chiaramente che i lieviti presenti sugli acini delle uve sono soggetti ai fenomeni naturali (maturazione dell'uva, cambiamenti meteorologici), all'intervento dell'uomo ed ai trattamenti fitosanitari effettuati (Guerra *et al.*, 1999; Cabras e Angioni, 2000). L'utilizzo dei lieviti *Saccharomyces* selezionati permette di ridurre le variazioni dovute all'evoluzione delle popolazioni indigene incontrollate e di assicurare un buon andamento della fermentazione alcolica. Ne deriva un miglioramento della qualità globale dei vini, rispondendo anche a esigenze estremamente attuali come tracciabilità e ripetibilità dei processi fermentativi (Fleet *et al.*, 1993; Lambrechts e Pretorius, 2000).

È altrettanto importante considerare la diversità della microflora di lieviti presente nei vigneti (Davenport, 1974; Mortimer e Polsinelli, 1999), nei mosti (Heard e Fleet, 1986; Ganga e Martinez, 2004; Torija *et al.*, 2001; Hierro *et al.*, 2006) nonché al momento delle prime fasi della vinificazione (Zott *et al.*, 2008). La partecipazione di lieviti genericamente conosciuti come "non-*Saccharomyces*" alle fermentazioni alcoliche spontanee è stata ampiamente documentata in letteratura (Ciani, 1997; Egli *et al.*, 1998; Soden *et al.*, 2000).

Anche alla luce di recenti risultati scientifici, alcuni di questi lieviti sono in grado di produrre dei metaboliti di fermentazione in grado di determinare differenze quantitative e qualitative nei vini (Ciani e Ferraro, 1998; Ciani *et al.*, 1996; Ferraro *et al.*, 2000). Questa biodiversità, se ben gestita, può differenziare positivamente i vini o ancora rivelarne il potenziale aromatico, sia a livello d'intensità che di complessità (Egli *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2009).

1.1 L'INTERESSE VERSO LA SPECIE *TORULASPORA DELBRUECKII*

All'interno della biodiversità naturalmente presente sulle uve e negli ecosistemi fermentativi, alcuni lieviti sono stati studiati più nei dettagli per verificare il loro contributo al profilo organolettico del vino. Tra questi, possiamo citare specie appartenenti ai generi *Torulaspota*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* (Belancic *et al.*, 2003; Ciani 1997; Ciani e Ferraro, 1998; Egli *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1990; Rosi *et al.*, 1994). *Torulaspota delbrueckii* si è dimostrata interessante non solo per rivelare la tipicità sensoriale, ma anche per la purezza del suo profilo fermentativo (Ciani e Picciotti, 1995; Martinez *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1991) e per la sua capacità di limitare alcuni difetti dei vini come l'acidità volatile (Languet *et al.*, 2005; Bely *et al.*, 2008). Dopo aver realizzato numerose vinificazioni, monitoraggi della popolazione di lieviti e analisi sensoriali in collaborazione con l'INRA (*Institute National de la Recherche Agronomique*, Francia)

si è scelto di lavorare con uno specifico ceppo di *Torulaspota delbrueckii* (TD 291) vista l'ampia variabilità intra-specifica presente all'interno della specie (Renault *et al.*, 2009).

1.2 PRODUZIONE DI UNO STARTER DI *TORULASPOA DELBRUECKII* AD ELEVATA VITALITÀ IN FORMA SECCA ATTIVA

Sono state approntate differenti strategie per produrre il ceppo *Torulaspota delbrueckii* TD291 in forma di lievito secco attivo (LSA), al fine di accrescerne il tasso di sopravvivenza in condizioni enologiche difficili e di migliorare la capacità di moltiplicazione di questo lievito nei mosti d'uva.

Nella prova descritta di seguito sono stati testati due preparati di *T. delbrueckii* ottenuti con due diverse modalità di produzione (LSA TD1 e LSA TD2).

Il mosto utilizzato era di uva Viognier, le cui analisi standard sono riportate in tabella 1. Questo mosto presentava una bassa torbidità, quindi minime concentrazioni in micronutrienti e fattori di sopravvivenza, tali da ostacolare la moltiplicazione dei non-*Saccharomyces* e dei lieviti in generale. La temperatura impostata per queste fermentazioni era di 20 °C.

Allo scopo di poter comparare le capacità di moltiplicazione di *Torulaspota*, abbiamo impiegato in parallelo un lievito selezionato *Saccharomyces cerevisiae* (LSA SC) universalmente utilizzato per le vinificazioni in bianco; questo lievito testimone è stato prodotto col processo YSEO® (Yeast SEcurity Optimization), approfittando dunque degli ultimi progressi tecnici in termini di produzione del lievito secco attivo.

Glucosio + Fruttosio	Acidità totale	pH	Azoto assimilabile	Torbidità
215 g/L	2,50 g/L H ₂ SO ₄	3,65	150 mg/L	42 NTU

TABELLA 1 : Analisi standard del mosto di Viognier utilizzato.

Le vitalità di questi tre lieviti sono presentate in tabella 2. Si ricorda che il valore minimo, in conformità alle vigenti normative, è di 1·10¹⁰ UFC/g di lievito secco attivo. Tutti i lieviti d'avviamento utilizzati rispondono quindi ampiamente alle norme di qualità.

LSA	LSA TD1 (<i>T. delbrueckii</i>)	LSA TD1 (<i>T. delbrueckii</i>)	LSA TD1 (<i>S. cerevisiae</i>)
UFC/g di lievito	4x10 ¹⁰	2,3x10 ¹⁰	2,6x10 ¹⁰

TABELLA 2 : Vitalità dei diversi lieviti d'avviamento.

Il controllo di vitalità dei lieviti inoculati e la loro conta (Fig. 1) sono stati effettuati dopo 50 ore di fermentazione. Le conta dei lieviti è stata realizzata tramite inoculo su terreno gelificato Sabouraud aggiunto di 0,055 g/L di blu di metilene per permettere una differenziazione morfologica. Questo metodo è stato verificato preliminarmente e validato tramite analisi genetiche. Nel caso delle modalità che prevedevano due lieviti d'avviamento in modo sequenziale (prima *Torulaspota*, poi *Saccharomyces*), i controlli sono stati svolti prima di incorporare il secondo lievito al mosto già in fermentazione.

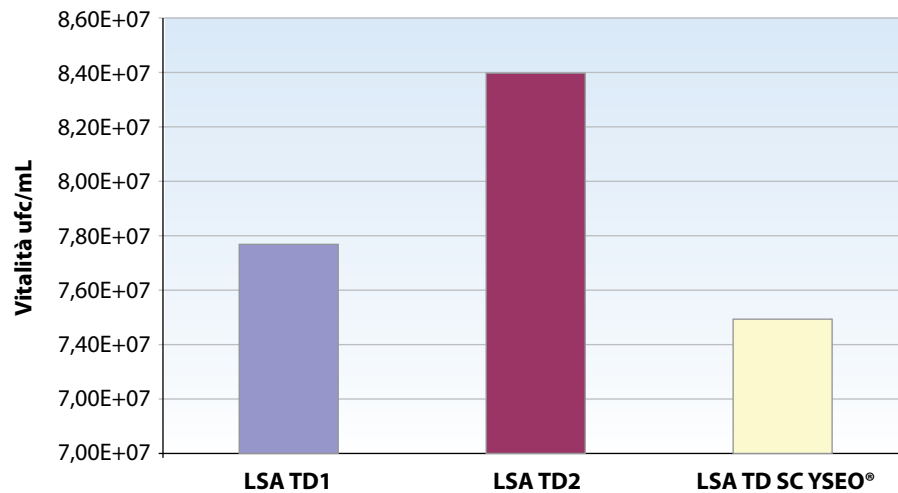


FIGURA 1. Vitalità nel mosto di differenti lieviti d'avviamento non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* in funzione del processo di produzione applicato.

Parametro	Alcol potenziale	Glucosio + Fruttosio	Acidità totale	pH	SO ₂ libera	SO ₂ totale	Acidità volatile
LSA TD1 + LSA SC Inoculo sequenziale	12,72 % vol	0 g/L	5,50 g/L H ₂ SO ₄	3,73	6 mg/L	14 mg/L	0,21 g/L ac. acetico
LSA TD2 + LSA SC Inoculo sequenziale	12,72 % vol	0 g/L	5,60 g/L H ₂ SO ₄	3,73	6 mg/L	14 mg/L	0,15 g/L ac. acetico
LSA SC Inoculo tradizionale	12,83 % vol	0 g/L	6,10 g/L H ₂ SO ₄	3,63	8 mg/L	16 mg/L	0,28 g/L ac. acetico

TABELLA 3. Analisi standard dei vini Viognier fermentati con lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* in funzione del processo di produzione applicato.

I risultati mostrano che a seconda del processo di produzione applicato ad un medesimo ceppo di lievito si può modificare la vitalità, così come le capacità di moltiplicazione. Il LSA TD2 si è rivelato come il prodotto più performante in confronto con LSA TD1. Degna di nota è la capacità di *Torulasporea delbrueckii* 291 di moltiplicarsi bene anche in condizioni di carenza di micronutrienti e fattori di sopravvivenza dovute alla scarsa torbidità del mosto.

La vitalità del ceppo è importante per effettuare una pressione ecologica sui lieviti indigeni e permettere una buona impiantazione, ma la capacità di moltiplicazione è ugualmente essenziale tenendo conto che è durante la fase di moltiplicazione che sono sintetizzati i principali aromi fermentativi. E' stato già dimostrato che per contribuire al profilo sensoriale dei vini è necessario che i lieviti non-*Saccharomyces* raggiungano una popolazione elevata, dell'ordine di 10⁶ - 10⁷ cellule per millilitro (Heard e Fleet, 1986).

L'adeguamento dei processi di produzione, permette oggi di avere lieviti non-*Saccharomyces* in forma secca che rispondano alle esigenze di vitalità e capacità di moltiplicazione in modo affidabile al pari dei *Saccharomyces cerevisiae*.

La diminuzione dell'acidità volatile ottenuta con l'impiego sequenziale, così come l'assenza di zuccheri residui sono analogamente conformi alle esigenze dell'enologo (Tab. 3).

2.1 STRATEGIE D'UTILIZZO DI *TORULASPORA DELBRUECKII* 291 IN INOCULO SEQUENZIALE CON *S. CEREVISIAE*

Si è concordi nel ritenere che l'utilizzo di un lievito non-*Saccharomyces* in monocultura non permetta una corretta e sicura conclusione della fermentazione (zuccheri residui < 2 g/L) entro dei tempi compatibili con le esigenze di produttive, garantendo nel contempo l'assenza di difetti organolettici. In condizioni enologiche, queste specie hanno capacità fermentative limitate se comparate ai lieviti *Saccharomyces* (Mauricio *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 2001) che grazie alla loro estrema adattabilità alle condizioni ostili riescono a crescere ed a soppiantare i lieviti indigeni non-*Saccharomyces* (Fleet, 1993).

In letteratura è ampiamente riportato come la successione delle popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* nella prima fase seguiti dai *Saccharomyces* sia favorevole alla complessità aromatica dei vini (Zironi *et al.*, 1993, Ferraro *et al.*, 2000, Languet *et al.*, 2005).

La successione delle popolazioni di lieviti come quella ottenuta con *Torulaspota delbrueckii* TD 291 seguita poi da un *S. cerevisiae* va esattamente nella direzione di ottenere un profilo sensoriale più complesso.

Una parte del lavoro preliminare si è incentrata sulla scelta del ceppo di *Saccharomyces* che mostrasse la migliore compatibilità con *Torulaspota delbrueckii* 291 nell'inoculo sequenziale, su molteplici varietà e in diverse condizioni di fermentazione. Tra i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* testati, un ceppo si è dimostrato compatibile con *Torulaspota* per ottenere vini con un profilo aromatico peculiare.

L'inoculo sequenziale si è dimostrata una pratica essenziale affinché *Torulaspota* possa esprimere le sue singolari caratteristiche nel vino finale. La figura 2 mostra come in tre miscele di lieviti non-*Saccharomyces* + *Saccharomyces* non si sia ottenuta la dominanza delle popolazioni "non convenzionali". In questi casi, la specie *Saccharomyces cerevisiae* è largamente maggioritaria già al momento dell'inoculo nel mosto.

All'opposto, con l'inoculo di *Torulaspota* da sola, ad inizio fermentazione, si osserva la dominanza totale del non-*Saccharomyces* inoculato. Questo sviluppo molto elevato è possibile grazie alla buona vitalità del lievito d'avviamento.

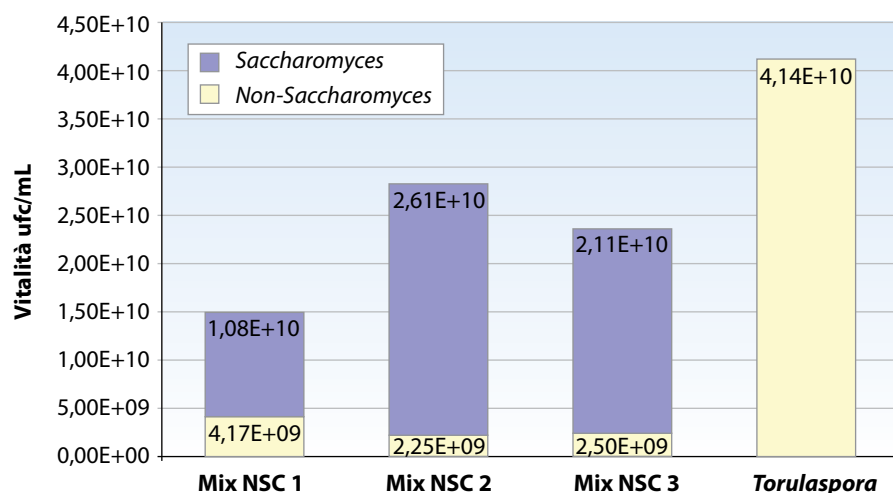


FIGURA 2. Vitalità dei lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* in funzione dello starter inoculato.

Indipendentemente dalla famiglia di composti aromatici considerati, le analisi mostrano concentrazioni finali nei vini significativamente superiori quando la fermentazione è svolta secondo il protocollo di inoculo sequenziale *Torulaspota-Saccharomyces* (Fig. 3a, 3b e 3c).

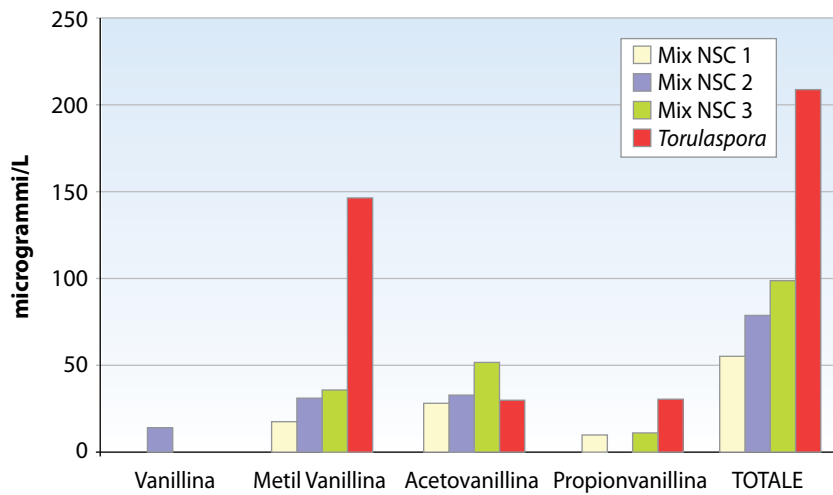


FIGURA 3A. Tenore in derivati della vanillina.

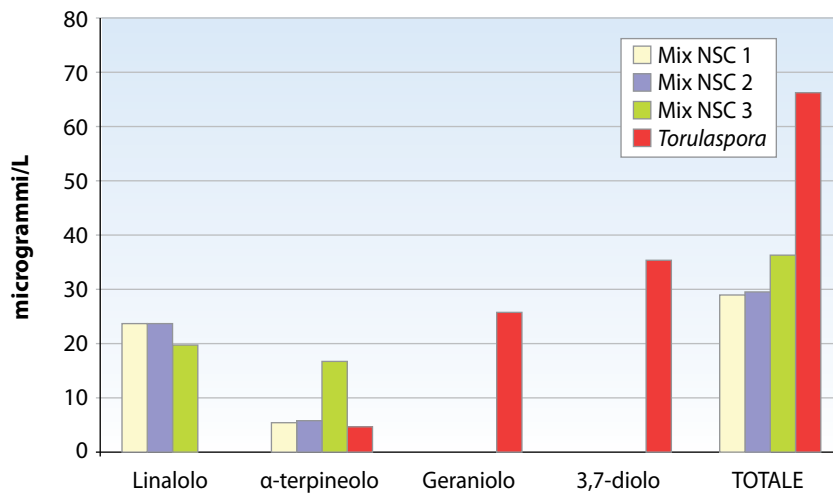


FIGURA 3B. Concentrazione dei terpeni

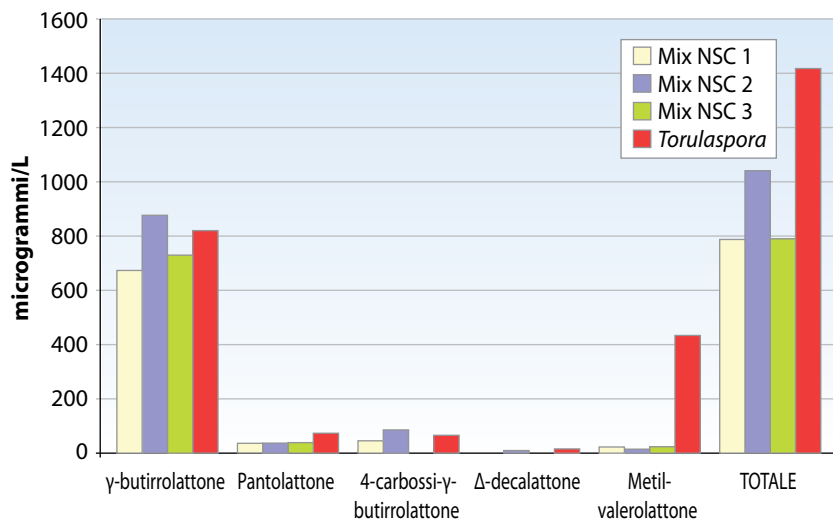


FIGURA 3C. Concentrazione dei lattoni.

2.2 ANDAMENTO DELLA CINETICA FERMENTATIVA IN MODALITÀ SEQUENZIALE.

In un mosto sintetico codificato con la sigla “MS300-FA-O2 GF” assente in fattori di sopravvivenza (steroli) sono stati confrontate le cinetiche fermentative tra l’inoculo sequenziale con lieviti secchi attivi *Torulaspora-Saccharomyces* e un lievito secco *Saccharomyces*.

Le velocità di fermentazione in funzione del tempo è riportata in figura 4. Le analisi dei vini ottenuti sono riportate in tabella 4.

Parametro	Alcol potenziale	Glucosio + Fruttosio	Acidità totale	pH	SO ₂ libera	SO ₂ totale	Acidità volatile
<i>Torulaspora</i> + <i>Saccharomyces</i> Inoculo sequenziale	12,09 % vol	0 g/L	7,67 g/L H ₂ SO ₄	3,53	5 mg/L	25 mg/L	0,40 g/L ac. acetico
<i>Saccharomyces</i> Inoculo tradizionale	12,13 % vol	0,1 g/L	8,35 g/L H ₂ SO ₄	3,45	5 mg/L	25 mg/L	0,97 g/L ac. acetico

TABELLA 4. Analisi vini sintetici MS300-FA-O2 GF (glucosio + fruttosio iniziali 200 g/L).

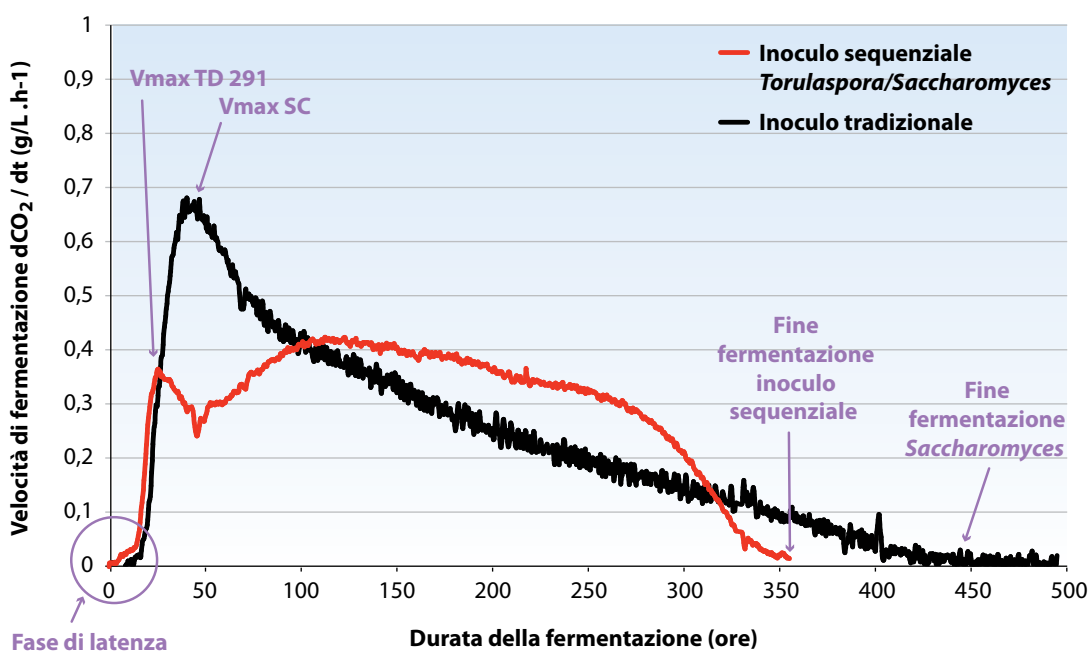


FIGURA 4. Cinetica di fermentazione dell’inoculo sequenziale e dell’inoculo classico in un mosto carente in fattori di sopravvivenza.

Le cinetiche di fermentazione ottenute mostrano che la fase di latenza è estremamente breve in entrambi i casi. La velocità massima di fermentazione (V_{max}) è meno elevata nel caso della modalità “inoculo sequenziale”, ma è pressoché costante in fase stazionaria con un finale di fermentazione più rapido del testimone. L’assenza di picchi fermentativi permette anche di limitare l’aumento di temperatura che spesso accompagna la fermentazione alcolica.

Le analisi ottenute evidenziano una diminuzione dell’acidità volatile, in questo caso, particolarmente significativa.

2.3 RISULTATI PROMETTENTI PER LA DIMINUZIONE DELL'ACIDITÀ VOLATILE

Vista l'elevata tolleranza allo stress osmotico di *Torulasporea*, sono state svolte alcune prove d'inoculo sequenziale per facilitare la fermentazione dei mosti di uve da vendemmie tardive. Questo procedimento sarebbe particolarmente utile non solo per il miglioramento del profilo aromatico del vino, ma anche per la diminuzione dell'acidità volatile, un problema frequentemente associato a questo tipo di fermentazioni. In effetti, in occasione di una serie di prove effettuate a Sauternes in Francia, su un mosto di Sémillon con gradazione alcolica potenziale di 21,4% vol., il livello di acidità volatile del lotto con inoculo sequenziale era dimezzato rispetto al lotto inoculato in maniera tradizionale (0,40 rispetto a 0,85 g/L in acido acetico).

3. Contributo sensoriale di *Torulasporea delbrueckii* in fermentazione sequenziale

Nel corso di una prova svolta su Chardonnay (Tab. 5) in un'azienda viticola nella regione a denominazione controllata Mâcon Village, in Francia, sono state riscontrate differenze molto contenute a livello di cinetica di fermentazione alcolica tra l'inoculo classico con un LSA *Saccharomyces cerevisiae* e l'inoculo sequenziale con *Torulasporea* 291 e *Saccharomyces* (Fig. 5).

Alcol potenziale	Glucosio + Fruttosio	Acidità totale	pH	SO ₂ totale	Acido malico	Azoto assimilabile	Torbidità	Acidità volatile
12,0 % vol	202 g/L	6,84 g/L H ₂ SO ₄	3,26	39 mg/L	6,6 g/L	275 mg/L	62 NTU	0 g/L ac. acetico

TABELLA 5. Caratteristiche del mosto Chardonnay.

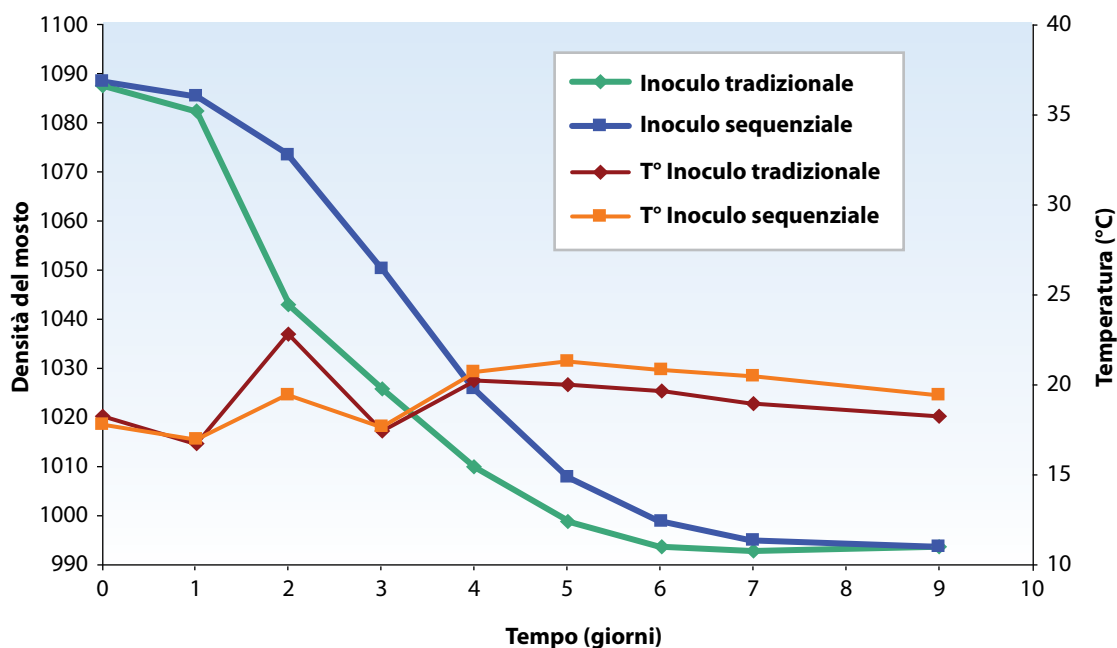


FIGURA 5. Cinetica di fermentazione e temperatura con inoculo sequenziale e inoculo classico in un mosto Chardonnay.

Tuttavia, dall'analisi dei composti aromatici sono emerse differenze significative (Fig. 6a e 6b).

A fine fermentazione alcolica (FA), i tenori in alcuni composti fermentativi che intensificano la percezione fruttata (esteri etilici), erano significativamente più elevati nel vino oggetto della prova (trattato con inoculo sequenziale) che nel vino testimone.

Lo stesso vale per i valori di linalolo (limone e rosa) e il 2-feniletanolo (note floreali), che erano maggiori nel lotto fermentato con inoculo sequenziale dei due lieviti. Viceversa, nello stesso vino si riscontrava una concentrazione inferiore in acetato di isoamile, composto fermentativo riconducibile alla nota di banana, sentore spesso ritenuto omologante nei vini bianchi.

Queste differenze si sono mantenute stabili anche dopo il termine della fermentazione malolattica (Fig. 7a e 7b).

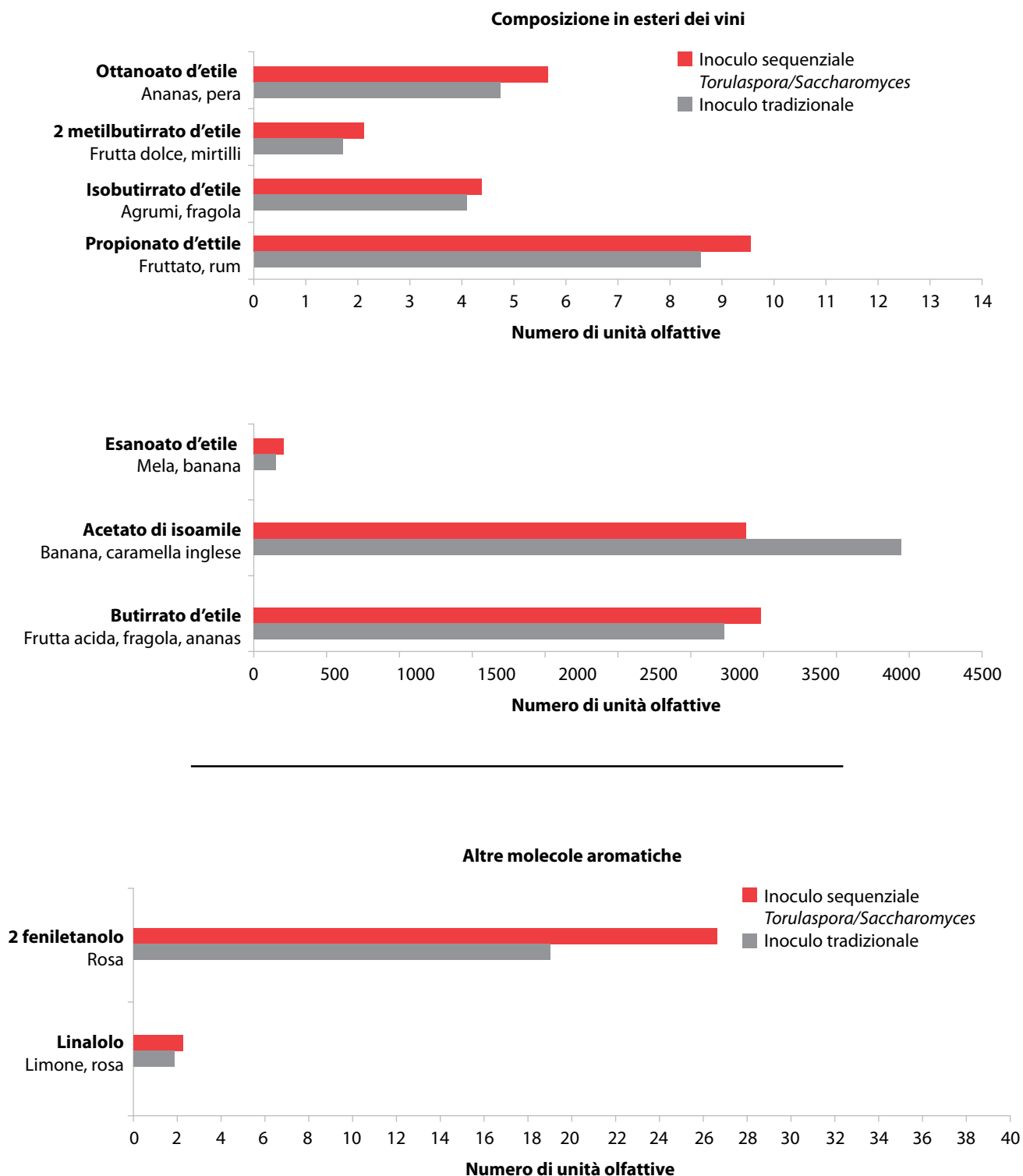


FIGURE 6a E 6b. Chardonnay - numero di unità olfattive (rapporto concentrazione/soglia di percezione) per differenti molecole aromatiche nelle due modalità di inoculo. Analisi al termine della fermentazione alcolica.

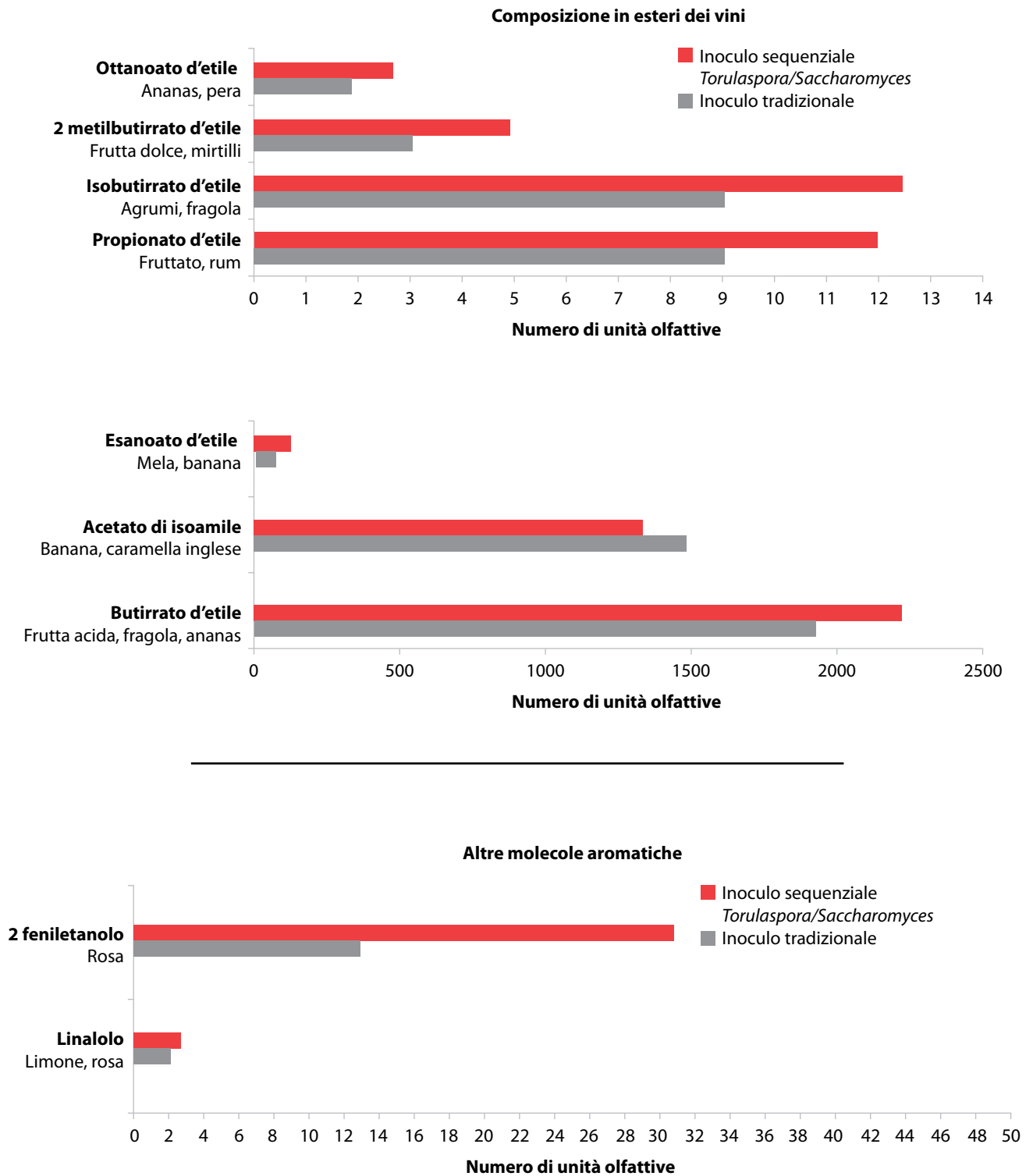


FIGURE 7a E 7b. Chardonnay - numero di unità olfattive (rapporto concentrazione/soglia di percezione) per differenti molecole aromatiche nelle due modalità di inoculo. Analisi al termine della fermentazione malolattica.

Al termine della fermentazione alcolica, un panel di esperti ha espresso una preferenza netta per il vino trattato con inoculo sequenziale (Fig. 8), affermando che la sua complessità aromatica era superiore a quella del vino testimone. Secondo alcuni membri del panel, il vino ottenuto con l'inoculo sequenziale presentava note aromatiche positive di "pasticceria", non riscontrate nel vino testimone. In effetti, da evidenze sperimentali, questo descrittore è stato più volte associato all'utilizzo di *Torulaspora delbrueckii* 291 in modalità sequenziale.

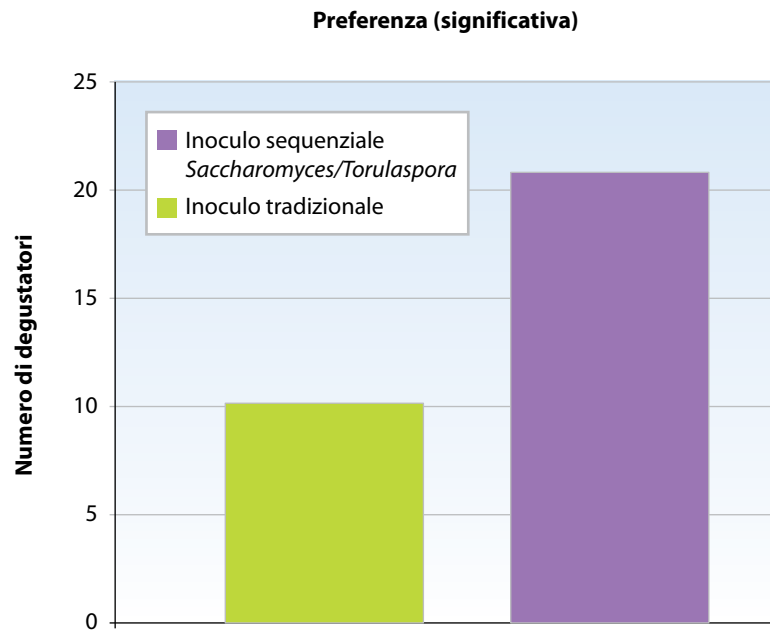


FIGURA 8. Valutazione comparativa dei due vini da parte di un panel di esperti dopo la FA.

Al termine della FML una giuria di consumatori non professionisti ha espresso la stesso tipo di preferenza. In particolare, all'analisi sensoriale descrittiva, il vino ottenuto con inoculo sequenziale è stato descritto come più complesso aromaticamente, senza per altro essere meno intenso. È interessante constatare che anche una parte dei consumatori ha evidenziato la presenza della nota aromatica "pasticceria", mentre nessuno l'ha avvertita nel vino testimone (Fig. 9a e 9b).

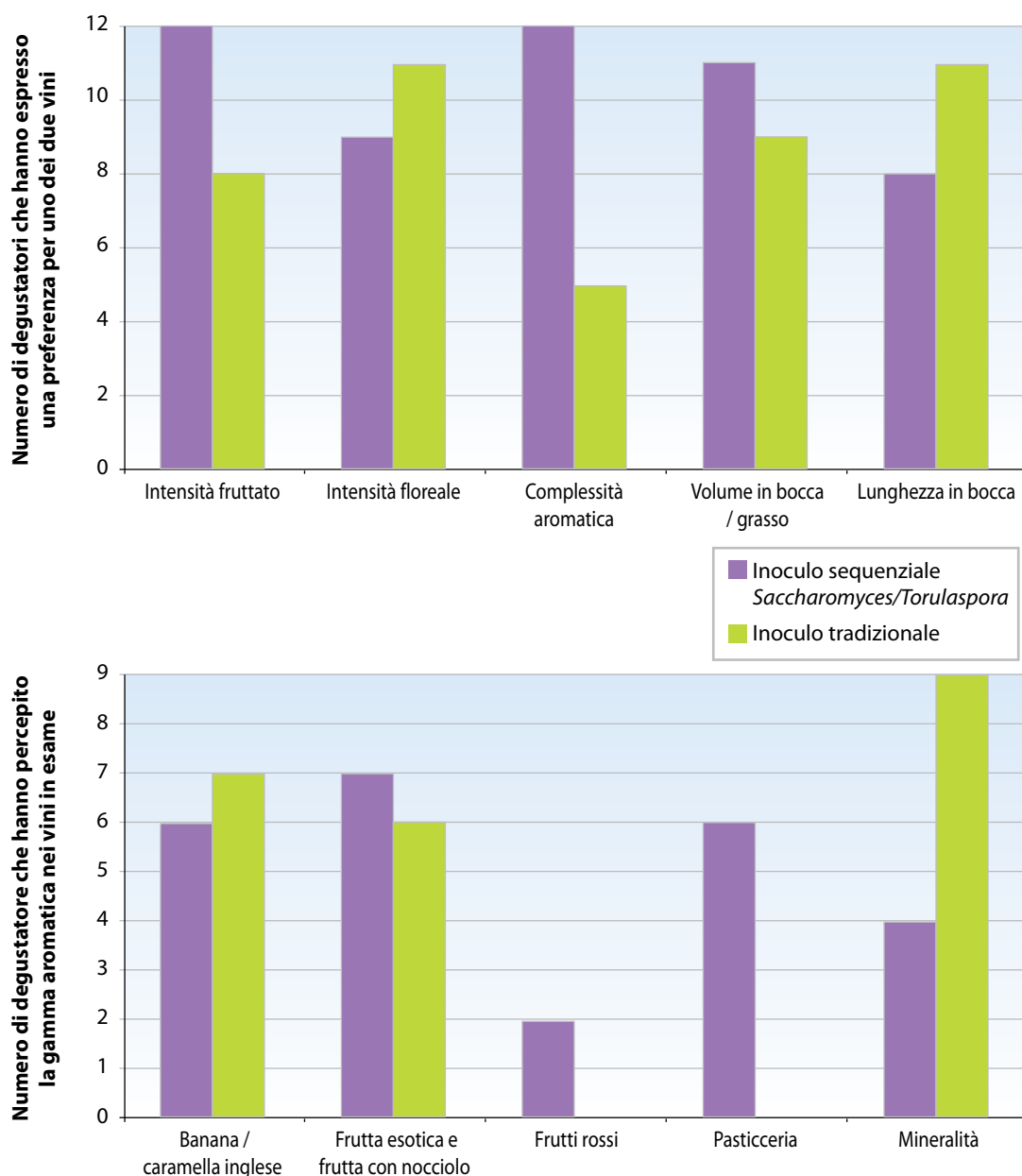


FIGURE 9A E 9B. Risultato dell'analisi sensoriale descrittiva realizzata da una giuria di consumatori non professionisti.

Conclusioni

La messa a punto di una coppia di lieviti *Torulaspora* 291-*Saccharomyces* impiegati in inoculo sequenziale, era lo scopo del presente lavoro.

5 anni di ricerca a livello di laboratorio e di prove in cantina hanno confermato come la successione e la sinergia tra queste due specie di lievito, analoga a quello che si osserva nei sistemi fermentativi spontanei, aumenti la complessità e l'intensità aromatica dei vini.

L'applicazione in inoculo sequenziale (prima *Torulaspora*, poi dopo la caduta di 10-15 punti di densità, *Saccharomyces*) permette di sfruttare le potenzialità di *Torulaspora delbrueckii* 291 assicurando un finale di fermentazione sicuro con il totale esaurimento degli zuccheri.

Grazie all'ottimizzazione del processo produttivo, è ora possibile avere queste due specie di lievito separatamente, in forma secca attiva.

L'impiego di un lievito d'avviamento non-*Saccharomyces* da solo nel mosto, con un tasso di sopravvivenza elevato durante tutta la prima fase della fermentazione, permette di riprodurre la successione delle popolazioni di lieviti tipica delle fermentazioni naturali con sicurezza ed efficacia.

BIBLIOGRAFIA

ANFANG, N., M. BRAJKOVICH, M. R. GODDARD. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15(1):1-8.

BELY, M., P. STOECKLE, I. MASNEUF-POMARED, D. DUBOURDIEU. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122:312-320.

BELANCIC, A., Z. GÜNATA, M. J. VALLIER, E. AGOSIN. 2003. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriji*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 51:1453-1459.

BOHLSCHIED, J., G. SPECHT, A. ORTIZ-JULIEN, J. MALONEY, B. BERTHEAU, C. ROSS, C. EDWARDS. 2007. Application of a new yeast preparation for problem grape musts. *Journal of Wine Research* 18(3):173-185.

GARCIA, A., C. CARCEL, L. DULAU, A. SAMSON, E. AGUERA, E. AGOSIN, Z. GÜNATA. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J. Food Sci.* 67:1138-1143.

CHARENCHAI, C., G. H. FLEET, P. A. HENSCHKE, B. TODD. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3:2-8.

CIANI, M., G. PICCIOTTI. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotech. Letters* 17:1247-1250.

CIANI, M., L. FERRARO, F. FATICHENTI. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Env. Microbiol.* 62:128-132.

CIANI, M. 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 1:317-331.

CIANI, M., L. FERRARO. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:247-254.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M., L. MINGORANCE-CAZORLA, S. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, F. J. LAS HERAS-VÁZQUEZ, T. F. RODRÍGUEZ-VICO. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98(3):301-308.

COMITINI, F., N. DI PIETRO, L. ZACCHI, I. MANNAZZU, M. CIANI. 2004A. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology* 150:2535-2541.

COMITINI, F., J. DE INGENIIS, L. PEPE, I. MANNAZZU, M. CIANI. 2004B. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera* / *Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:235-240.

DAVENPORT, R. R., 1974. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 13:123-30.

DE INGENIIS, J., N. RAFFAELLI, M. CIANI, I. MANNAZZU. 2009. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1129-1134.

EGLI, C. M., W. D. EDINGER, C. MITRAKUL, T. HENICK-KLING. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85:779-789.

- ETIEVANT, P., 1991.** Wine. In: *Volatile compounds in food and beverages*, ed. H. Maarse. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 483-546.
- FERRARO, L., F. FATICHENTI, M. CIANI. 2000.** Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Bioch.* 35:1125-1129.
- FLEET, G. H., G. M. HEARD. 1993.** Yeasts: Growth during fermentation. In: G. H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, 27-54.
- GANGA, M. A., C. MARTÍNEZ. 2004.** Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:76-83.
- HANSEN, E. H., P. NISSEN, P. SOMMER, J. C. NIELSEN, N. AMEBORG. 2001.** The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Applied Microbiology* 91:541-547.
- HEARD, G.M., G. H. FLEET. 1986.** Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.* 38:22-25.
- HIERRO, N., B. ESTEVE-ZARZOSO, A. GONZÁLEZ, A. MAS, J. M. GUILLAMÓN. 2006.** Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11):7148-7155.
- LAMBRECHTS, M. G., I. S. PRETORIUS. 2000.** Yeast and its importance to wine aroma review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21:97-129.
- LANGUET, P., A. ORTIZ-JULIEN, E. AGUERA, A. SAMSON, J. M. SALMON. 2005.** Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des Œnologues* 117:31-33.
- LOISEAU, G., F. VEZINHET, M. VALADE, A. VERTES, C. CUINIER, D. DELTEIL. 1987.** Contrôle de l'efficacité du levurage par la mise en œuvre de souches de levures œnologiques marquées. *Revue française d'œnologie* 106:29-36.
- MARTINEZ, J., F. TOLEDANO, C. MILLÁN, J. M. ORTEGA. 1990.** Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food microbiology* 7:217-225.
- MARTÍNEZ, C., C. GERTOSIO, A. LABBE, R. PÉREZ, A. GANGA. 2006.** Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(4):407-411.
- MAURICIO, J. C, S. GUIJO, J. M. ORTEGA. 1991.** Relationship between phospholipids and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(4):301-308.
- MORA, J., J. I. BARBA, A. MULET. 1990.** Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(2):156-159.
- MORENO, J. J., C. MILLÁN, J. M. ORTEGA, M. MEDINA. 1991.** Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7(3):181-190.
- MORTIMER, R., M. POLSINELLI. 1999.** On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150(3):199-204.
- PLATA, C., C. MILLÁN. J. C. MAURICIO, J. M. ORTEGA. 2002.** Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20(2):217-224.
- RENAULT, P., C. MIOT-SERTIER, P. MARULLO, P. HERNÁNDEZ-ORTE, L. LAGARRIGUE, A. LONVAUD-FUNEL, M. BELY. 2009.** Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal of Food and Microbiology* 134(3):201-210.
- ROJAS, V., J. V. GIL, F. PIÑAGA, P. MANZANARES. 2003.** Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food and Microbiology* 86(1-2):181-188.

- ROMANO, P., C. FIORE, M. PARAGGIO, M. CARUSO, A. CAPECE. 2003.** Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food and Microbiology* 86(1-2):169-180.
- ROSI, I., M. VINELLA, P. DOMIZIO. 1994.** Characterization of β -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77(5):519-527.
- SODEN, A., I. L. FRANCIS, H. OAKLEY, P. A. HENSCHKE. 2000.** Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of chardonnay wine. *Austr. J. Grape Wine Res.*, 6(1):21-30.
- TORIJA, M. J., N. ROZÈS, M. POBLET, J. M. GUILLAMÓN, A. MAS. 2001.** Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4):345-352.
- VIANA, F., J. V. GIL, S. GENOVÉS, S. VALLÉS, P. MANZANARES. 2008.** Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25(6):778-785.
- VIANA, F., J. V. GIL, S. VALLÉS, P. MANZANARES. 2009.** Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 135(1):68-74.
- ZIRONI, R., P. ROMANO, G. SUZZI, F. BATTISTUTTA, G. COMI. 1993.** Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters* 15:235-238.
- ZOTT, K., C. MIOT-SERTIER, O. CLAISSE, A. LONVAUD-FUNEL, I. MASNEUF-POMAREDE. 2008.** Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125(2):197-203.