



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**Strategie di biocontrollo e uso di lieviti selezionati per la
riduzione di solfiti nei vini**
**Biocontrol of winemaking process by *Metschnikowia
pulcherrima***

Tesi di Laurea Magistrale di: **Silvia Rinaldi**

Prof. Chiar.mo Prof.: **Maurizio Ciani**

Correlatore: **Dott.ssa Laura Canonico**

Secondo correlatore: **Dott. Edoardo Galli**

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

CAPITOLO1:INTRODUZIONE.....	5
1. Processo di vinificazione.....	5
1.1. Raccolta delle uve.....	5
1.2. Pigiatura e diraspatura	6
1.3. Macerazione.....	7
1.4. Chiarificazione.....	7
1.5. fermentazione alcolica.....	8
1.5.1. Biochimismo della fermentazione alcolica.....	10
1.6. Microflora dell’uva.....	11
1.7. Lieviti di interesse enologico.....	11
1.7.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	13
1.7.2. <i>Lieviti Non-Saccharomyces di interesse vinario</i>.....	15
1.8. Fermentazioni miste.....	16
1.8.1 <i>Torulaspora delbrueckii</i>.....	17
1.8.2. <i>Lachancea thermotolerans</i>.....	18
1.8.3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.....	19
1.8.4. <i>Pichia spp</i>.....	20
1.8.5. <i>Starmerella bacillaris</i>.....	21
1.8.6. <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i>.....	22
1.8.7. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>.....	23
1.9 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> come Bio-tool.....	25
1.10 Microrganismi alterativi del vino.....	25
1.11 Anidride solforosa come antimicrobico.....	27
1.12. Normative europee sull’uso della SO2.....	30
1.13 Problemi legati alla SO2.....	30
1.14. Metodi alternativi per il controllo dell’attività spoilage.....	31
1.14.1. I diversi fenotipi.....	32

1.14.2 Tossine killer.....	32
CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO.....	33
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....	35
3.1. Prima parte: Trattamenti in campo.....	35
3.2. PARTE 2: Lieviti utilizzati per l'allestimento delle fermentazioni.....	41
3.3. Monitoraggio delle fermentazioni.....	44
3.4. Analisi microbiologiche.....	44
3.5. Terreni di coltura.....	46
3.6. Analisi acidità Totale.....	50
3.7. Alcoli superiori.....	50
3.8. Determinazione dei composti volatili con tecnica SPME.....	51
3.9. Etanolo.....	52
3.10. Acidità volatile.....	53
3.11. Determinazione della solforosa.....	54
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	55
4.1. Valutazione popolazione microbica dopo trattamento con acqua ozonata e IDROVITIS.....	55
4.2. Effetto di <i>M. pulcherrima</i> su <i>H. uvarum</i>	58
4.3. Effetto di <i>M. Pulcherrima</i> su <i>Saccharomyces</i> selvaggi.....	61
4.4. Evoluzione della popolazione microbica.....	62
4.5. Cinetica fermentativa.....	68
4.6. Evoluzione dei principali composti secondari e volatili.....	69
4.7. Acidità totale, acidità volatile, pH, SO ₂ e Acido Malico.....	71

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....76

CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA.....80

CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE

1. Processo di vinificazione

1.1. Raccolta delle uve

Per ottenere vini bianchi l'uva deve essere in piena maturazione, in quanto la gradazione minima richiesta per tali prodotti è del 10% v/v, che si traduce in 170 g di zucchero per litro di mosto prima della fermentazione e suppone 9,5 gradi Baumè nell'uva.

La vendemmia inizia quando le uve raggiungono determinate caratteristiche, quali quantità di zucchero e acidità dell'uva.

La quantità di zucchero presente nell'uva determina la gradazione alcolica del vino che si otterrà mentre l'acidità diminuisce al maturare dell'uva.

La raccolta delle uve deve essere effettuata con la massima accuratezza e rapidità possibile, sia che venga effettuata a mano o in modo meccanizzato.

Durante la raccolta è importante riuscire ad evitare la rottura degli acini prevenendo così l'inizio di una fermentazione alcolica non controllata che può portare alla produzione di vini con difetti.

L'uva viene trasferita nel più breve tempo possibile in cantina, dove al momento dell'arrivo, i frutti vengono pesati e viene eseguita una procedura di campionamento per l'analisi.

Tale analisi prevede che venga effettuato il prelievo del campione con un braccio meccanico che preleva una porzione di una pesata, che viene spremuta e inviata tramite un condotto in un rifrattometro.

Le determinazioni analitiche minime sono focalizzate sulla quantità di zuccheri, il pH e l'acidità totale, differenziando la varietà e il tipo di uve.

Se l'uva soddisfa tali requisiti minimi si continua con lo scarico della stessa.

A questo punto in alcune tipologie di vinificazione l'uva passa un giorno in celle frigorifere ad una temperatura di circa 10°C per garantire una buona conservazione delle caratteristiche aromatiche. ("Influence of grape harvesting time on wine quality", 2013).

1.2. Pigiatura e diraspatura

L'uva arriva alla tramoggia di ricezione dove iniziano una serie di operazioni meccaniche prima della fermentazione. Le attrezzature che eseguono ciascuna di queste operazioni sono collegate in linea.

In primo luogo l'uva passa attraverso un nastro di selezione dove gli operatori scartano i grappoli danneggiati e da qui passano alla diraspatura, che è il processo attraverso il quale si separano gli acini dal raspo. La macchina è costituita da un cilindro con fori dove al suo interno le uve vengono mosse da pale e come risultato si ha la separazione del raspo che viene aspirato e allontanato in un contenitore.

Dopo la diraspatura si procede con la pigiatura delle uve.

Questa operazione consiste nel far passare le uve, su rulli regolabili che rompono la buccia liberando così il succo e la polpa. Negli anni passati la pigiatura si realizzava con il calpestio del frutto, in questo modo si rompeva l'uva senza rompere i semi o i raspi.

Per le pigiatrici attuali si evita rottura dei semi regolando la separazione tra i rulli.

È opportuno che i semi non si rompano per non dare un sapore o un odore indesiderato al prodotto finale.

Il pigiato ottenuto è diretto mediante pompa di azionamento verso la macerazione. (P. Ribèreau-Gayon-B, Edagricole 2007).

1.3. Macerazione

La miscela di succo e di uve si lascia riposare, così attraverso un processo di pressatura naturale che avviene grazie al proprio peso, si ottiene il primo mosto noto come "mosto fiore", considerato di ottima qualità. Il mosto è prelevato dalla parte inferiore dei serbatoi e viene diretto verso i serbatoi di colata, per poi convogliare la pasta risultante con pompe peristaltiche verso la pressa per ottenere il mosto rimanente mediante pressatura.

Le presse più utilizzate oggi sono quelle pneumatiche, in quanto consentono di graduare i diversi livelli di pressatura ottenendo mosti di migliore qualità.

L'obiettivo fondamentale della pressatura è di ottenere la maggior quantità di mosto possibile. Il mosto fiore e quello proveniente dalle prime pressature sono utilizzati per la produzione di vini bianchi e liquorosi (fini e odorosi); mentre il mosto delle ultime pressioni è usato per ottenere vini di minore qualità. (P.Ribèreau-Gayon-B, Edagricole 2007)

1.4. Chiarificazione

Si procede poi alla chiarificazione, che consiste nell'eliminazione delle particelle solide sospese nel mosto. Queste particelle precipitano per gravità quando il mosto è a riposo e la fase solida si accumula nel fondo del serbatoio, dove a causa della sua forma conica, sarà separata con facilità dalla parte liquida.

La chiarifica può essere fatta in modo statico dove le particelle sedimentano per gravità, o meccanicamente, applicando una forza centrifuga che separa la fase solida da quella liquida.

Si evita l'inizio della fermentazione mediante raffreddamento del mosto al di sotto di 10°C e/o tramite solfitazione con anidride solforosa per proteggere il mosto dall'ossidazione.

Inoltre l'anidride solforosa è un agente antimicrobico quindi garantisce che i lieviti più sensibili non diano luogo a fermentazioni spontanee che potrebbero portare alla produzione di

vini con difetti analitici e sensoriali.

Prima della fase di fermentazione il mosto può essere corretto se le concentrazioni dei composti presenti nel mosto non sono a livello ottimale. La causa del non raggiungimento di tali livelli ottimali è principalmente dovuta ad una maturazione dell'uva non adeguata o a un loro stato sanitario carente.

Le correzioni del mosto più comuni sono relative all'acidità e il piede di vasca.

Nei vini bianchi l'acidità deve essere corretta quando il pH è superiore a 3.4.

L'eventuale correzione viene effettuata subito dopo la macerazione; a tal fine si preleva una quantità di mosto sufficiente a dissolvere la dose di acido per poi versarla nel fermentatore.

Il piede di vasca è un'altra operazione pre-fermentativa che si effettua per assicurare il corretto adattamento al mosto dei lieviti selezionati delle colture starter.

Inizialmente i lieviti vengono inoculati in una piccola quantità di mosto ad una temperatura di 30°C e si lascia che comincino a fermentare. Quando lo zucchero del mosto è finito, si aggiunge un volume maggiore di mosto fresco e così in successive aggiunte fino a passare al fermentatore, in questo modo i lieviti selezionati domineranno rispetto a quelli selvaggi. (P.-Ribèreau-Gayon-B, Edagricole 2007)

1.5. Fermentazione alcolica

Questa fase è la più importante del processo di vinificazione.

Consiste nella trasformazione degli zuccheri esosi (glucosio o fruttosio) contenuti nell'uva, in alcole etilico e anidride carbonica, liberando calore. Può essere spiegato in quattro fasi:

- 1 I lieviti si adattano al mosto che contiene una grande quantità di zucchero, al pH dello stesso, ecc. Fermentazione in fase iniziale.
- 2 I lieviti si moltiplicano. La fermentazione accelera.
- 3 Fase stazionaria in cui non si ha un incremento del tenore di lieviti.

4 Il contenuto di zucchero diminuisce e aumenta il tenore alcolico, i lieviti muoiono e la fermentazione rallenta.

Quando la fermentazione termina, il liquido perde torbidità e le cellule morte creano dei depositi che sono separati per decantazione.

La fermentazione termina quando tutti gli zuccheri contenuti nel mosto vengono esauriti.

I lieviti richiedono condizioni favorevoli nel mosto per il loro sviluppo ottimale. La variazione di tali condizioni provocherà una variazione della fermentazione o di una sosta fermentativa rovinando il prodotto finale.

I fattori che influenzano la crescita dei lieviti sono:

- Zucchero: La concentrazione di zucchero in un mosto è generalmente di 170-220 g/L che equivale ad una graduazione finale compresa tra 10 e 13% v/v. In questo intervallo la concentrazione di zucchero è ottimale per il metabolismo dei lieviti.
- Sostanze azotate: possono essere suddivise in azoto ammoniacale, aminoacidi e peptidi. L'azoto è un nutriente necessario nelle prime fasi di fermentazione. La loro scarsità fa aumentare le possibilità di arresto fermentativo; invece il loro eccesso può portare il vino a non raggiungere una buona qualità olfattiva.

Il tenore di azoto ottimale nel mosto è compreso tra 150 e 300 mg/l.

- Temperatura: la velocità o intensità della fermentazione è funzione della temperatura. Un aumento di 1°C può fare consumare il 10% in più di zuccheri.

La temperatura ottimale per la fermentazione in bianco è 18°C.

A questa temperatura la conversione di zucchero in etanolo è massima e si producono meno prodotti indesiderabili. Inoltre, contribuisce a mantenere i composti aromatici esistenti e crearne di nuovi che migliorano l'aroma finale del vino.

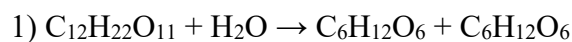
La fermentazione è un processo esotermico, per 100 g di zucchero fermentato viene ceduto al mosto l'equivalente di 14.1 kcal, questa quota energetica contribuisce ad aumentare la temperatura, pertanto è necessario utilizzare serbatoi a temperatura controllata.

I controlli periodici da effettuare durante la fermentazione sono di determinazione della densità, che indica l'evoluzione della formazione di alcool e di temperatura almeno due volte al giorno, mattina e sera. La densità iniziale deve essere di 1.10 g/ml e arrivare a 0.99g/mL.

(Lambrechts & Pretorius, 2000).

1.5.1. Biochimismo della fermentazione alcolica

La fermentazione alcolica si svolge in due fasi distinte. Nella prima fase si ha la scissione degli zuccheri complessi. I disaccaridi come il saccarosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$) vengono scissi dall'enzima *invertasi* formando glucosio e fruttosio.



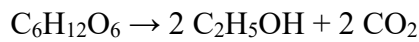
Nella seconda fase della fermentazione alcolica che rappresenta un punto chiave del processo fermentativo, a partire da zuccheri semplici come glucosio e fruttosio, ha luogo la glicolisi che permette la formazione di due molecole di piruvato oltre ad altri composti.



Questi prodotti vengono successivamente decarbossilati ad acetaldeide da parte dell'enzima *Piruvato Decarbossilasi* che libera anidride carbonica (CO_2).

Infine, grazie all'azione dell'enzima *Alcol Deidrogenasi*, l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo e il NADH viene ossidato a NAD^+ .

L'equazione che sintetizza la reazione chimica della fermentazione alcolica è la seguente:



Mentre questa reazione generale prende forma, si svolgono molti altri processi biochimici, chimici e fisico-chimici, che permettono di trasformare il succo d'uva in vino. Oltre all'etanolo molti composti sono prodotti durante la fermentazione alcolica, come gli alcoli superiori, gli esteri, il glicerolo, l'acido succinico, il diacetile, l'acetoino e il 2,3-butanediolo.

(Nord F. F., 1939)

1.6. Microflora dell'uva

La superficie della bacca dell'uva è caratterizzata da una vasta popolazione microbica influenzata da diversi fattori quali grado di maturazione, cambiamenti di temperatura, umidità e radiazioni UV, limitazioni nutritive e l'applicazione di trattamenti agrochimici.

Le uve mature sono caratterizzate da concentrazioni microbiche di 10^4 - 10^6 CFU/g che consistono principalmente da lieviti e varie specie di batteri lattici e acetici (Graham H, 2003).

Per quanto riguarda i lieviti, i lieviti basidiomiceti ossidativi senza alcun interesse enologico, come *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Filobasidium spp.* e *Aureobasidium pullulans* sono prevalenti nell'ambiente del vigneto (suolo, corteccia, foglie, uva). Tra gli ascomiceti, i lieviti fermentativi apiculati (*Hanseniaspora uvarum* [teleomorfo] *Kloeckera apiculata* [anamorfo]) e lieviti ossidativi (principalmente il genere *Candida*, *Pichia* e *Metschnikowia*) sono predominanti su uve mature (Barata, A., 2008).

1.7. Lieviti di interesse enologico

I lieviti caratterizzano il vino attraverso diversi meccanismi:

- I. Utilizzando i costituenti del succo d'uva;
- II. Producendo etanolo e altri solventi che aiutano ad estrarre i componenti aromatici dalle parti solide dell'uva;
- III. Producendo enzimi che trasformano i composti neutri dell'uva in composti attivi dal punto di vista aromatico;
- IV. Producendo metaboliti secondari attivi dal punto di vista aromatico (es. acidi, alcoli, esteri, polioli, aldeidi, chetoni, composti solforati volatili);
- V. Degradazione autolitica delle cellule morte del lievito

Queste reazioni, specialmente la produzione di metaboliti secondari, variano a seconda della specie e del ceppo di lievito. Quindi, l'unicità e l'individualità del contributo aromatico dei lieviti dipende dalla specie e dal ceppo ecologico della fermentazione e dai molti fattori che determinano questa ecologia (Fleet G. H. , 2001).

La popolazione totale dei lieviti isolati dal frutto è rappresentata per il 50-75% da *Hanseniaspora uvarum* (e la sua forma anamorfa *Kloeckera apiculata*) , ed in minor parte dai generi *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula* mentre *S. cerevisiae* è scarsamente rappresentato nelle popolazioni microbiche dell'uva.

L'azione sequenziale di questi diversi generi e specie di lievito contribuisce all'aroma e al sapore dei vini determinandone la qualità.

I lieviti presenti nel mosto d'uva all'inizio della fermentazione possono essere suddivisi in due gruppi, lieviti *Saccharomyces* e lieviti non-*Saccharomyces*.

I lieviti *Saccharomyces* provengono principalmente dalle attrezzature della cantina al contrario dei lieviti non-*Saccharomyces* che si trovano prevalentemente sull'uva (Folch-Mallol 2004).

La successione dell'attività microbica durante la fermentazione è la seguente:

1. Fase di pre-fermentazione: I lieviti non-*Saccharomyces* dominano generalmente il mosto d'uva e producono precursori e composti aromatici. Questa fase può essere pericolosa per la fermentazione alcolica se questi lieviti impoveriscono il mezzo dei suoi nutrienti e producono grandi quantità di composti che sono indesiderabili.
2. Fase di fermentazione: *Saccharomyces* è dominante in quanto è la specie meglio adattata ad utilizzare gli zuccheri, allo stesso tempo produce anche aromi di fermentazione (in gran parte derivati da precursori che sono presenti nel mosto).
3. Fase di maturazione: quando i lieviti apiculati viziati cercano opportunità di crescita.

1.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

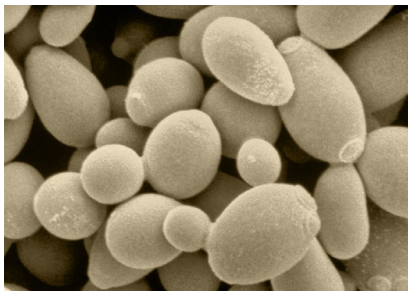


Figura 1: *Saccharomyces cerevisiae*

Il lievito *S. cerevisiae* è un fungo ascomicete ampiamente studiato per la sua importanza nell'industria della panificazione e del vino, così come per la sua capacità di produrre etanolo (Cocolin L. Et al 2004).

Alcune caratteristiche di questo lievito, derivanti del suo adattamento, sono rappresentate dal fatto di poter metabolizzare il glucosio e il fruttosio sia per via respiratoria che per via fermentativa, e di crescere in condizioni aerobiche o anaerobiche.

S. cerevisiae è la specie di lievito più importante nella microbiologia del vino.

Molti studi sono stati condotti sul comportamento e le caratteristiche biochimiche, molecolari e biotiche di *S. cerevisiae*.

Tale lievito ha una grande capacità di crescere nel mosto d'uva.

S. cerevisiae produce elevate quantità di etanolo consumando il contenuto di zucchero e abbassando il pH che inibiscono la crescita di ceppi non-*Saccharomyces* (Baratra E., 2011). Alcuni ceppi producono una tossina killer, alla quale sono immuni, che uccide lieviti sensibili di diversi generi. Questi tipi di interazioni possono determinare l'evoluzione di diverse popolazioni di lievito durante la fermentazione. A volte un ceppo killer di *S. cerevisiae* predomina alla fine del processo di fermentazione, suggerendo che l'espressione della tossina gli ha permesso di condurre parte della vinificazione. Questo fenomeno killer può essere un metodo alternativo per il controllo dei lieviti indesiderati (Maqueda M. Et al, 2012).

Le fermentazioni sono anche in gran parte guidate da inoculi di un singolo ceppo starter commerciale di *S. cerevisiae* al fine di garantire un maggiore controllo della vinificazione diminuendo così il rischio di deterioramento da parte di altri microrganismi ma ottenendo risultati più prevedibili.

I lieviti selezionati sono stati utilizzati con ottimi risultati in molti paesi, ottenendo prodotti finali di qualità più uniforme di quelli prodotti con fermentazioni spontanee (Mas A. Et al 2006).

Quando si selezionano i lieviti commerciali, bisogna tener conto delle loro proprietà e delle caratteristiche del vino da produrre, come la concentrazione di metaboliti che tollerano o di cui hanno bisogno per avviare con successo la fermentazione, o la temperatura ottimale di sviluppo: la maggior parte lo fa tra i 12 e i 36° C.

Nonostante ciò, è più efficace utilizzare colture di lievito puro che provengono dalla zona viticola in cui devono essere utilizzate, noti come lieviti locali selezionati, poiché si ritiene che i ceppi di lievito che si trovano in una microzona siano (Mas A, 2006):

- Specifico per la zona.
- Completamente adattato alle condizioni climatiche della zona.
- Completamente adattato alla materia prima, cioè il mosto da fermentare.
- Responsabile, almeno parzialmente, delle caratteristiche uniche dei vini ottenuti.

Per fare una selezione di lieviti, i criteri dipenderanno dal tipo di fermentazione, i parametri presi in considerazione possono essere quelli mostrati nella tabella seguente

Caratteristiche desiderabili	Caratteristiche indesiderate
Alta tolleranza all'etanolo	Produzione di SO ₂
Degradazione totale degli zuccheri fermentabili	Produzione di H ₂ S
Resistenza alla SO ₂	Produzione di acidità volatile
Capacità fermentativa a basse temperature e piruvato	Produzione di acetaldeide
Massima riduzione della fase di dormienza	Produzione di schiuma
Degradazione dell'acido malico	Formazione del precursore del carbammato di etile
Capacità fermentativa ad alte pressioni	Produzione di polifenolo ossidasi
Produzione di glicerolo	
Produzione di β-glucosidasi	
Fenotipo killer	

Tab. Alcune delle caratteristiche desiderabili e indesiderabili nella selezione dei lieviti per la produzione di vini di qualità.

1.7.2. Lieviti Non-Saccharomyces di interesse vinario

I lieviti non-*Saccharomyces* nella produzione del vino sono stati considerati principalmente come microrganismi causanti deterioramento. I più importanti metaboliti di deterioramento prodotti da questi lieviti sono l'acido acetico, l'acetaldeide, l'acetoino e l'acetato di etile,

insieme ad odori indesiderati come il vinile e gli etilfenoli che sono legati allo sviluppo di *Brettanomyces* / *Dekkera spp* (Ciani M. Et al, 2009).

I lieviti non-*Saccharomyces* muoiono durante le fasi iniziali della fermentazione a causa della tossicità conferita dall'aumentare della concentrazione di alcol prodotto dal metabolismo di *S. cerevisiae*.

Alcuni ceppi hanno dimostrato di poter sopravvivere durante la fase attiva di fermentazione evidenziando la capacità di produrre metaboliti che possono contribuire alla qualità del vino; per esempio la produzione di glicerolo da parte della *Candida stellata* e la produzione di esteri da parte della *Candida pulcherrima* attualmente denominata *Metschnikowia pulcherrima*.

Altre specie, come *Kloeckera apiculata*, sono associate alla produzione di acido acetico che può essere dannoso per la qualità del vino.

Quindi l'attività iniziale dei lieviti non-*Saccharomyces* nel mosto in fermentazione è considerata importante per il profilo analitico e aromatico finale dei vini. Inoltre la produzione di eso- ed endonucleasi da parte di questi lieviti gioca un ruolo molto importante, poiché le pectinasi hanno alcune applicazioni nell'affinamento, nella filtrazione e anche nell'estrazione del colore del vino. L'uso di enzimi pectolitici per la macerazione può anche aumentare il contenuto di succo di terpenolo. Altri enzimi sono le esterasi che formano i composti dell'aroma del vino e le lipasi che degradano i lipidi dell'uva (Esteve-Zarzoso et al, 1998).

1.8. Fermentazioni miste

L'utilizzo di colture di *S. cerevisiae* e di lieviti non-*Saccharomyces* rappresenta una via percorribile per migliorare la complessità e valorizzare le caratteristiche organolettiche e

aromatiche del vino. Le possibili interazioni sinergiche tra diversi lieviti possono fornire uno strumento per l'applicazione di nuove tecnologie di fermentazione.

È stato dimostrato che i lieviti quando sviluppano insieme in condizioni di fermentazione, non lo fanno passivamente, ma piuttosto interagiscono (Ciani et al. 2009).

Pertanto, la scelta degli starter nelle fermentazioni miste deve essere basata sul profilo del prodotto che si vuole ottenere.

1.8.1. *Torulaspota delbrueckii*

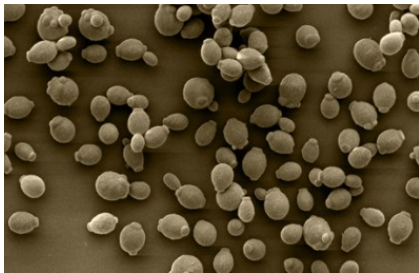


Figura 2: *Torulaspota delbrueckii*

T. delbrueckii, lievito anascomicete, era precedentemente conosciuto come *Saccharomyces delbrueckii* o *Saccharomyces rosei*. La forma anamorfa è conosciuta come *Candida colliculosa*. Ha proprietà metaboliche e fisiologiche peculiari di potenziale utilizzo in enologia. La sua bassa produzione di acidità volatile, acetato di etile, acetaldeide e acetoino, la sua media produzione di H₂S, la sua resistenza medio-alta alla SO₂, la sua capacità di biotrasformare i terpeni e la sua maggiore produzione di alcuni composti aromatici e di molecole come l'acido lattico o succinico, la rendono adatta per fermentazioni sequenziali con il *S. cerevisiae* con lo scopo di migliorare la qualità e il bouquet aromatico del vino. Il potere fermentativo di *T. delbrueckii* è basso; deve quindi essere usato con *Saccharomyces* se si vogliono consumare tutti gli zuccheri di un mosto d'uva. Le pratiche enologiche moderne utilizzano ceppi di *T. delbrueckii* prodotti da un produttore europeo

(ZYMAFLORE® ALPHA TD N. SACCH., Laffort) o canadese (LEVEL2™ TD, Lallemand, Canada) in condizioni standard, in coltura mista o sequenziale (Loira I. Et al, 2014).

1.8.2. *Lachancea thermotolerans*

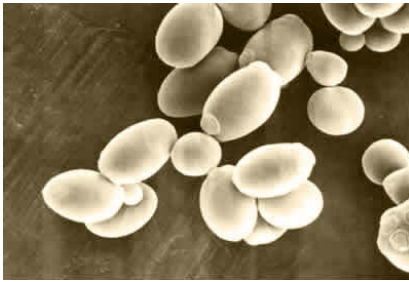


Figura 3: *Lachancea thermotolerans*

L. thermotolerans è un lievito ubiquitario che può essere trovato naturalmente nell'uva ma anche in altri habitat come suolo, insetti e piante.

Mostra una morfologia da sferica a ellissoidale che appare in cellule singole, appaiate o in brevi gruppi. È un lievito teleomorfo con 1-4 ascospore sferiche ed è caratterizzato per una bassa produzione di acidità volatile. Ha un potere fermentativo medio, quindi deve essere usato in fermentazioni sequenziali o miste con *S. cerevisiae*. Mostra un'alta produzione di acido lattico in grado di influenzare fortemente il pH del vino, a volte diminuendo il pH del vino di 0,5 unità o più durante la fermentazione. La maggior parte dell'acidificazione è prodotta all'inizio della fermentazione facilitando l'effetto nelle fermentazioni sequenziali perché è più competitivo a basso grado alcolico. Questa applicazione è particolarmente utile nelle zone calde colpite da cambiamenti climatici. La riduzione del pH è prodotta in modo naturale durante la fermentazione ed evita l'aggiunta di acido tartarico, che produce precipitazioni di tartrati, o l'uso di resine scambiatrici di cationi molto efficaci nella

riduzione del pH ma con effetti indesiderati sulla qualità del vino. La produzione di acido lattico avviene a partire dagli zuccheri, riducendo così leggermente il grado alcolico, soprattutto nei ceppi con un'alta produzione di acido lattico. Inoltre, è stato descritto un miglioramento nella produzione di 2-feniletanolo e glicerolo (Morata, A. Et al 2018).

1.8.3. *Schizosaccharomyces pombe*

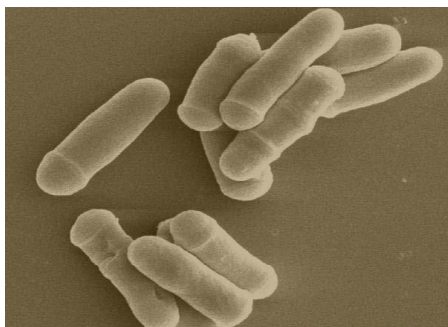


Figura 4: *Schizosaccharomyces pombe*

I lieviti del genere *Schizosaccharomyces* sono stati tradizionalmente descritti come organismi responsabili del deterioramento del vino a causa della loro produzione di composti con impatto sensoriale negativo, come acetaldeide, H₂S e acidi volatili.

Tuttavia, *Schizosaccharomyces* è stato usato a livello industriale nella fermentazione dello zucchero di canna per produzione di rum, la produzione di vino di palma e la fermentazione del cacao. Il genere è stato anche studiato su scala di laboratorio e semi-industriale nell'industria enologica, data la notevole capacità di alcuni dei suoi membri di disacidificare i vini attraverso la capacità di metabolizzare l'acido malico con la produzione di etanolo.

Nelle regioni viticole settentrionali, dove il contenuto di acido malico nelle uve può essere elevato, il possibile uso di lieviti non-*Saccharomyces*, come *Schizosaccharomyces spp.* per ridurre le concentrazioni di acido malico sta destando molto interesse.

Una delle nuove applicazioni di *Schizosaccharomyces* è l'invecchiamento su fecce, reso possibile dal forte rilascio autolitico di polisaccaridi della parete cellulare di questi lieviti. Inoltre, alcuni mutanti di *Schizosaccharomyces* possono essere in grado di ridurre il contenuto di acido gluconico dei mosti viziati. L'attività ureasica di *Schizosaccharomyces spp.* è anche interessante per quanto riguarda la sicurezza alimentare; la sua produzione potrebbe ridurre gli alti contenuti di carbammato di etile nel vino riducendo le concentrazioni di urea (Benito, S. Et al 2018).

1.8.4. *Pichia spp*

Tra le specie di *Pichia* legate al vino, *P. kluyveri* è la più studiata ed è l'unica attualmente disponibile sul mercato dei lieviti. *P. kluyveri* si caratterizza per la sua capacità di migliorare il pool dei composti aromatici come tioli, terpeni ed esteri fruttati. Attualmente, ci sono solo due starter commerciali a base di *P. kluyveri*: WLP605 (Vintner's Harvest®, Yakima, WA, USA), che è utilizzato per aumentare gli aromi floreali e di petali di rosa, contribuendo a migliorare il bouquet generale del vino, e FROOTZEN® (Hansen®, Hoersholm, Danimarca), che è utilizzato per aumentare gli aromi varietali e tiolici. Entrambi sono indicati per l'uso nella fermentazione sequenziale, prima con *P. kluyveri*, e 48 ore dopo con un ceppo di *S. cerevisiae*, che terminerà correttamente la fermentazione alcolica.

Possibili effetti indesiderati occasionali come l'aumento di acido isovalerico, H₂S o precursori di ammine biogene, che sembrano essere dipendenti dal ceppo, devono essere attentamente studiati in futuro.

Grazie al suo potenziale, *P. kluyveri* ha generato interesse in altri prodotti di fermentazione come la birra, il sidro e il cacao per migliorare i parametri di qualità legati alla percezione sensoriale. Sebbene *P. kluyveri* sia l'unica specie di *Pichia* disponibile sul mercato dei lieviti, altre come *P. fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *P. anomala*, e *P.*

membranifaciens sono in fase di studio per scopi enologici e nuovi ceppi commerciali potrebbero essere disponibili nel prossimo futuro.

(Benito, S. Et al 2018).

1.8.5. *Starmerella bacillaris*

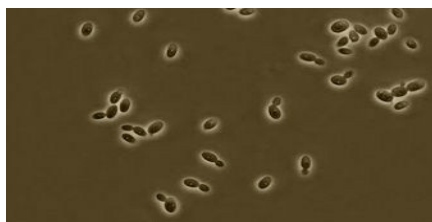


Figura 5: *Starmerella bacillaris*

S. bacillaris è un lievito ascomicete che si riproduce asessualmente per gemmazione ed è stato trovato di forma da ellissoidale ad allungata in cellule singole o in coppia. Questa specie non-*Saccharomyces* è stata descritta come lievito acidogenico, psicotollerante, osmotollerante e quindi adattata alle fermentazioni dei vini dolci. La maggior parte dei ceppi di questa specie sono tolleranti a livelli di etanolo relativamente alti e possono sopravvivere e persistere fino alla fase medio-fine del processo di fermentazione. È stato dimostrato che ha un carattere fortemente fruttosofilo e che durante la fermentazione la resa di etanolo dallo zucchero consumato è inferiore rispetto a *S. cerevisiae*. Così la riduzione della resa di etanolo può essere parzialmente spiegata dalla produzione di metaboliti secondari alternativi all'etanolo. Tra questi, è stato ben descritto che molti dei ceppi studiati mostrano un alto rendimento di glicerolo. Altre caratteristiche interessanti includono l'aumento della produzione di terpeni e lattoni e la degradazione dell'acido malico, rispetto alle fermentazioni pure con *S. cerevisiae*, aumentando così la qualità del vino. Ciò è dovuto principalmente alla capacità di questa specie di produrre un ampio spettro di enzimi idrolitici extracellulari di interesse enologico. Inoltre, è stato scoperto che *S. bacillaris*

potrebbe agire come un agente naturale di acidificazione riducendo il pH e aumentando l'acidità totale dei vini, principalmente a causa dell'elevata produzione di acido piruvico (Vasileios E. Et al 2017).

1.8.6. *Hanseniaspora/Kloeckera*

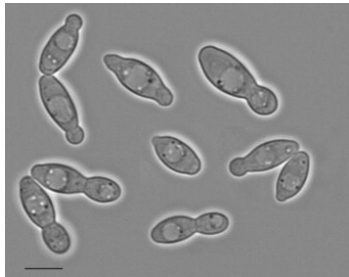


Figura 6: *Hanseniaspora/Kloeckera*

Il gruppo *Hanseniaspora/Kloeckera* è attualmente composto da 10 specie riconosciute associate all'uva. Una delle principali caratteristiche di queste specie è la debole capacità di fermentazione. Tuttavia, alcune specie, durante i primi studi condotti sui lieviti apiculati, hanno dimostrato che non tutti i ceppi *Hanseniaspora/Kloeckera* apportavano alti livelli di acidità volatile e molti di essi producevano livelli simili a quelli dello *S. cerevisiae* in questo senso. Questi risultati indicano che anche se alcuni ceppi di *Hanseniaspora/Kloeckera* possono fornire livelli più alti di etanolo rispetto ad altri, la caratteristica principale di *Hanseniaspora/Kloeckera* è la spinta formazione di alcuni esteri acetati.

La crescita iniziale di *Hanseniaspora/Kloeckera* ha un effetto ritardante sulla crescita successiva di *S. cerevisiae*, come dimostrato anche per altre specie di non- *Saccharomyces* in colture miste. Pertanto, quando si considera l'uso di ceppi *Hanseniaspora/Kloeckera* nella vinificazione, la composizione dei nutrienti del mosto d'uva e la competizione per l'azoto assimilabile da parte delle colture miste dovrebbero essere comprese per prevenire fermentazioni lente.

Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che diversi ceppi di *Hanseniaspora/Kloeckera* hanno un potenziale come agenti di biocontrollo contro i funghi, come la *Botrytis*. La competizione per i nutrienti è il meccanismo d'azione di protezione usato da *H. uvarum* contro i funghi nell'uva e nelle mele (Rabosto, X. Et al 2006)

1.8.7. *Metschnikowia pulcherrima*

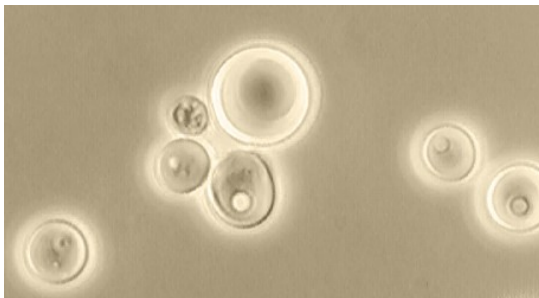


Figura 7: *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima è un lievito globoso/ellittico che non sempre può essere distinto da *S. cerevisiae* per microscopia. *M. pulcherrima* è un lievito teleomorfo appartenente a un genere ascomiceto.

La sua forma anamorfica è chiamata *Candida pulcherrima*.

M. pulcherrima è un organismo ubiquitario ed è stato trovato in uva, frutta, fiori, nettari e flussi di linfa. Diversi insetti fungono da vettori per questo lievito permettendo una differenziazione di habitat.

Ceppi *M. pulcherrima* possono essere identificati attraverso l'uso di substrati selettivi e differenziali;

Il potere fermentativo di *M. pulcherrima* è basso, con molti ceppi che raggiungono facilmente il 4% v/v nell'etanolo (Comitini, F. Et al 2011).

Questa caratteristica, insieme al fatto che la presenza di *M. pulcherrima* nel mosto pressato fresco è intorno al 19-39% della popolazione dei lieviti, rende necessario l'uso di *M. pulcherrima* in fermentazione sequenziale con lieviti ad alto potere fermentativo come *S. cerevisiae* o *S. pombe* per fermentare completamente gli zuccheri dell'uva. Anche la sua acidità volatile è abbastanza moderata, compresa tra 0,3 e 0,4 g/l, espressa in acido acetico. Inoltre, alcuni ceppi sono in grado di diminuire la formazione di H₂S durante la fermentazione.

La produzione di CO₂ durante la fermentazione è chiaramente inferiore in *M. pulcherrima* rispetto a *S. cerevisiae* con 4,5 g per 100 mL vs. 12,9 g per 100 mL (Romano, P. Et al 2003).

Durante la fermentazione alcolica *M. pulcherrima* ha una produzione di acetoino intermedia rispetto ad altre specie, come *S. cerevisiae* e *B. bruxellensis* (basso produttori) e *C. stellata* e *K. apiculata* (alto produttori). Inoltre, la quantità di 2,3 butandiolo prodotta da *M. pulcherrima* è di solito inferiore a quella prodotta da *S. cerevisiae*.

Negli inoculi misti con *S. cerevisiae*, la vitalità di *M. pulcherrima* diminuisce rapidamente dopo alcuni giorni di fermentazione a causa della sua bassa resistenza all'etanolo prodotto da *S. cerevisiae*.

L'attività fermentativa di *M. pulcherrima* per un periodo lungo fino all'inoculazione sequenziale di *S. cerevisiae* determina un'impronta favorevole sul profilo sensoriale del vino.

La sensibilità di *M. pulcherrima* a SO₂ è inferiore a quella osservata in *S. cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* o *S. pombe*, ma *M. pulcherrima* mostra una resistenza media paragonabile ad altre specie non-*Saccharomyces*. È stata anche osservata una certa sensibilità ad alcuni antimicrobici come il carvacrolo e il timolo (Escott, C. Et al 2017).

1.9. *Metschnikowia pulcherrima* come Bio-tool

M. pulcherrima può essere utilizzato come agente di controllo biologico grazie alla sua capacità di produrre pulcherrimina che è un pigmento rosso insolubile con attività antimicrobica. Questa particolare attività antimicrobica è prodotta dall'esaurimento del ferro nel mezzo attraverso la precipitazione di ioni ferro (III) causata dall'interazione con l'acido pulcherriminico, un precursore della pulcherrimina secreto da *M. pulcherrima*.

In questo modo, l'ambiente diventa inospitale per altri microrganismi che necessitano di ferro per il loro sviluppo. La pulcherrimina ha mostrato un'efficace attività inibitoria contro diversi lieviti: *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, così come i generi *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* e *Pichia*; e funghi: *Botrytis cinerea*, così come *Penicillium*, *Alternaria* e *Monilia spp.*

Tuttavia, *S. cerevisiae* non sembra essere interessato da questa attività antimicrobica (Oro, L. Et al 2014). Pertanto, l'uso di *M. pulcherrima* come starter selezionato in inoculi sequenziali o misti con *S. cerevisiae* potrebbe essere di grande interesse per l'enologia moderna.

M. pulcherrima, così come altre specie di lieviti come *Wickerhamomyces anomala* (ex *Pichia anomala*) e *T. delbrueckii*, ha un ampio spettro killer contro alcuni lieviti spoilage, di cui *C. glabrata* aveva la più alta sensibilità contro le tossine di questa specie. *M. pulcherrima* è stato anche descritto come biofungicida in grado di ridurre efficacemente l'incidenza dello sviluppo di *Botrytis* nei frutti post-raccolta (Spadaro, D. Et al 2010)

1.10. Microrganismi alterativi del vino

Sebbene i microrganismi siano fondamentali per la vinificazione, alcune specie di lievito e batteri, possono causare il deterioramento del vino, che ne riduce la qualità e il valore commerciale. Il deterioramento del vino può provocare la formazione di torbidità, l'aumento

dell'acido acetico e dell'acidità volatile, l'aumento della viscosità e la comparsa di odori sgradevoli dovuti a composti volatili come l'acetato di etile, i fenoli volatili e altri composti. Inoltre, può verificarsi la produzione di composti pericolosi per la salute umana, come le ammine biogene, acroleina, e carbammato di etile (Ryu, D. Et al 2015).

E' stato sottolineato che alcune attività di deterioramento possono essere ceppo-specifiche. Considerando questo, Loureiro e Malfeito-Ferreira hanno suggerito che il concetto di deterioramento del vino in sensu stricto dovrebbe includere solo quelle specie in grado di colpire i vini che sono stati lavorati e confezionati secondo gli standard delle buone pratiche di fabbricazione (GMP). Tuttavia, alcuni effetti dannosi di lieviti e batteri possono verificarsi prima della fermentazione o nella fase iniziale della stessa.

Per quanto riguarda i lieviti, circa 40 diverse specie di lievito sono i contaminanti più frequenti legati al vino, ma le specie che potenzialmente possono causarne il vero deterioramento sono molto meno. Come rivisto da Loureiro e Malfeito-Ferreira queste ultime possono essere raggruppate come segue:

- I. ceppi fermentanti (*S. cerevisiae*), quando rifermentano vini imbottigliati con residui di zucchero;
- II. *Zygosaccharomyces bailii*, che formano sedimenti o torbidità nei vini imbottigliati;
- III. lieviti filmogeni e produttori di esteri (specie di *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchnikowia*, *Debaryomyces*);
- IV. lieviti produttori di off-flavor (*Brettanomyces spp.*, *S. pombe*, e *Saccharomyces ludwigii*).

Tuttavia, va considerato che tra questi, solo *Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, e *S. cerevisiae* (nel caso di vini imbottigliati con zuccheri residui) sono generalmente considerati lieviti alterativi in sensu stricto, mentre alcune specie che potrebbero causare difetti in condizioni non controllate, possono essere utilizzate

in coinoculo con *S. cerevisiae* in fermentazioni controllate (De Filippis, F. Et al 2018).

I batteri dell'acido lattico (LAB) e dell'acido acetico (AAB) sono le uniche famiglie di batteri presenti nel mosto e nel vino. Questi includono quattro generi di LAB (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*) e tre generi di AAB (*Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*). Mentre alcune specie di LAB trovano applicazioni tecnologiche nella vinificazione (ad esempio, *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus plantarum* nella fermentazione malolattica), tutte le specie AAB sono considerate batteri spoilage. La crescita di *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e anche di alcuni ceppi di *Oenococcus* nel vino dà origine a numerosi scenari di deterioramento, poiché possono formare composti indesiderati di aroma e sapore, così come ammine biogene, acroleina e carbammato (Bartowsky, E. J. 2009).

La suscettibilità del vino al deterioramento dipende da diversi parametri, tra cui le caratteristiche chimico-fisiche (contenuto di etanolo, concentrazione di zucchero residuo, pH, quantità e composizione in acidi principali, cioè acido malico, ossigeno), le specie di lieviti/batteri presenti e la loro popolazione iniziale, il tipo e l'intensità dei trattamenti di stabilizzazione e il livello e il tipo di conservante chimico aggiunto.

La stabilità microbiologica del vino è fondamentale per preservarne la qualità. Può essere ottenuta con l'uso di conservanti chimici e/o trattamenti fisici, volti ad uccidere i microrganismi o almeno ad inibire la loro proliferazione, o ad eliminarli fisicamente dal vino.

(Bartowsky, E. J. 2009).

1.11. Anidride solforosa come antimicrobico

Il più comune, economico ed efficace conservante chimico del vino è l'anidride solforosa (SO₂). Le sue proprietà antimicrobiche sono state sfruttate contro i batteri produttori

dell'acido lattico, i batteri produttori dell'acido acetico, *Brettanomyces spp*, i lieviti micoderfici e vari batteri di deterioramento del vino. Da quando la SO₂ viene utilizzata nella vinificazione, la maggior parte delle alterazioni microbiologiche è quasi scomparsa dalle cantine, e oggi, tra gli agenti autorizzati, la SO₂ è l'unico che esercita un'efficacia ben provata per la stabilizzazione microbiologica del vino, insieme ad altri vantaggi come i bassi costi del trattamento, la facilità d'uso e l'efficacia ad ampio spettro (Ribéreau G. Et al 2006).

L'anidride solforosa molecolare è la più efficace per quanto riguarda l'attività antimicrobica. Una volta entrata nella cellula, la SO₂ reagisce con numerosi costituenti come i sistemi enzimatici, coenzimi (NAD⁺, FAD, FMN), cofattori, acidi nucleici e vitamine (tiamina). A causa del pH intracellulare più elevato (circa 6,5) l'SO₂ molecolare è in gran parte convertito in ioni HSO₃ dopo la diffusione nel citoplasma.

Questo a sua volta abbassa la concentrazione intracellulare di SO₂, consentendo così un'ulteriore diffusione all'interno dell'organismo fino a quando la concentrazione di SO₂ è uguale su entrambi i lati della membrana plasmatica (Stratford, M., & Rose A. H. 1986).

I lieviti del vino mostrano una resistenza diversa allo SO₂: generalmente i non-*Saccharomyces* sono più sensibili dei *Saccharomyces*, anche se è stata riscontrata un'elevata variabilità intraspecifica (Vincenzini M. Et al 2005).

La maggior parte dei ceppi di *S. cerevisiae* sono resistenti fino a 1-2 mg/l di SO₂ molecolare, alcuni ceppi di *Z. bailii* e *S. pombe* mostrano una risposta simile; mentre *Saccharomyces ludwigii* può crescere a concentrazioni di SO₂ molecolare più elevate (fino a 3 mg/L).

Per quanto riguarda l'attività di SO₂ libera sui batteri, i ceppi di *Oenococcus oeni* sono più sensibili a SO₂ rispetto a *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

l'SO₂ combinata esercita una debole attività antibatterica, mentre non ha un'azione antimicrobica sui lieviti.

L'SO₂ combinata sembra possedere un'attività antibatterica da cinque a dieci volte inferiore all'SO₂ libera.

Le diverse sensibilità dei microrganismi alle varie forme di SO₂ provocano un'azione antimicrobica selettiva (batteri > lieviti non-*Saccharomyces* > lieviti *Saccharomyces*).

(Ribéreau-Gayon, 2006a).

Questo determina una selezione sulla microflora del mosto verso i lieviti *Saccharomyces*, favorendo un corretto svolgimento della fermentazione alcolica e il controllo delle fermentazioni indesiderate.

Nel vino finito, gli obiettivi tipici per prevenire il deterioramento microbico sono almeno 0,6 mg/l di SO₂ molecolare per i vini secchi e almeno 0,8 mg/l di SO₂ molecolare per i vini dolci (Waterhouse et al.,2016).

Tuttavia, il livello di SO₂ molecolare deve essere mantenuto al di sotto della soglia sensoriale (2 mg/L).

Oltre ad essere aggiunto come additivo, l'SO₂ è prodotta da *S. cerevisiae* durante la fermentazione alcolica, come intermedio durante la riduzione assimilatoria del solfato al solfuro, che è essenziale per la biosintesi dello zolfo contenente amminoacidi metionina e cisteina.

SO₂ può derivare dal prodotto metabolico del lievito in diverse quantità (fino a 100 mg/l, ma raramente più di 10 mg/l), a seconda del ceppo e anche sulla composizione del mosto (Rauhut, D. 2009).

S. cerevisiae produce anche SO₂ combinata a composti carbonilici (SO₂-binding carbonyl compounds) , come acetaldeide, acido piruvico e α -chetoglutarato, in un'ampia gamma di concentrazioni; pertanto, la scelta del ceppo di lievito può avere un impatto significativo sul potere legante di SO₂ di un vino e quindi sulla quantità di SO₂ da aggiungere per mantenere un livello di SO₂ libero adeguato (Wells, A. Et al 2011).

Negli ultimi decenni, la tendenza nella selezione dei lieviti è stata quella di abbassare la produzione sia di SO₂ che di composti carbonilici.

1.12. Normative europee sull'uso della SO₂

Un gran numero di prodotti alimentari può contenere SO₂ come additivo: vino, frutta e verdura secca, gamberetti, succhi di frutta, pesce secco, verdure in scatola, e molti altri (Fazio, T., & Warner, C. R. 1990).

Secondo il Regolamento UE, l' SO₂, e le varie forme di solfiti, devono essere etichettate con codici (E seguito da un numero) nell'intervallo E 220-228 (Regolamento UE n. 1129/2011).

La normativa europea stabilisce la concentrazione limite di SO₂ totale che arriva fino a 150 mg/l nei vini rossi e 200 mg/l nei vini bianchi e rosati con un massimo di 5 g/l di zuccheri riduttori (regolamento UE n. 606/2009).

Tali limiti aumentano di 50 mg/l se le concentrazioni di zucchero riducente sono pari o superiori a 5 g/l (regolamento UE n. 606/2009) e sono ridotte da 30 a 50 mg/l, a seconda della categoria di vino, nei vini biologici (regolamento UE n. 203/2012).

1.13. Problemi legati alla SO₂

Nell'ultimo decennio, l'uso di SO₂ nell'industria alimentare ha sollevato alcune preoccupazioni sulla sicurezza dei consumatori.

Infatti, l'SO₂ del vino ha chiaramente dimostrato di contribuire fortemente nella comparsa di effetti indesiderati in una piccola popolazione (circa l'1%) di individui "sensibili al solfito" (Fazio, T., & Warner, C. R. 1990).

Le reazioni osservate comprendono broncospasmo, bradicardia, sintomi gastrointestinali, orticaria, angioedema, ipotensione, shock e, in rari casi, reazioni anafilattiche (EFSA, 2014).

Inoltre, l'SO₂ e suoi derivati possono essere agenti tossici sistemici, in quanto si è scoperto che sono in grado di indurre un aumento delle frequenze delle aberrazioni cromosomiche, scambi di cromatidi fratelli e micronuclei in cellule di mammifero, possono anche causare

danni ossidativi in organi multipli di topi maschi e femmine (Fazio, T., & Warner, C. R. 1990).

Sulla base di tali prove, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha stimato una dose giornaliera ammissibile massima (DGA) di 0,7 mg di SO₂ per kg di peso corporeo (OMS, 2009).

Considerando i limiti di dose di SO₂, imposti dalla Comunità europea per le diverse categorie alimentari (regolamento UE n. 1129/2011), la DGA per la SO₂ è difficilmente superata a causa del normale apporto umano di ogni singola categoria alimentare; tuttavia possono sorgere preoccupazioni dopo un'assunzione cumulativa eccessiva (OMS, 2009).

Alla luce di ciò, l'OMS raccomanda di incoraggiare la ricerca su metodi alternativi di conservazione volti a ridurre l'uso di SO₂, in particolare sulle applicazioni in cui l'uso di SO₂ è responsabile di un contributo significativo (OMS, 2009), ed è stato stimato che il vino è uno dei principali fattori che contribuiscono all'assunzione di SO₂ negli adulti, almeno nei paesi in cui viene consumato regolarmente (WHO, 2009).

Inoltre, l'obbligo di etichettare con la frase "contenente solfiti" i prodotti alimentari, compreso il vino, in cui la concentrazione di SO₂ è superiore a 10 mg/l o 10 mg/kg (direttiva 2003/89/CE) ha suscitato preoccupazioni tra i consumatori che sono generalmente sempre più orientati verso Prodotti "sani" privi di conservanti chimici (Costanigro, M. Et al 2014). Nella vinificazione c'è una tendenza generale nella riduzione dell'SO₂, e negli ultimi anni la ricerca enologica è stata fortemente orientata verso lo studio di tecniche e additivi come alternative all'SO₂.

1.14. Metodi alternativi per il controllo dell'attività spoilage

La crescita di microrganismi spoilage (come *B. bruxellensis*) nel vino è tradizionalmente controllata con l'uso di anidride solforosa (SO₂). Altri conservanti chimici sono stati testati, ma non sono molto più efficienti di SO₂. La filtrazione del vino e l'uso di correnti/campi elettrici alterano anche le proprietà fisiche e sensoriali del vino.

In questo contesto, oggi giorno si stanno cercando metodi alternativi per ottenere il pieno controllo del processo fermentativo. Recentemente sono state proposte tossine killer per raggiungere questo scopo. Si tratta di composti antimicrobici secreti da lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*, che mostrano attività killer contro altri lieviti e funghi filamentosi.

Si ritiene che queste tossine svolgano un ruolo nella dinamica della popolazione di lieviti, il fenotipo killer quindi potrebbe essere sfruttato per inibire la crescita di microrganismi indesiderati all'interno di un ecosistema microbico come quello che si verifica nel vino.

1.14.1. I diversi fenotipi

Sono stati identificati quattro fenotipi: killer, sensibili, neutri e killer-sensibili. Uno specifico ceppo killer produce una tossina ed è immune ad essa; un ceppo sensibile non produce la tossina ed è sensibile alla tossina prodotta da un ceppo killer; un ceppo neutro non produce né è sensibile alla tossina killer prodotta da un ceppo killer, e un ceppo killer-sensibile produce una tossina ed è immune ad essa, ma è sensibile alle tossine prodotte da altri ceppi (Tredoux, H.G. et al, 1986).

1.14.2. Tossine killer

Le tossine killer sono composti proteici antimicrobici che inibiscono specie o ceppi di lieviti sensibili. Yap et al. hanno definito la secrezione delle tossine "interference competition", una forma di amensalismo. Sebbene la competizione di interferenza favorisca la crescita del lievito produttore di tossine killer rispetto a quella di altri microrganismi presenti nello stesso habitat, il suo potenziale ruolo nell'eliminazione dei microrganismi indesiderati non può

essere contestato. Così, questo fenotipo killer può essere utilizzato per combattere i lieviti spoilage e può essere utilizzato come sostituto parziale di agenti chimici come SO₂ per la conservazione del vino.

Le tossine killer non-*Saccharomyces* mostrano uno spettro di attività più ampio, inibendo le specie all'interno dei generi non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces*, rispetto alle tossine di *Saccharomyces* (Ciani, M. Et al, 2011).

Recentemente diversi studi hanno focalizzato la loro attenzione sull'utilizzo in fermentazioni sequenziali di lieviti non- *Saccharomyces* con lo scopo di ridurre la quantità di microorganismi spoilage.

CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

Nell'enologia moderna viene ampiamente sfruttata come agente antimicrobico l'anidride solforosa, che grazie al suo basso costo e comprovata efficacia risulta la soluzione migliore per prevenire lo sviluppo di lieviti o batteri selvaggi.

Negli ultimi anni però, si è visto crescere una maggiore consapevolezza da parte del consumatore che preferisce acquistare prodotti a basso contenuto di solfiti, in quanto è stato provato che portano svantaggi alla salute umana se assunti sopra soglie massime e per periodi prolungati.

Essendo l'anidride solforosa una sostanza che oltre ad avere un'azione antimicrobica ha anche un effetto antiossidante nell'industria alimentare è ampiamente utilizzata su una vasta gamma di prodotti, aumentando così il rischio di un effetto cumulativo nell'organismo del consumatore.

Verificati i diversi svantaggi per la salute umana (mal di testa, asma e difficoltà respiratorie) l'UE ha indetto leggi per la tutela dell'acquirente che stabiliscono sia la concentrazione massima delle varie forme di solfiti contenute nel vino sia l'obbligo di segnalarle nell'etichetta. Questo permette al consumatore di scegliere in modo consapevole e sempre più spesso la scelta ricade verso un prodotto a basso contenuto di solfiti.

La crescente richiesta da parte del consumatore di prodotti a basso contenuto di solfiti ha portato la scienza dell'enologia ad incrementare gli sforzi nella ricerca di metodi alternativi per il controllo dei microrganismi spontanei, riducendo così l'utilizzo della SO₂.

Molti studi si sono focalizzati sul cercare alternative adeguate alla SO₂ per controllare i microrganismi responsabili del deterioramento del vino, evidenziando l'efficacia di strategie microbiologiche, metodi fisici e inibitori chimici.

Nel presente lavoro di tesi è stato dapprima valutato in fase di pre-raccolta l'azione di due trattamenti sulle uve come acqua ozonata e Idrovitis per l'azione di tali trattamenti sul contenimento del microbiota presente sulle uve che verrà quindi trasferito sul mosto.

In una seconda fase del progetto è valutata l'efficacia di *M. pulcherrima* come ceppo selezionato per il bio-controllo in fermentazioni sequenziali sia con uno starter commerciale di *S. cerevisiae* che con un nuovo ceppo nativo di *S. cerevisiae* isolato dalle uve Verdicchio e migliorato mediante induzione alla sporificazione e successivamente selezione, per la produzione di vini a basso contenuto di solfiti e caratterizzati da un profilo aromatico caratteristico.

A tale scopo sono state condotte delle prove di fermentazione su scala industriale per determinare l'andamento fermentativo, i principali caratteri enologici, i più importanti metaboliti secondari, l'evoluzione dei principali composti volatili e soprattutto l'evoluzione delle comunità microbiche colonizzanti il vino e la quantità di anidride solforosa prodotta, con l'obiettivo di individuare il contributo di *M. pulcherrima* e le interazioni con il ceppo di

S. cerevisiae per il controllo dei lieviti spontanei e il miglioramento del carattere aromatico del vino.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1. Prima parte: Trattamenti in campo

Con l'intento di controllare le prime fasi del processo di vinificazione focalizzandosi sulla qualità microbiologica delle uve conferite è stata svolta un'analisi sull'evoluzione della microflora.

Le aziende coinvolte nell'indagine sono la Terre Cortesi Moncaro s.r.l. sita a Montecarotto (AN) che si trova nel cuore della zona di produzione a Doc del verdicchio classico dei Castelli di Jesi e Cantine Belisario (MC) nota azienda produttrice di Verdicchio di Matelica.

È stata valutata l'efficienza di due diversi trattamenti operati direttamente sulle uve in campo: l'utilizzo di acqua ozonata sul vitigno di Terre Cortesi Moncaro s.r.l. e l'utilizzo di IDROVITIS® sulle uve del vitigno Cantine Belisario con il fine di valutare il controllo e la diffusione della microflora selvaggia e limitare la carica microbica riferita ai lieviti selvaggi che, se presenti in eccesso, possono interferire sul regolare andamento del processo fermentativo e sulle caratteristiche organolettiche del vino.

L'ozono essendo un gas instabile ad alto potere ossidante è in grado di uccidere i microrganismi come batteri e funghi nel momento stesso in cui avviene il contatto.

Per questo motivo il suo potere biocida sta suscitando grande interesse da chi è in cerca di un metodo alternativo alle tecniche convenzionali per la salvaguardia della qualità della vite.

L'ozono è un gas naturale composto da 3 molecole di ossigeno che si trova spontaneamente in natura, per questo non apporta contaminanti nocivi alla coltura su cui viene applicato.

L'instabilità dell'O₃ rappresenta contemporaneamente il vantaggio e lo svantaggio di questa tecnica.

La conseguenza positiva di questa sua caratteristica chimica è la sua efficacia nella sanificazione che deriva dalla sua grande propensione a reagire ed in particolar modo ad ossidare e quindi portare alla morte di microorganismi presenti sulla superficie di applicazione. Inoltre, agendo per via ossidativa, non può generare resistenze nei patogeni e non ha alcun impatto ambientale.

Un altro vantaggio è che non lascia tracce nell'ambiente poiché si degrada completamente ad ossigeno e si può procedere con la raccolta delle uve dopo la sua applicazione.

Accanto questi grandi pregi si accompagna un aspetto negativo che lo rende uno strumento ancora non facilmente utilizzabile dalle aziende agricole.

Infatti la sua instabilità comporta un difficile immagazzinamento del O₃ che deve essere prodotta in situ da atomizzatori portatili, apparecchiature costose e pesanti.

Qui l'ossigeno atmosferico viene separato dall'azoto e trasformato in ozono attraverso scariche elettriche. Il gas viene poi miscelato con l'acqua che viene irrorata sulla coltura.

IDROVITIS® è una soluzione concentrata a 3000 ppm di biossido di cloro puro e stabile al 99,9%, presente come gas disciolto in acqua, addizionata di Zeolite e Xanthan Gum.

Viene utilizzata per la sanificazione microbiologica pre-raccolta delle uve in quanto è un coadiuvante contro batteri, funghi, virus e marciume acido.

Come il trattamento con acqua ozonata, IDROVITIS® ha un ampio spettro d'azione e non lascia residui nel punto di applicazione poiché si degrada completamente.

Dopo il tempo di azione dei trattamenti stimato da protocollo, rispettivamente di una notte per l'acqua ozonata e due ore per l'IDROVITIS®, le porzioni di campo analizzate sono state divise in parcelle e sono stati raccolti i grappoli sia prima il trattamento che dopo il

trattamento, inoltre sono stati raccolti grappoli che non hanno subito trattamento e che sono stati identificati come controllo (provenienti da un'area adiacente).

Nell'immagine che segue viene riportato lo schema di campionamento seguito per lo studio condotto sulle uve del vigneto dell'azienda Moncaro.

L'area di vigna presa in esame è di un ettaro ed è stata divisa in due parti:

- In verde porzione di vigneto dove non è stato effettuato nessun trattamento con acqua ozonata (controllo)
- In rosso porzione di vigneto dove è stato effettuato il trattamento con acqua ozonata. Da questa sono stati raccolti campioni sia prima del trattamento che a trattamento avvenuto.



Come si può vedere dallo schema ogni parcella è identificata da un numero (1-10) ed è composta da 3 campioni che sono stati prelevati seguendo uno schema a triangolo

equilatero.

I 3 prelievi relativi ad una parcella saranno poi uniti in un unico campione in laboratorio in ambiente sterile.

Queste operazioni mirano ad aumentare la rappresentatività delle parcelle.

Ogni campione (vertice di un triangolo) è costituito da un grappolo di uva considerato dall'operatore delle dimensioni coerenti e ad un adeguato stato di maturazione e salute.

Ogni grappolo è stato raccolto da una vite selezionata in modo tale da rendere il campionamento il più rappresentativo possibile, quindi a distanze che ricoprissero tutta la superficie in modo uniforme.

Il grappolo è stato escisso dalla vite con delle forbici, inserito in un sacchetto di plastica sterile e catalogato con il criterio che segue:

- un numero relativo alla zona in cui è stata prelevata la parcella:
 - ◆ 1-5: area trattata con acqua ozonata
 - ◆ 6-10: area senza trattamento
- una lettera A, B o C che identifica uno dei tre vertici di cui si compone la parcella; i campioni identificati con una lettera singola fanno riferimento al primo campionamento effettuato il 16/9/2020 in cui sono state prelevate le parcelle relative alla zona in cui non è stato effettuato alcun trattamento e quelle relative al pre-trattamento dell'area che sarà, la sera stessa trattata con ozono. I campioni identificati con una doppia lettera si riferiscono a prelievi effettuati il giorno 17/9/2020 sulle stesse viti che sono state trattate.

PARCELLA	FILA	PALO	TESI	CAMPIONI	MOMENTO
1	3	3	CON O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020

					(post O ₃)
2	3	20	CON O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
3	19	10	CON O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
4	38	3	CON O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
5	38	16	CON O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
6	4	3	SENZA O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
7	4	20	SENZA O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020

					(post O ₃)
8	9	10	SENZA O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
9	19	3	SENZA O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)
10	19	20	SENZA O ₃	A, B, C	Mercoledì 16/9/2020 (pre O ₃)
				AA, BB, CC	Giovedì 17/9/2020 (post O ₃)

Lo stesso schema operativo è stato seguito per effettuare i campionamenti con l'azienda Cantine Belisario, con l'unica differenza che le uve sono state raccolte due ore dopo il trattamento con IDROVITIS®, tempo d'azione necessario stimato da protocollo del prodotto. Anche in questo caso sono stati raccolti grappoli provenienti da un'area di controllo (senza aver subito alcun trattamento).

Successivamente alla raccolta i grappoli sono stati trasportati in laboratorio il prima possibile e conservati a 4 gradi in cella fredda.

Il monitoraggio della microflora lieviforme è stato effettuato utilizzando le tecniche microbiologiche classiche durante la stagione Vendemmiale 2020.

L'analisi quantitativa delle uve pre e post trattamento e quelle di controllo (che non hanno subito alcun trattamento) è stata effettuata a partire dai grappoli che sono stati pigiati

asetticamente all'interno di sacchetti sterili, posti in agitazione per 15 minuti in un piano rotante (150 rpm) e quindi sono state effettuate le conte colturali vitali nei seguenti terreni di coltura:

- ◆ WL: è un terreno usato per la rilevazione di batteri e lieviti in processi di fermentazione industriale, in particolare nei processi di preparazione della birra. Il terreno è preparato secondo la formula originale di Gray e Green per lo studio dei microrganismi delle fermentazioni della birra e del pane.
- ◆ ROSE BENGALA: è un terreno selettivo consigliato per l'isolamento, e l'enumerazione di lieviti e muffe a crescita lenta;
- ◆ MRS: è un terreno selettivo usato per l'isolamento e la coltivazione di *Lactobacillus* spp.

3.2. PARTE 2: Lieviti utilizzati per l'allestimento delle fermentazioni

I lieviti utilizzati in questo studio per le prove di vinificazione in bianco provengono da la collezione del Dipartimento di Scienze della vita e dell'Ambiente (DISVA) e sono:

- *S. cerevisiae* I4 (coltura selezionata autoctona per la produzione di vini a basso contenuto di solfiti)
- *M. pulcherrima*) usato come biocontrollo in inoculi sequenziali con *S. cerevisiae*
- *S. cerevisiae* LALVIN ICV OKAY®

I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar: estratto di lievito (10 g/l); peptone (20 g/l); glucosio (20 g/l); agar (20 g/l); e conservati alla temperatura di 4°C. Per la conservazione

a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno contenente glicerolo (80%) alla temperatura di -80°C.

Le fermentazioni su scala industriale sono state allestite su mosto di verdicchio Biologico, vendemmia annata 2020 avente le seguenti caratteristiche:

- Baumè = 12,6 / 18° C

- Brix = 22.2

- Babo = 18,95

- Acidità totale = 4.67

- Ph = 3,34

- Acido malico = 2,43

-Amminico= 79

-Ammonio= 16.66

-Solforosa=16

Su tale mosto sono state allestite le seguenti fermentazioni:

- tesi 1 → sequenziale *M. pulcherrima* (10^6 cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo di OKAI (10^6 cell/ml)
- tesi 2 → controllo starter commerciale OKAI (10^6 cell/ml)
- tesi 3 → sequenziale *M. pulcherrima* (10^6 cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo I4 (10^6 cell/ml)
- tesi 4 → controllo ibrido I4 (10^6 cell/ml)

Su mosto di Verdicchio biologico di Matelica sono state allestite le seguenti fermentazioni:

- tesi 5 → sequenziale *M. pulcherrima* (10^6 cell/ml) seguita dopo 72h da inoculo FREEWINE 12 (10^6 cell/ml)
- tesi 6 → controllo starter commerciale FREEWINE 12 (10^6 cell/ml)

Per preparare la biomassa di *S. cerevisiae* I4 si è utilizzato YPD liquido modificato:

- ◆ 0,5 % yeast extract
- ◆ 0,1 % peptone
- ◆ 2 % saccarosio

Per preparare la biomassa di *M. pulcherrima* si è utilizzato terreno di crescita di TIPO A:

- ◆ 1% di yeast extract
- ◆ 0.5% peptone
- ◆ 5% di zucchero invertito

Le pre-colture contenenti il terreno specifico per il ceppo sono state poi mantenute in agitazione in frangiflutti a 150 rpm per le successive 48 ore per poi essere inoculate direttamente in un bioreattore da 30 litri Biostat® contenente il terreno di crescita specifico per i vari ceppi e precedentemente sterilizzato nel bioreattore, secondo il ciclo di sterilizzazione predefinito. Al fine di ottenere una produzione di biomassa necessaria a soddisfare le richieste il bioreattore è stato mantenuto in fed batch: questo sistema permette di prolungare il tempo di crescita dei microrganismi prima di raggiungere la fase stazionaria evitando l'effetto Cabtree (repressione della respirazione ad alte concentrazioni di zuccheri) in particolare per *S. cerevisiae*. Un substrato limitante la crescita viene infatti continuamente addizionato alla coltura.

La crescita dei ceppi di lievito è stata monitorata mediante misurazione del valore di O.D. con spettrofotometro, è stato inoltre controllato e misurato il valore di pH, la quantità di ossigeno immessa nel sistema, la temperatura e la velocità di rotazione delle pale interne

fissata a 400 r.p.m. Il controllo della produzione di schiuma è stato eseguito mediante l'immissione nel sistema di antischiuma. Al termine la biomassa è stata raccolta tramite centrifugazione.

Nello specifico sono stati ottenuti 6 kg in crema di *M. pulcherrima* e 3 kg in crema di *S. cerevisiae* I4.

L'inoculo del mosto è stato eseguito calcolando la concentrazione cellulare delle precolture mediante conta microbica totale con camera conta globuli di Thoma, da cui si è potuto stimare il volume dell'inoculo alla concentrazione desiderata (10^6 cell/ml).

La resa in biomassa è stata pari al 35% per *S. cerevisiae* I4 e 20% per *M. pulcherrima*

3.3. Monitoraggio delle fermentazioni

L'evoluzione delle fermentazioni è stata seguita analizzando diversi parametri strettamente correlati con il processo, quali:

- ✓ Analisi periodica degli zuccheri residui con aerometro Baumè.
- ✓ Per tutta la durata delle fermentazioni è stata fatta la valutazione dell'evoluzione della microflora fermentante mediante conte vitali su piastra con terreni generici e selettivi, eseguite al tempo 0 (momento dell'inoculo) e ad intervalli di diversi giorni per avere una stima precisa del numero di UFC/ml dei lieviti inoculati.

3.4. Analisi microbiologiche

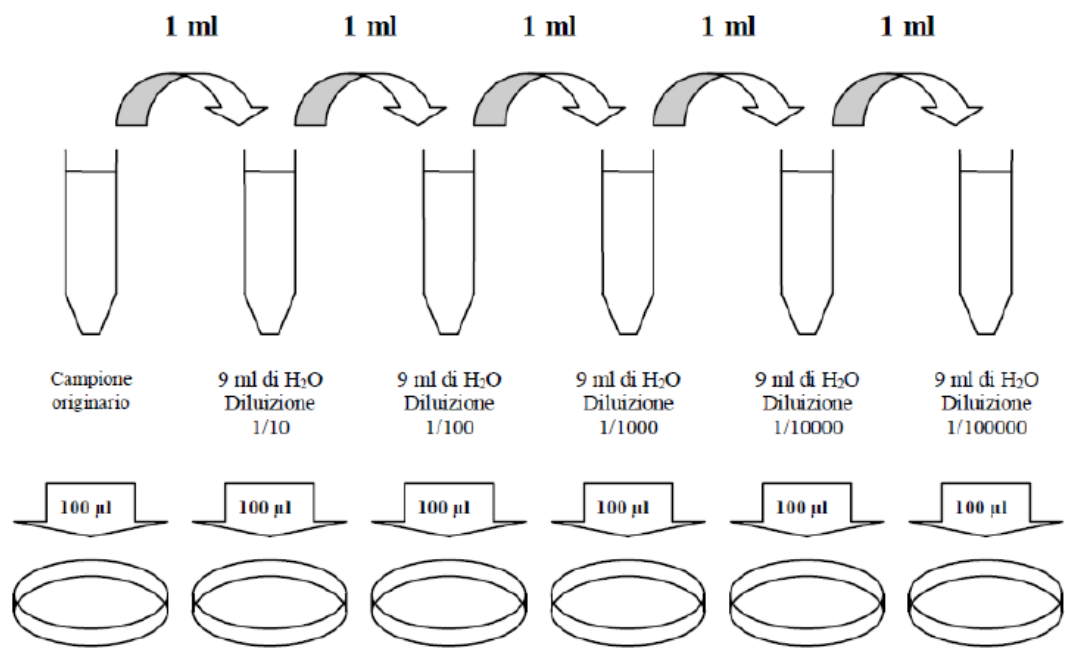
Per valutare l'evoluzione della popolazione microbica presente sia sulle uve della vigna che durante il processo di fermentazione, sono stati prelevati campioni periodici e sequenziali con lo scopo di registrare l'evoluzione e i cambiamenti delle popolazioni microbiche nel tempo e a seconda della tesi presa in esame.

Per definire la popolazione microbica delle uve è stata effettuata una conta vitale sui terreni WL nutrient agar (per la determinazione dei lieviti *S. cerevisiae* e per la conta totale dei lieviti), Rose Bengal Agar per valutare la presenza di muffe ed infine M.R.S. agar per l'isolamento di batteri Lattici

Le uve sono state schiacciate all'interno di sacchetti sterili ed il succo ottenuto è stato usato come materiale di partenza per diluizioni seriali di cui sono stati prese in considerazione le concentrazioni di (-2, -3, -4).

Per definire la popolazione dei microorganismi durante il processo fermentativo a partire dal tempo zero, ovvero il momento dell'inoculo con lievito, sono stati presi campioni di mosto (e successivamente vino) e sono state effettuate conte vitali attraverso il metodo delle diluizioni seriali.

È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo così una diluizione 1:10 (10^{-1}). Dopo aver miscelato il contenuto della provetta con agitatore magnetico, si è prelevato da questa 1 ml di liquido e posto in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione desiderata. Successivamente sono stati trasferiti 100 μ l di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno adatto. Si prende poi una bacchetta di vetro ad "L"; la si immerge in alcool, si passa alla fiamma per asciugarla e la si fa raffreddare sul bordo della piastra e si procede allo spatolamento per diffusione cellulare. Le piastre sono messe poi ad incubare a temperatura ambiente per due o tre giorni. Dopo il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute.



3.5. Terreni di coltura

I terreni utilizzati per le conte colturali sono:

WL Nutrient Agar: un terreno molto ricco di nutrienti che consente di ottenere un numero maggiore di informazioni rispetto ad altri terreni di coltura utilizzati in microbiologia e permette la crescita delle principali specie di lievito presenti nelle successive fasi della vinificazione. Le colonie di lievito quando crescono su questo terreno assumono colorazione e/o morfologia diverse per cui sono facilmente riconoscibili. Nella maggior parte dei casi, il WL Nutrient Agar permette di definire il genere dei lieviti caratterizzanti il mosto analizzato, ma non permette una distinzione della specie. Il WL è uno strumento utile per monitorare la diversità nella popolazione dei lieviti durante la fermentazione e per individuare suoi eventuali cambiamenti quando vengono applicate particolari condizioni di processo. Il terreno è disponibile come miscela già pronta in polvere, che può essere facilmente pesata, disciolta in ac-

qua, sterilizzata in autoclave a 121 °C e distribuita nelle capsule Petri. Il terreno è acquistabile come miscela in polvere già pronta

Composizione g/L:

- glucosio anidro 50g
- -peptone da caseina 5g
- -estratto di lievito 4g
- -potassio fosfato monobasico 0,55g
- -potassio cloruro 0,425g
- -calcio cloruro 0,125g
- -magnesio solfato 0,125g
- -cloruro ferrico 0,0025g
- -manganese solfato 0,0025g
- -verde di bromocresolo 0,022g
- -agar 12g
- -acqua distillata q.b. a 1000 ml

ROSE Bengal Agar: è un terreno selettivo utilizzato per il conteggio e isolamento di funghi (specifico per quelli a crescita lenta) e lieviti. Questo terreno riduce la crescita di batteri e diminuisce la dispersione delle colonie di funghi, evitando la sovrapposizione di colonie a crescita lenta con quelle che crescono più velocemente.

Il Rose Bengala viene assorbito dalle colonie di lieviti e muffe facilitando così il loro riconoscimento ed enumerazione. L'eventuale presenza

del cloramfenicolo aumenta la selettività del mezzo e inibisce la crescita batterica . Glucosio e peptone sono le basi nutritive del mezzo.

Composizione g/L:

- Rose Bengala 0,025g
- Dicloruro 0,002g
- Cloramfenicolo 0,1g
- D(+)-glucosio 10,0g
- Solfato di magnesio 0,5g
- peptone 5,0g
- Idrogenofosfato di potassio 1,0g
- Agar 15,0g

M.R.S. Mezzo di coltura di Man Rogosa Sharpe

Il terreno di coltura MRS è stato sviluppato da Man, Rogosa e Sharpe (1960) come un mezzo di arricchimento, coltura e isolamento batteri lattici da diversi tipi di campioni, sia clinici che provenienti da alimenti

composizione g/L:

- Peptospecial 10.0
- Estratto di carne 10.0
- Estratto di lievito 5.0
- Glucosio 20.0

- Idrogeno fosfato di potassio 2.0
- Acetato di sodio 5.0
- Ammonio citrato 2.0
- Magnesio solfato 0.2
- Manganese solfato 0.05
- Tween 80 1.0
- Agar 13.0

il YEPD (Yest Extrat Pepton Dextrose) o spesso abbreviato in YPD, è un mezzo completo e ricco per la crescita del lievito che è un organismo unicellulare eterotrofo per cui necessita una fonte di carbonio.

È stato utilizzato per

Composizione g/L:

- estratto di lievito 20
- peptone 40
- D-glucosio (destrosio) 40
- bacto-Agar

Ogni terreno, finita la pesata degli ingredienti, va sterilizzato in autoclave a 121 °C e Conservato così' ottenuto a temperatura ambiente, ben tappato ed al riparo da fonti di luce e di calore fino ad utilizzo

3.6. Analisi acidità Totale

Questo parametro è espresso in g/l di acido tartarico (M.E. = 75). si misura mediante titolazione con soluzione standard di una base e rilevazione del punto finale mediante pH-metro.

Si parte prelevando 25 ml da ogni campione; si mette in un beker e si immerge l'elettrodo nel vino, la cui temperatura deve essere il più possibile vicino a 20° C e si titola con NaOH.

Si fa cadere l'idrossido di sodio goccia a goccia da una buretta (Figura) fino a raggiungere un pH stabile intorno a 7. A questo punto si prende nota della quantità di NaOH utilizzato nella titolazione. Poi applicando la formula seguente, si calcola il valore dell'acidità totale di ogni campione analizzato: Acidità totale (acido tartarico g/l) = ml NaOH x 0,75, dove:

ml NaOH= ml di titolante

0,75=fattore di correzione

3.7. Alcoli superiori

Per l'analisi degli alcoli superiori il campione va preparato filtrando 10 ml di fermentato con filtro cut-off 0,2 µm a cui si aggiunge l'1-pentanololo come standard ad una concentrazione di 162 mg/l che è lo standard interno.

Si passa quindi all'analisi mediante gascromatografia (GC) in cui si inietta 1 µl di campione direttamente nel gascromatografo Shimadzu GC-2014 con detector a ionizzazione di fiamma, usando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo

il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 µm);
- iniettore: split 10:2; iniettato 1 µl;
- temperatura: T iniziale 35°C per 4 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma di 200°C per 1 minuto;
- gas vettore: Azoto.

Sulla base del tempo che impiega ogni composto ad arrivare al rilevatore viene generato un segnale (picco) caratteristico per ogni sostanza che ne permette quindi l'identificazione.

3.8. Determinazione dei composti volatili con tecnica SPME

La valutazione della componente volatile è stata determinata mediante la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). La SPME è una tecnica che può essere eseguita secondo due tipologie: ad immersione diretta SPME (DI-SPME) o in spazio di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita secondo la tipologia della tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME) utilizzando la fibra a tripla fase *divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS)*.

Una piccola aliquota di campione (5 ml) viene degassato per mezzo di un agitatore meccanico, successivamente il campione viene posto in una vial con tappo di teflon, dove viene aggiunto 1,5 g di NaCl e posta in termostato a 50°C per 10 minuti. Dopo questa sosta si aggiunge lo standard interno, che per la rilevazione della componente volatile è il 3-ottanolo, viene poi inserita la siringa attraverso il tappo e spinta la fibra. L'intero sistema viene posto in termostato a 50°C per 30 minuti. Con la fibra pronta si è passati all'analisi mediante gas-cromatografia (GC). L'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo sempre con la fibra retratta; è stato premuto lo stantuffo, esponendo la fibra

nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna; il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è stato di circa 5 minuti, per far in modo che tutti gli analiti avessero il tempo di essere desorbiti. Infine la fibra è stata retratta in ago e l'ago rimosso.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

- temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250 °C;
- colonna capillare Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm id);
- iniettore: splitless 60 sec.;
- temperatura del forno: T iniziale 50 °C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220 °C per 20 minuti;
- gas vettore: Azoto.

3.9. Etanolo

Per l'analisi dell'etanolo, il campione viene preparato nello stesso modo con cui viene preparato quello per gli alcoli superiori, ma si usa in questo caso come standard interno il 1-pentano alla concentrazione di 10 mg/l. viene iniettato 1 µl di campione utilizzando la colonna capillare Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo che segue:

- temperatura dell'iniettore: 150°C;
- colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 metri x 0.32 mm x 0.25 µm);
- iniettore: split 10:2; iniettato 1 µl;
- temperatura: 40°C per 5 minuti, poi un gradiente di 5°C/min fino a 200°C e isoterma di 200°C per 1 minuto;
- gas vettore: Azoto.

3.10. Acidità volatile

La determinazione dell'acidità volatile (espressa in g/l di acido acetico) è stata effettuata mediante distillazione in corrente di vapore con l'acidimetro di Juffman (Fig. 4). Tale apparecchio, di tipo elettrico, opera su 5 ml di birra, ed è composto dalle seguenti parti:

- un recipiente per la raccolta della birra esausta e delle acque di lavaggio dopo l'analisi;
- una beuta contenente acqua distillata, per la generazione di vapore acqueo, chiusa con un tappo a due fori: in uno di essi passa il tubo di sicurezza, che serve anche per riempire la beuta, nell'altro è inserita una valvola; questa beuta viene riscaldata da una piastra elettrica sottostante ad essa;
- una valvola per indirizzare il flusso di vapore o all'esterno (prima che inizi l'analisi) o dentro il palloncino da distillazione in corrente di vapore (durante l'analisi);
- un palloncino da distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori;
- un mantello scaldante, per scaldare il palloncino da distillazione in corrente di vapore;
- una serpentina refrigerante;
- una beuta di raccolta del distillato.

Si aggiunge l'acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo, per metà circa del suo volume, e si innesta la corrente elettrica alla piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Allo stesso tempo viene attivato il refrigerante e al di sotto si posiziona il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di vapore esce all'esterno dal tubo di sicurezza, nel palloncino da distillazione in corrente di vapore si aggiungono 5 ml di birra. Successivamente il palloncino viene chiuso con l'apposito tappo e si

accende il mantello riscaldante per scaldare la birra. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa la birra in ebollizione. Si distillano 40 ml, facendo attenzione che il livello della birra all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, si abbassa il mantello scaldante o si spegne momentaneamente. Terminata la distillazione, il mantello scaldante viene spento e si riporta la valvola nella posizione di partenza in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; terminata la distillazione la birra esausta e le acque di lavaggio del palloncino vengono aspirate nel recipiente di raccolta degli scarti.

Alla fine, si determina l'acidità volatile attraverso una titolazione acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0.02 N). Prima della titolazione si aggiungono al distillato 3 gocce di fenolftaleina come indicatore, in modo tale da determinare il viraggio del colore del campione da trasparente ad un rosa vivo, in seguito all'aggiunta di NaOH. Attraverso una tabella di conversione, a seconda di quanta NaOH è stata aggiunta è stato possibile risalire ai g/L di acido acetico caratterizzanti il campione.

3.11. Determinazione della solforosa

La quantità di SO₂ presente in un campione può essere determinata nel modo seguente:

si versano, in una beuta da 1000 ml, 50 ml di vino, si aggiungono 3 ml di H₂SO₄ al 10% e 5 ml di Salda d'amido al 1%; si titola con Iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione blu (si indica con a il volume in ml di Iodio aggiunto); si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto); si aggiungono 8 ml di NaOH 4N, si attendono 5 minuti a beuta chiusa e si aggiungono 10 ml di H₂SO₄ al 10%; si titola con Iodio N/20 (0,005 N) fino a colorazione blu (si indica con a1 il volume in ml di Iodio aggiunto); si retrotitola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b1 il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto); si aggiungo-

no 20 ml di NaOH 4N (si attendono 5 minuti a beuta chiusa) circa 200 ml di acqua fredda e 30 ml di H₂SO₄ al 10%; si titola con Iodio N/20 (0,05 N) fino a colorazione azzurra (si indica con a₂ il volume in ml di Iodio aggiunto); si retro titola con Na-tiosolfato N/200 (0,005 N) fino a completa decolorazione (si indica con b₂ il volume in ml di Na-tiosolfato aggiunto).

Con le seguenti formule è possibile calcolare la solforosa presente nel campione (in mg/l):

$$\text{SO}_2 \text{ libera} = a - (0,1 \times b) \times 32$$

$$\text{SO}_2 \text{ combinata} = a_1 - (0,1 \times b_1) \times 32 + a_2 - (0,1 \times b_2) \times 32$$

$$\text{SO}_2 \text{ totale} = \text{SO}_2 \text{ libera} + \text{SO}_2 \text{ combinata}$$

CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

Prima parte: Trattamenti in campo di uve con acqua ozonata e IDROVITIS

4.1. Valutazione popolazione microbica dopo trattamento con acqua ozonata e IDROVITIS®

Il monitoraggio della microflora indigena dell'uva (Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agricola)

nelle fasi pre e post trattamento con acqua ozonata è riportata in Fig 9. I risultati mostrano che il trattamento effettuato con acqua ozonata ha l'effetto di diminuire la popolazione di *M. pulcherrima* (da 10⁴ UFC/ml a 10³ UFC/ml) e in modo meno evidente e significativo anche di *H. uvarum* (10⁴ UFC/ml).

Per quanto riguarda *A. pullulans*, che è un lievito presente naturalmente sulle uve, e le muffe, sembrano non risentire del trattamento effettuato, mostrando una concentrazione cellulare paragonabile a quella mostrata nel pre -trattamento (10⁴ UFC/ml). Tutte le variazioni di popolazioni che si presentano tra il pre e il post trattamento non sono statisticamente

significative quindi si può asserire che il trattamento con acqua ozonata non ha portato a dei risultati apprezzabili nel controllo dei microrganismi epifitici.

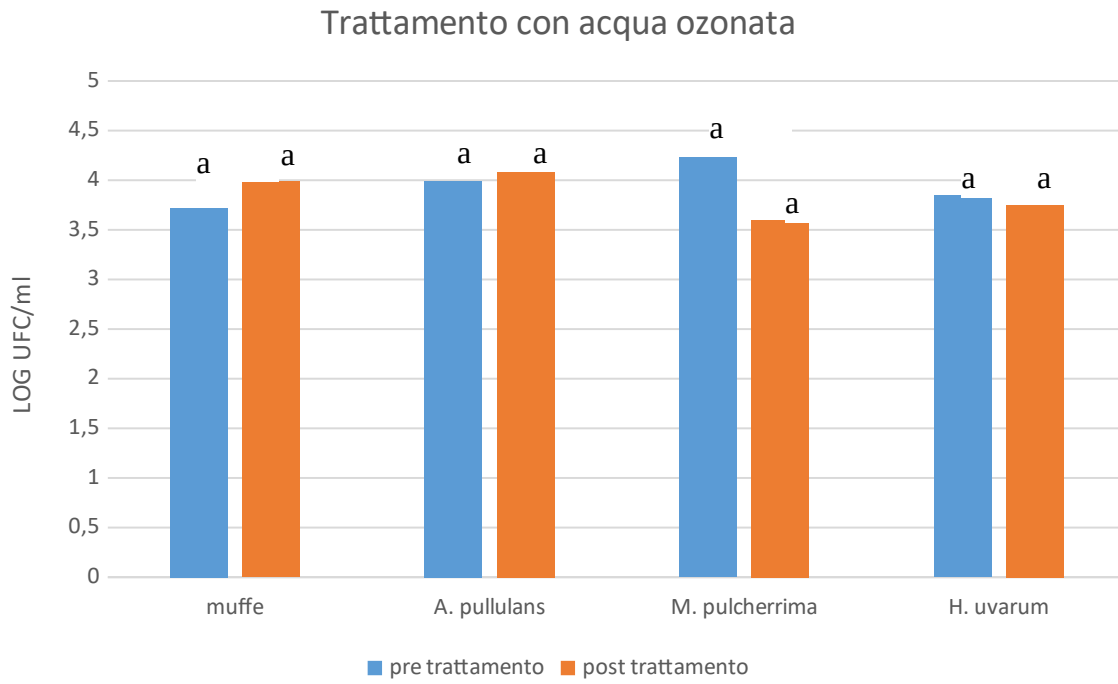


Figura 9: Trattamento con acqua ozonata

Per quanto riguarda il trattamento con IDROVITIS® effettuato nelle Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola sembra avere un effetto contrario rispetto il trattamento con acqua ozonata come mostrato in Fig 10. Infatti in questo caso *M. pulcherrima* e *H. uvarum* vedono un aumento di concentrazione dopo il trattamento, mentre le muffe diminuiscono da 10^4 UFC/ml a 10^3 UFC/ml anche se queste 3 annotazioni non rivelano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda *A. pullulans* si nota una diminuzione di concentrazione tra pre e post trattamento che risulta statisticamente significativo.

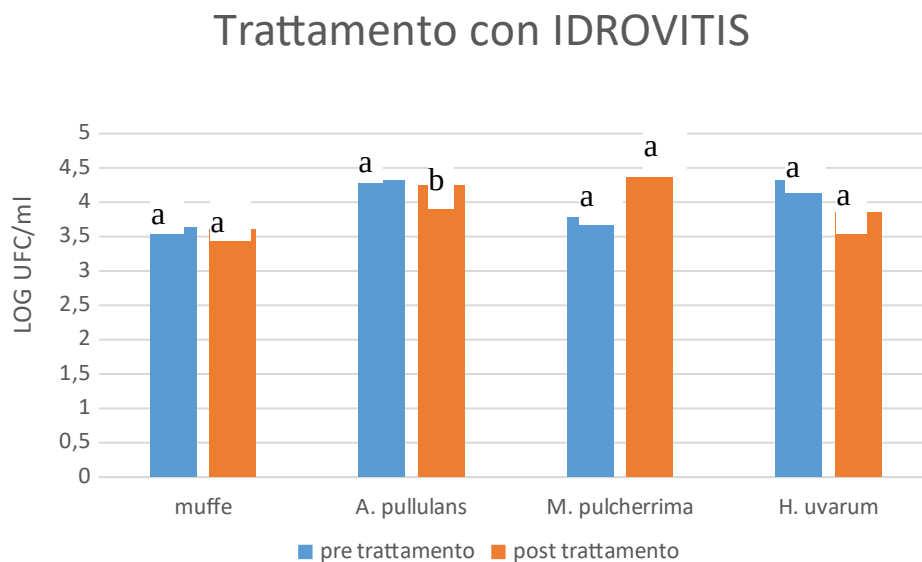


Figura 10: Trattamento con IDROVITIS

Seconda parte: inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e *S. cerevisiae*

Al fine di valutare l'effetto di *M. pulcherrima* come bio tool per il controllo dei microrganismi selvaggi nel processo di vinificazione, sono stati valutati i seguenti parametri: evoluzione popolazione microbica, andamento fermentativo, pH, acidità volatile e totale, etanolo, zuccheri residui, acido malico, alcoli superiori e componente volatile.

4.2. Effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*

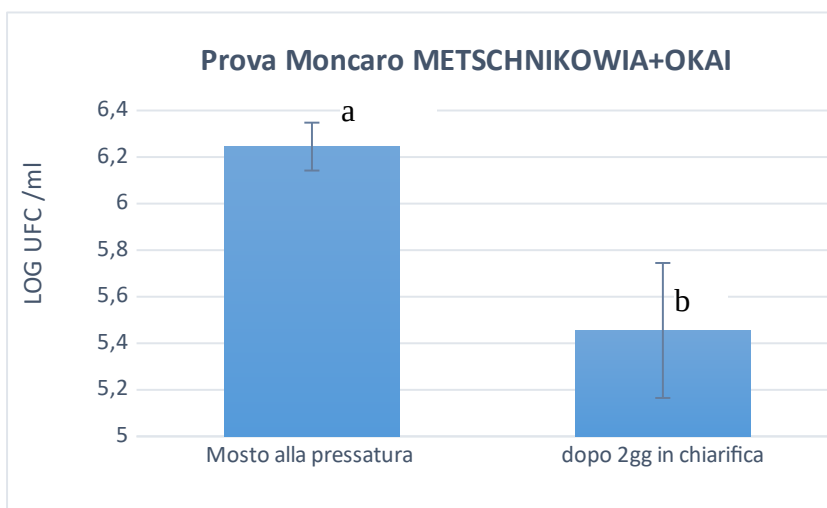
Nei grafici che seguono sono riportate le concentrazioni della popolazione di *H. uvarum* durante il processo di vinificazione a due giorni dall'inoculo di *M. pulcherrima*.

Dai grafici è evidente l'effetto di *M. pulcherrima* sul controllo della concentrazione di *H. uvarum* infatti nelle tesi di controllo, in cui *M. pulcherrima* non è stata inoculata non si notano particolari differenze nella concentrazione di popolazione di *H. uvarum* nel tempo.

Nella Fig 11 viene descritta la prova condotta con inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e *S. cerevisiae* OKAI.

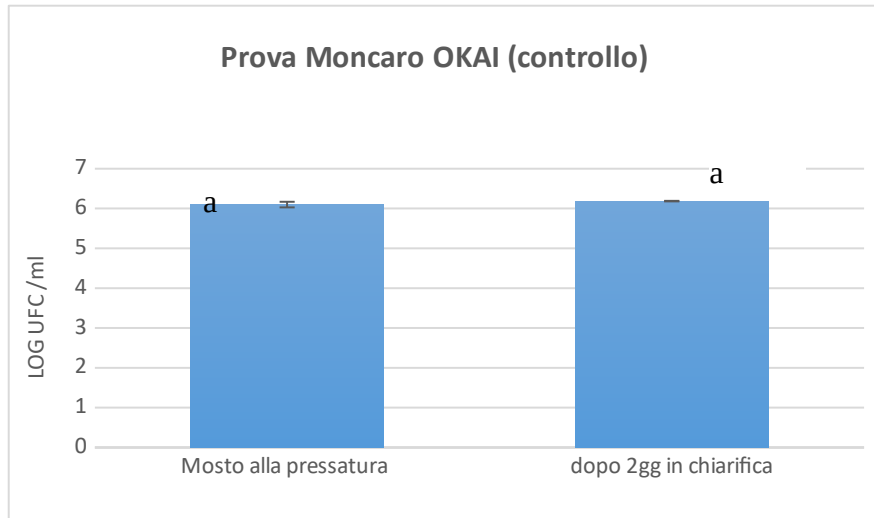
Dall'istogramma si può notare che la concentrazione di *H. uvarum* diminuisce di quasi un ordine di grandezza passando da una concentrazione di 10^6 CFU/ml a circa 10^5 CFU/ml.

Figura 11: Effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



La corrispondente tesi di controllo riportata in Fig 12 non mostra alcun cambiamento significativo nella concentrazione della popolazione di *H. uvarum* dopo due giorni di chiarifica.

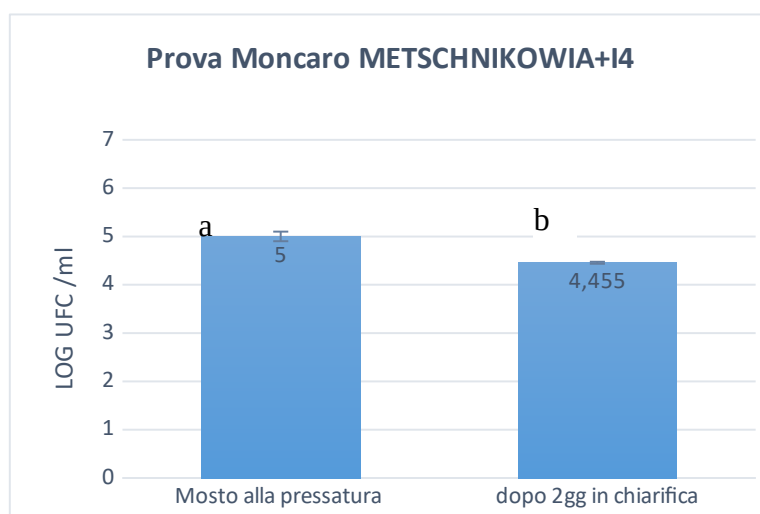
Figura 12: Assenza di effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



Nella Fig 13 viene riportata l'evoluzione di *H. uvarum* in funzione dell'inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e il ceppo *S. cerevisiae* I4.

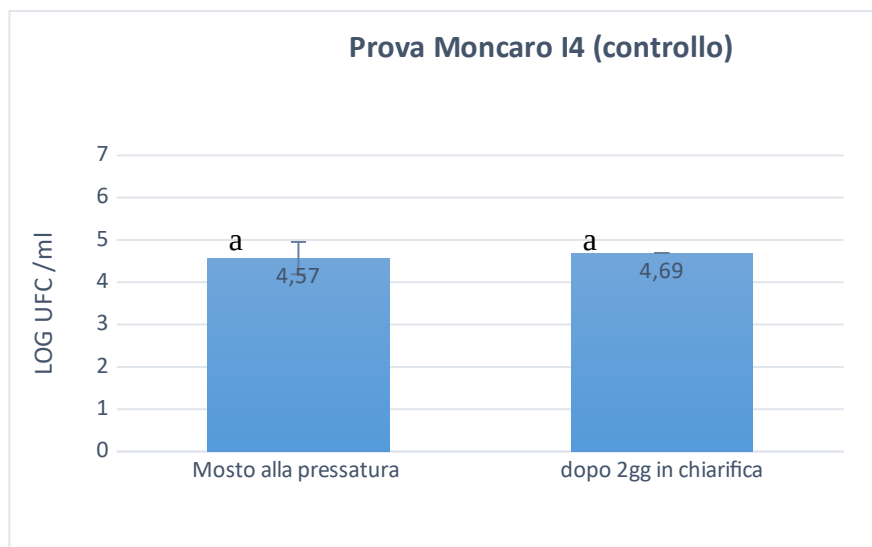
Anche in questo caso la variazione di concentrazione di *H. uvarum* è statisticamente significativa e passa da 10^5 CFU/ml a circa 10^4 CFU/ml.

Figura 13: Effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



La corrispondente tesi di controllo riportata in Fig 14 non mostra alcun cambiamento significativo nella concentrazione della popolazione di *H. uvarum* dopo due giorni di chiarifica.

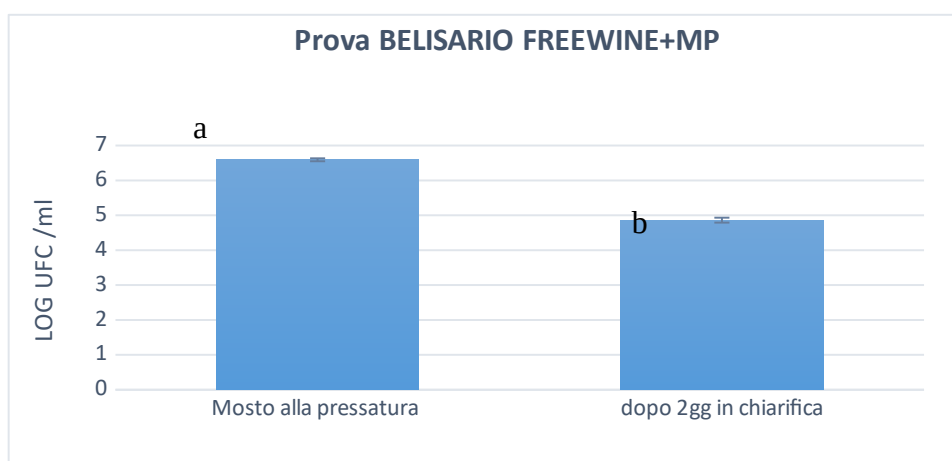
Figura 14: Assenza di effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



Nella Fig 15 viene riportata l'evoluzione di *H. uvarum* in funzione dell'inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e il ceppo *S. cerevisiae* FREEWINE.

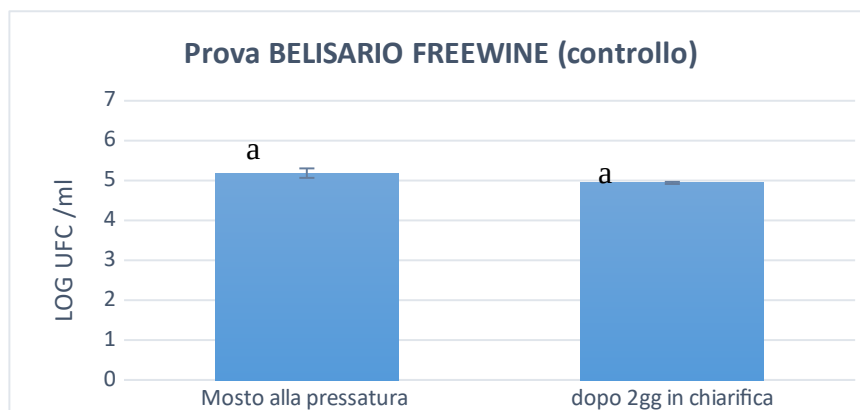
Anche in questo caso la variazione di concentrazione microbica di *H. uvarum* è statisticamente significativa e passa da circa 10^7 CFU/ml a circa 10^5 CFU/ml.

Figura 15: Effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



La corrispondente tesi di controllo riportata in Fig 16 non mostra alcun cambiamento significativo nella concentrazione della popolazione di *H. uvarum* dopo due giorni di chiarifica.

Figura 16: Assenza di Effetto di *M. pulcherrima* su *H. uvarum*



4.3. Effetto di *M. Pulcherrima* su *Saccharomyces* selvaggi

è stato inoltre valutato l'effetto di *M. pulcherrima* sui lieviti *Saccharomyces* selvaggi (Fig 17).

Il campione di controllo e il campione che verrà inoculato con *M. pulcherrima* mostrano lo stesso livello iniziale di *Saccharomyces* selvaggi presenti naturalmente sul mosto, derivanti quindi dal campo o più probabilmente dalle attrezzature vitivinicole.

A seguito dell'inoculo di *M. pulcherrima* si apprezza una diminuzione di lieviti selvaggi di circa un ordine di grandezza, si passa infatti da una concentrazione di 10^6 UFC/log a circa 10^5 UFC/log evidenziando così la sensibilità a *M. pulcherrima* di alcuni *Saccharomyces*.

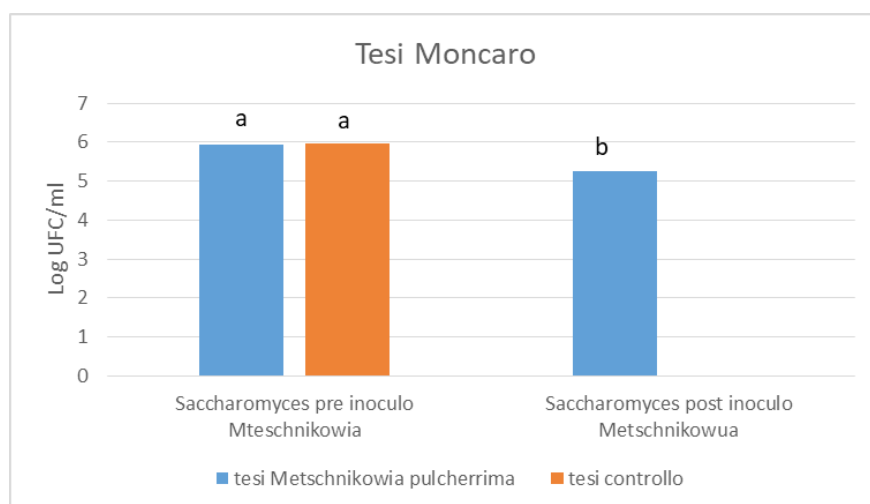


Figura 17: Effetto di *M. pulcherrima* su *Saccharomyces* selvaggi

4.4. Evoluzione della popolazione microbica

Si confrontano le cinetiche di crescita degli inoculi sequenziali con i rispettivi controlli privi di *M. pulcherrima*.

Gli aspetti principali che evincono dall'analisi dei risultati sono:

1. la scomparsa totale di *H. uvarum* dal mezzo è anticipata nelle tesi con inoculi sequenziali e/o la decrescita di *H. uvarum* inizia precocemente nelle tesi sequenziali rispetto al controllo.
2. la popolazione dello starter *S. cerevisiae* raggiunge il suo massimo in concomitanza della scomparsa degli apiculati nel mezzo. Nelle tesi di fermentazioni miste il raggiungimento del massimo (di concentrazione) avviene prima e ad un valore di concentrazione più alto rispetto i controlli.

La prova condotta con inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e *S. cerevisiae* OKAI mostra una cinetica di crescita descritta dalla Fig 18.

Al momento dell'inoculo la popolazione di *S. cerevisiae* ha una concentrazione di circa 10^6 UFC/ml ed aumenta in concomitanza della diminuzione di *H. uvarum* fino ad arrivare al suo massimo al quinto giorno di fermentazione in cui supera i 10^8 UFC/ml.

Dopo 5 giorni di fermentazione si vede anche la scomparsa della popolazione di *H. uvarum* la cui curva di crescita è descritta da un progressivo decremento di concentrazione.

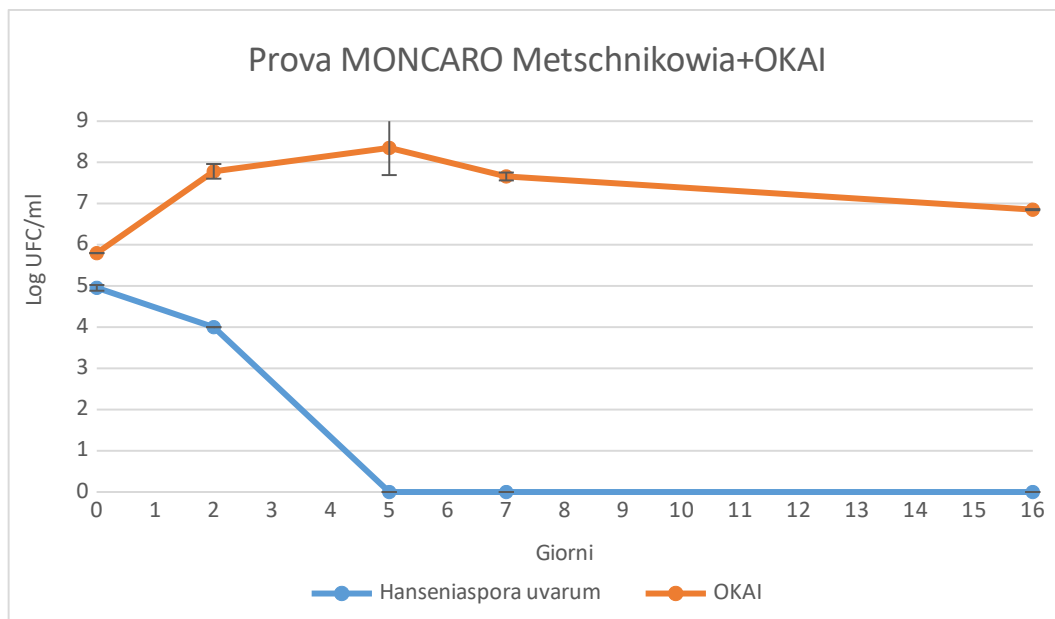


Figura 18: evoluzione di *H. uvarum* nella prova con *M. pulcherrima* e il ceppo OKAI

Nella tesi di controllo (Fig.19) si nota che *S. Cerevisiae* OKAI non arriva alla concentrazione di 10^8 UFC/ml e la popolazione rimane per lo più costante per tutto il processo fermentativo.

Per quanto riguarda *H. uvarum* la sua scomparsa dal mezzo avviene nel settimo giorno di fermentazione ed è preceduto da un momento di stasi in cui la popolazione rimane costante ad una concentrazione di 10^3 UFC/ml.

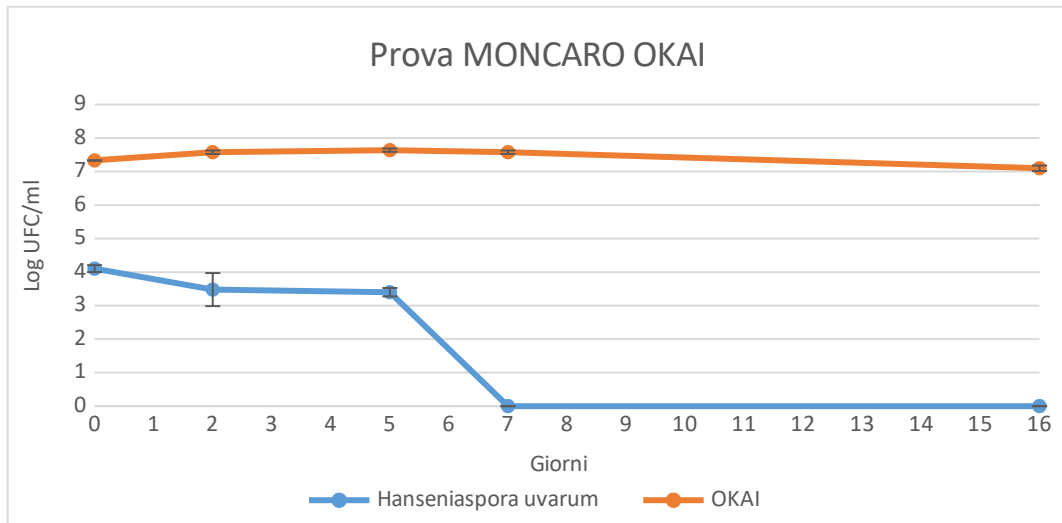


Figura 19: evoluzione di *H. uvarum* e *S. cerevisiae* OKAI nella prova di controllo

La tesi condotta con inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* e *S. cerevisiae* I4 mostra una cinetica speculare tra *H. uvarum* e lo starter in quanto al calare del primo il secondo intensifica la sua presenza nel mezzo.

Come mostra la Fig 20 la concentrazione iniziale di *S. cerevisiae* è di 10^6 UFC/ml e vede un progressivo aumento fino al settimo giorno di fermentazione, quando arriva a quasi 10^8 UFC/ml.

Al al settimo giorno di fermentazione avviene anche la scomparsa dal mezzo di *H. uvarum* la cui cinetica di crescita è descritta da un progressivo decremento eccetto per i primi due giorni che seguono l'inoculo dello starter che vedono la popolazione di apiculati stabile a 10^5 UFC/ml.

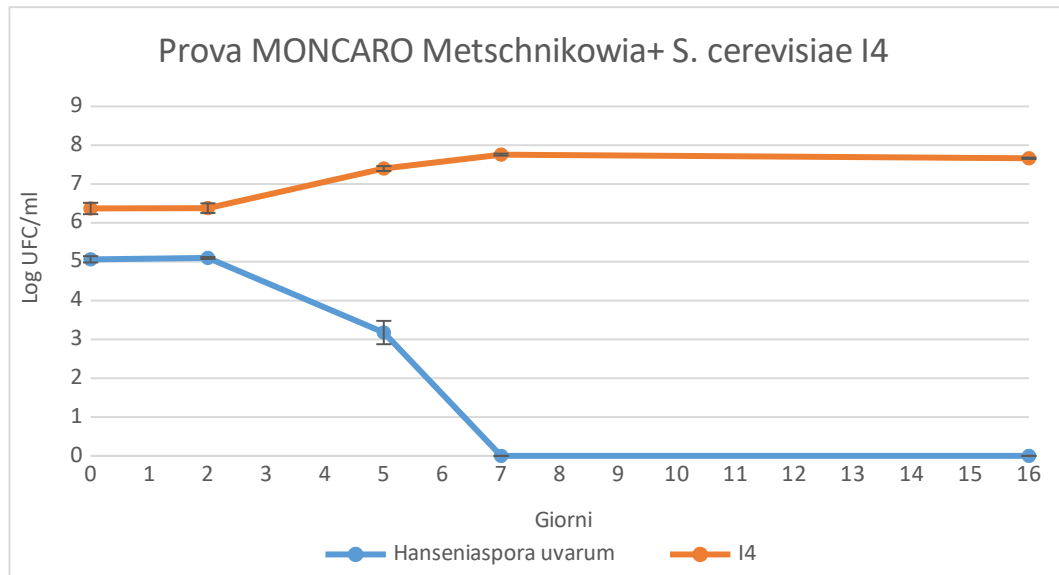


Figura 20: evoluzione di *H. uvarum* nella prova con *M. pulcherrima* e il ceppo I4

Nella prova di controllo come mostra la Fig 21, entrambe le popolazioni crescono (*S. cerevisiae* di 3 ordini di grandezza e *H. uvarum* di un ordine di grandezza) in modo concorde per i primi due giorni che seguono l'inoculo dello starter per poi rientrare negli schemi canonici di cinetica viste precedentemente in cui l'annullamento della popolazione di *H. uvarum* corrisponde al massimo di crescita di *S. cerevisiae*.

Questo momento è rappresentato dal settimo giorno di fermentazione dove *S. cerevisiae* conta quasi 10^8 UFC/ml.

Si evince che *H. uvarum* persiste di più nel mezzo rispetto l'inoculo misto.

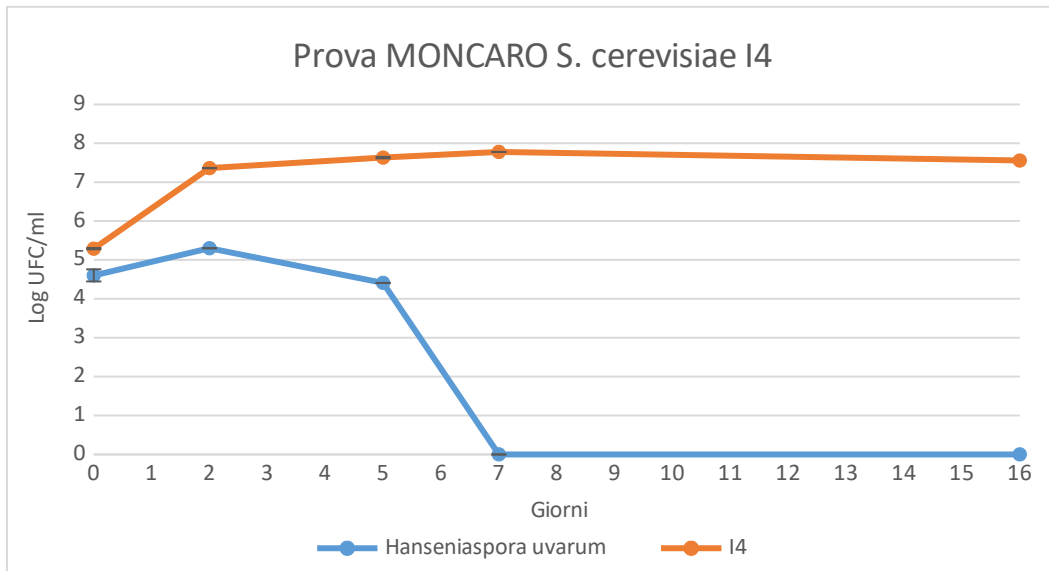


Figura 21: evoluzione di *H. uvarum* e *S. Cerevisiae* I4 nella prova di controllo

Le Fig 22 e 23 riportano l'evoluzione della popolazione microbica delle prove condotte nella contina Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola.

Nella fig. 22 relativa alla fermentazione sequenziale di *M. pulcherrima* /*S. cerevisiae* FREEWINE, la concentrazione di *H. uvarum* diminuisce al settimo giorno di fermentazione come nella prova condotta solo con il ceppo starter FREEWINE ma con un decremento della popolazione di apiculati di 2 log CFU/ml. L'evoluzione del ceppo starter sia in fermentazione sequenziale che coltura pura non ha evidenziato differenze.

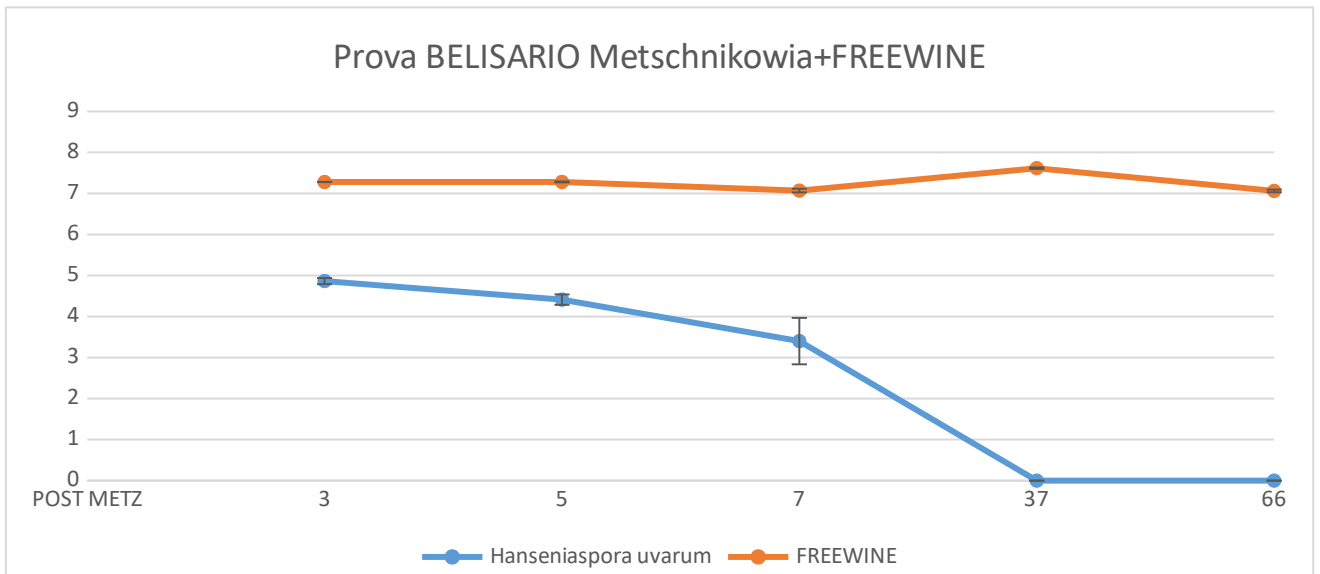


Figura 22: evoluzione di *H. uvarum* nella prova con *M. pulcherrima* e il ceppo FREEWINE

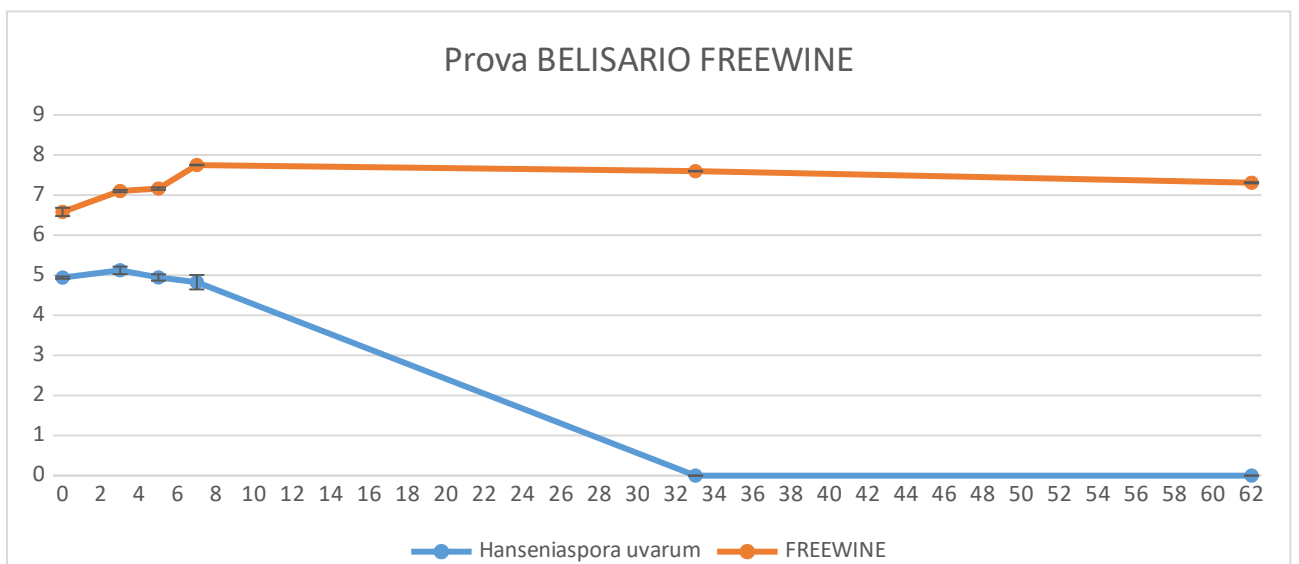


Figura 23: evoluzione di *H. uvarum* e *S. Cerevisiae* FREEWINE nella prova di controllo

4.5. Cinetica fermentativa

I dati relativi alla cinetica fermentativa sono riportati nella Fig 24.

La cinetica fermentativa ottenuta dal consumo degli zuccheri nel corso della fermentazione, mostra che la tesi con *M. pulcherrima* in fermentazione sequenziale con *S. cerevisiae* I4 ha esibito una cinetica fermentativa più veloce rispetto le altre fermentazioni.

Infatti, dopo 12 giorni di fermentazione viene consumato tutto lo zucchero presente nel substrato.

La tesi *M. pulcherrima* in fermentazione sequenziale con *S. cerevisiae* OKAI e la tesi di controllo con solo *S. cerevisiae* OKAI mostrano cinetiche di fermentazione simili arrivando a consumare tutti gli zuccheri rispettivamente il tredicesimo e il quattordicesimo giorno dopo l'inoculo.

La tesi *S. cerevisiae* OKAI mostra comunque un maggior vigore fermentativo rispetto l'inoculo di solo *S. cerevisiae* I4 dopo 14 giorni di fermentazione presenta 20 g/l di zuccheri residui.

È possibile apprezzare che il più efficiente, ovvero il lievito che riesce a trasformare più massa zuccherina nell'unità di tempo è proprio la tesi composta da *M. pulcherrima*/I4, infatti questa tesi consuma tutti gli zuccheri il 12esimo giorno dopo l'inoculo dello starter.

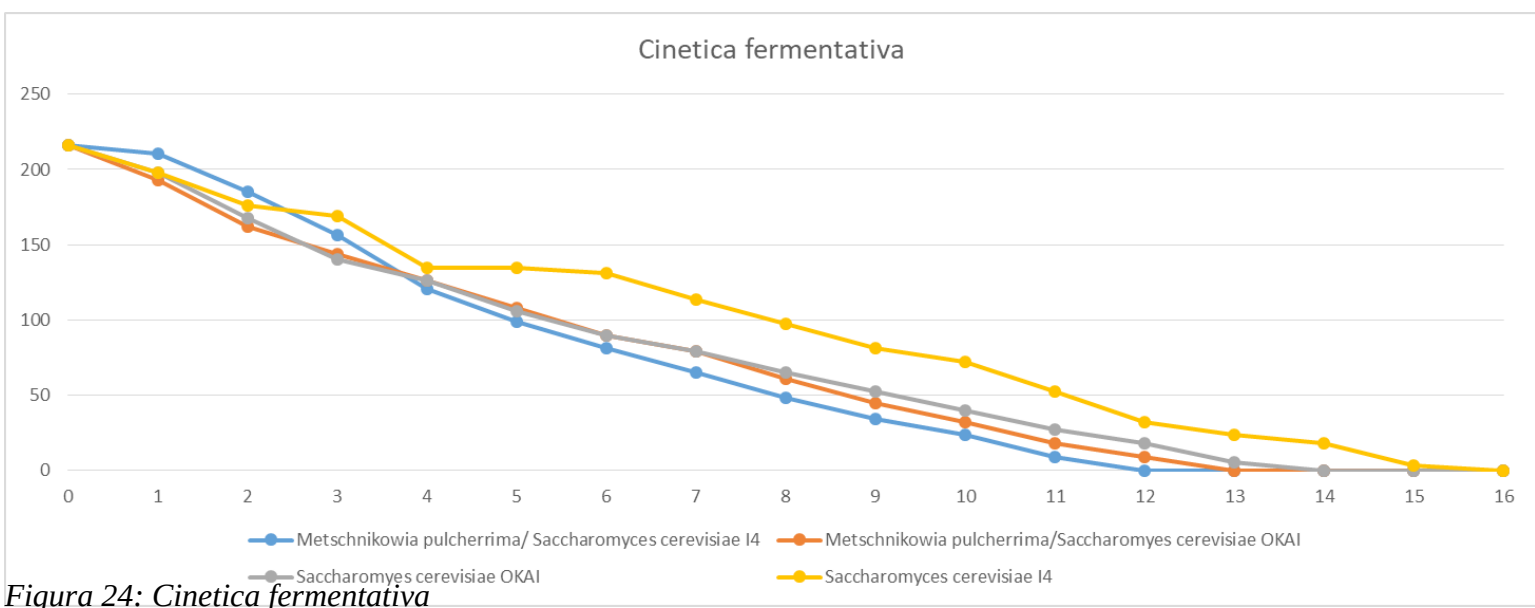


Figura 24: Cinetica fermentativa

4.6. Acidità totale, acidità volatile, pH, SO₂ e Acido Malico

	Acidità totale (g/l acido tartarico)	Acidità volatile (g/l acido acetico)	pH	SO₂ g/l	Acido malico g/l
<i>M. pulcherrima</i> /OKA I	5,04 g/l	0,23 g/l	3,40 g/l	27,00 g/l	1,20 g/l
OKAI	5,39 g/l	0,25 g/l	3,44 g/l	27,00 g/l	1,60 g/l
<i>M. pulcherrima</i> /I4	5,11 g/l	0,20 g/l	3,44 g/l	58 g/l	1,6 g/l
I4	6,13 g/l	0,25 g/l	3,28 g/l	50 g/l	1,6 g/l

Tabella 2: Principali caratteri analitici dei vini ottenuti

Le prove condotte presso la cantina terre Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agricola hanno evidenziato un incremento dell'acidità totale nei vini ottenuti in fermentazione pure con *S. cerevisiae* I4, mentre un decremento di SO₂ è stata evidenziata nelle tesi con *M. pulcherima* /OKAI e con *S. cerevisiae* OKAI. Per gli altri caratteri analizzati non si denotato differenze tra le prove.

	Acidità totale (g/l acido tartarico)	Acidità volatile (g/l acido acetico)	pH	SO₂ g/l	Acido malico g/l
<i>M. pulcherrima</i> /FRE EWINE	6,06 g/l	0,45 g/l	3,32 g/l		0,06 g/l
FREEWINE	4,80 g/l	0,45 g/l	3,51 g/l		0,31 g/l

Tabella 3: Principali caratteri analitici dei vini ottenuti

Relativamente alle prove condotte presso Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola l'inoculo sequenziale di *M. pulcherima* /FREEWINE rispetto al controllo ha incrementato la produzione di acidità totale, si passa infatti da una produzione di acidità totale di 4.80 g/l a 6.06 g/l nell'inoculo sequenziale.

Per quanto riguarda l'acidità volatile questa non subisce alcuna variazione in relazione alla presenza di *M. pulcherima*.

4.7 . Evoluzione dei principali composti volatili

I principali composti volatili (tabella 2 e 3), responsabili del bouquet aromatico del vino sono stati analizzati a fine fermentazione.

Nella tabella 2 sono riportati i dati relativi alle vinificazioni effettuate a Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agricola.

<u>MONCARO</u>	<i>M.</i> <i>pulcherrima</i> /OK AI mg/L	OKAI mg/L	<i>M.</i> <i>pulcherrima</i> /I4 mg/L	I4 mg/L
ESTERI				
Etil butirrato	0,126 ± 0,007 ^b mg/L	0,064 ± 0,035 ^B mg/L	0,303 ± 0,075 ^A mg/L	0,148 ± 0,01 ^B mg/L
Etil acetato	27,011 ± 0,392 ^B mg/L	42,964 ± 0,360 ^A mg/L	25,670 ± 0,833 ^B mg/L	12,285 ± 0,971 ^C mg/L
Etil esanoato	0,194 ± 0,109 ^A mg/L	0,041 ± 0,003 ^A mg/L	0,130 ± 0,020 ^A mg/L	0,037 ± 0,001 ^A mg/L
Acetato di isomile	0,914 ± 0,287 ^{AB} mg/L	0,517 ± 0,171 ^{AB} mg/L	1,029 ± 0,314 ^A mg/L	0,307 ± 0,001 ^B mg/L
ALCOLI				
propanolo	75,836 ± 0,335 ^B mg/L	104,792 ± 5,040 ^A mg/L	31,835 ± 0,154 ^C mg/L	13,983 ± 0,183 ^D mg/L
Isobutanolo	11,542 ± 0,769 ^B	13,832 ±	13,121 ± 0,521	13,798 ±

	mg/L	0,572 ^A mg/L	^{AB} mg/L	0,830 ^A mg/L
Amilicoattivo	6,414 ± 0,902 ^B mg/L	9,764 ± 0,091 ^A mg/L	9,871 ± 3,411 ^A mg/L	19,507 ± 1,354 ^B mg/L
Isoamilico	89,496 ± 1,089 ^B mg/L	110,185 ± 0,014 ^A mg/L	13,99 ± 7,096 ^C mg/L	94,734 ± 3,083 ^B mg/L
2-Phenyl ethanol	13,122 ± 0,333 ^{AB} mg/L	16,052 ± 0,206 ^A mg/L	19,043 ± 0,273 ^A mg/L	8,082 ± 0,237 ^B mg/L
COMPOSTI CARBONILIC I				
acetaldeide	1,408 ± 0,249 ^C mg/L	3,809 ± 0,937 ^C mg/L	7,973 ± 1,166 ^B mg/L	13,980 ± 1,366 ^A mg/L
MONOTERPE NI				
Linalolo	1,81 ± 0,100 ^{AB} mg/L	0,371 ± 0,147 ^A mg/L	0,221 ± 0,054 ^{AB} mg/L	0,028 ± 0,008 ^B mg/L
Geraniolo	0,025 ± 0,011 ^A mg/L	0,036 ± 0,015 ^A mg/L	0,038 ± 0,012 ^A mg/L	0,014 ± 0,008 ^A mg/L
Nerolo	0,074 ± 0,055 ^A mg/L	0,202 ± 0,140 ^A mg/L	0,136 ± 0,022 ^A mg/L	0,028 ± 0,008 ^A mg/L
TIOLI VOLATILI	ng/L			

3-Mercaptoesan-1-olo	388.9 ± 0.0 ng/L	367.1 ± 0.0 ng/L	1215.1±0.0 ng/L	
3-Mercaptoesil acetato	35.7 ± 0.0 ng/L	52.8± 0.0 ng/L	181.8±0.0 ng/L	

Tabella 4: evoluzione dei principali composti volatili

Per quanto riguarda la produzione di etil butirato (responsabile della nota fruttata di ananas) la fermentazione mista *M. pulcherrima*/I4 ha prodotto un incremento significativo di questo composto nel vino con un contenuto pari a 0.303mg/l

Il contenuto di etil acetato mostra una differenza statisticamente significativa nella fermentazione con lo starter *S. cerevisiae* OKAI. Solo la prova condotta con *S. cerevisiae* I4 ha evidenziato un contenuto significativamente più basso di tale composto, mentre le altre tesi una concentrazione intermedia.

Per quanto riguarda la produzione di etil esanoato (responsabile della nota di pesca) le tesi non hanno mostrato differenze significative.

L'acetato di isomile (aroma di banana), ha mostrato un incremento significativo nella prova condotta con *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* I4 in fermentazione sequenziale con *S. cerevisiae* I4.

Per quanto riguarda il contenuto di alcoli i risultati hanno evidenziato un aumento significativo del contenuto di n-propanolo e alcol isoamilico nella tesi condotta con *S. cerevisiae* OKAI.

Inoltre, l'impegno dei due ceppi di *S. cerevisiae* hanno evidenziato un aumento significativo di isobutanolo. L'impiego dello starter OKAI in coltura pura e *M. pulcherrima*/ I4 hanno mostrato un incremento significativo nel contenuto di alcoli amilico attivo e β -fenil etanolo.

L'acetaldeide è un composto carbonilico ed esprime una differenza significativa solo nella prova condotta con *S. cerevisiae* I4. La prova condotta con l'inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* evidenzia un dimezzamento della produzione di tale composto.

Per quanto riguarda i monoterpeni, solo il linalolo mostra delle leggere differenze tra le tesi, suggerendo che la presenza *M. pulcherrima* ha, anche se non molto marcato, effetto sulla produzione di questo composto.

Nella prova condotta con *S. cerevisiae* OKAI, la presenza di *M. pulcherrima* induce un aumento della produzione di tale composto nel vino, mentre nella prova condotta con *S. cerevisiae* I4 ne determina una leggera diminuzione.

Geraniolo e Nerolo (terpeni che contribuisce al classico aroma floreale) non hanno mostrato differenze significative

Infine per quanto riguarda i Tioli volatili, composti solforati espressi in ng/L e considerati responsabili dell'intenso aroma di frutta tropicale (soprattutto pompelmo e frutto della passione).

I precursori di tali molecole sono presenti nei mosti come composti non odorosi, ma grazie all'idrolisi ad opera dei lieviti, vengono trasformati nei tioli aromatici corrispondenti.

Non essendo odorose, queste molecole non sono presenti come tali nei mosti, ma sono presenti sotto forma di precursori d'aroma che, grazie all'idrolisi ad opera dei lieviti, vengono trasformati nei tioli aromatici corrispondenti. E' durante la fermentazione alcolica che si sviluppa l'aromaticità.

Come riportato in tabella si può notare come la tesi *M.pulcherrima/S.cerevisiae* I4 produce una concentrazione di questi composti nettamente superiore rispetto alle altre due tesi con *M.pulcherrima/S. cerevisaie* OKAI e OKAI controllo. In questo caso, la produzione di tali

composti è dunque influenzata dalla tipologia di starter inoculato, piuttosto che dalla presenza o meno di *M. pulcherrima*.

Nella tabella 3 sono riportati i valori dei principali composti volatili dei vini ottenuti nella cantina Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola.

BELISARIO	<i>M. pulcherrima</i> /FREEWINE	<i>S. cerevisiae</i> FREEWINE
ESTERI		
Etil butirato	0,171 ± 0,07 ^B mg/L	0,860 ± 0,155 ^A mg/L
Etil acetato	29,588 ± 1,927 ^A mg/L	29,748 ± 0,465 ^A mg/L
Etil esanoato	0,060 ± 0,037 ^B mg/L	0,310 ± 0,041 ^A mg/L
Acetato di isoamile	0,631 ± 0,128 ^B mg/L	0,860 ± 0,155 ^A mg/L
ALCOLI		
Propanolo	14,985 ± 0,737 ^A mg/L	14,739 ± 1,328 ^A mg/L
Isobutanolo	16,215 ± 0,640 ^A mg/L	16,334 ± 0,323 ^A mg/L
Amilicoattivo	17,382 ± 0,257 ^A mg/L	15,753 ± 1,707 ^A mg/L
Isoamilico	136,002 ± 3,960 ^A mg/L	131,087 ± 4,600 ^A mg/L
2-Phenyl ethanol	13,061 ± 0,192 ^A mg/L	19,725 ± 0,393 ^A mg/L
COMPOSTI CARBONILICI		
Acetaldeide	4,890 ± 2,225 ^A mg/L	4,184 ± 1,940 ^A mg/L

MONOTERPENI		
Linalolo	0,071 ± 0,023 ^A mg/L	0,079 ± 0,029 ^A mg/L
Geraniolo	0,050 ± 0,004 ^A mg/L	0,030 ± 0,010 ^A mg/L
Nerolo	0,222 ± 0,000 ^A mg/L	0,149 ± 0,078 ^A mg/L

Tabella 5: evoluzione dei principali composti volatili

I risultati ottenuti mostrano che solo l'impiego del ceppo starter FREEWINE, ha prodotto vini con quantitativi significativamente più elevati di etil butirrato e acetato di isoamile rispetto alle fermentazioni sequenziali con *M. pulcherrima*. Infatti, per tutti gli altri composti analizzati, non si sono evidenziate differenze significative tra le due prove testate, sottolineando che il ceppo non-*Saccharomyces* non ha contribuito al profilo aromatico.

5. CONCLUSIONI

Dopo essere stati considerati per decenni lieviti alterativi, il potenziale delle specie non-*Saccharomyces* per aumentare la complessità aromatica e migliorare le proprietà sensoriali dei vini è stato riconosciuto, e alcuni ceppi non-*Saccharomyces* sono già disponibili sul mercato come lieviti secchi attivi. I ceppi non-*Saccharomyces* sono stati utilizzati con successo per diminuire il contenuto finale di etanolo nei vini (Contreras et al., 2014; Varela et al., 2016; Brou et al., 2018) o per la diversificazione del profilo aromatico del prodotto, aumentando sia la formazione di aromi fermentativi sia il rilascio di aromi varietali grazie alla loro capacità di espellere enzimi idrolitici (Egli et al., 2002; Rodríguez et al., 2010; Zott et al., 2011; Belda et al., 2017).

La crescente domanda di vini “naturali” e certificati biologici ha aperto una nuova frontiera per i lieviti non-*Saccharomyces* come agenti bioprotettori, infatti il profilo aromatico del vino va

tutelato sia evitando l'uso di un numero limitato di ceppi commerciali di *S. cerevisiae* come colture starter, sia evitando lo sviluppo di lieviti non desiderati (spoilage) che portano ad avere un prodotto finale con difetti sensoriali.

Questo lavoro è stato condotto con l'obiettivo principale di confrontare le fermentazioni svolte da colture pure di *S. cerevisiae* e da inoculi sequenziali di *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae*.

Le prove sono state condotte su scala semi-industriale in collaborazione con le aziende vinicole Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agricola e Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola che hanno messo a disposizione parte dei loro mosti e delle loro cisterne in cantina.

Lo studio è stato suddiviso in due parti.

La prima parte riguarda i trattamenti effettuati in vigna sulle viti e le analisi volgono alla valutazione della popolazione microbica prima e dopo trattamento con acqua ozonata (Moncaro) e IDROVITIS (Terre di Matelica Belisario Soc. Coop. Agricola).

I risultati ottenuti da conte microbiche colturali effettuate su campioni pre e post trattamento, evidenziano che l'uso di acqua ozonata, non apporta nessun cambiamento nella popolazione microbica presente sugli acini.

Come dimostrato dallo studio condotto da Marco S. Lucas et al 2010, l'ozono ha un grande effetto antimicrobico dovuto al suo forte potere ossidante, ciò suggerisce che il motivo di tale inefficienza come microbicida sia dovuto al semplice fatto che la vigna essendo un ambiente aperto permette un rapido turnover di microrganismi che porta ad un rapido ripristino della comunità microbica originaria a poche ore dal trattamento.

Il trattamento con IDROVITIS invece sembra avere un effetto antimicrobico sulla popolazione di *H. uvarum* in quanto ne diminuisce la concentrazione.

Dopo la raccolta, le uve sono state pigiate e il mosto inoculato con *M. pulcherrima* ad una concentrazione di 10^6 cellule/ml

Dopo due giorni di chiarifica è stata valutata l'efficacia di bio controllo di *M. pulcherrima* sulla popolazione di lieviti apiculati

Dai risultati si evince indubitabilmente che *M. pulcherrima* esercita un'azione antimicrobica su *H. uvarum* come è stato anche dimostrato da Antonio M. Et al.

È altrettanto evidente che *M. pulcherrima* eserciti un effetto antimicrobico sulle popolazioni di *S. cerevisiae* selvaggi presenti naturalmente sulle uve.

La seconda parte della prova comprende tutte le analisi effettuate dopo l'inoculo del ceppo starter *S. Cerevisiae*.

In questo studio sono stati utilizzati 3 ceppi diversi di *S. cerevisiae* (OKAI, I4 e FREEWINE) usati in inoculo sequenziale con *M. pulcherrima* o da soli nelle tesi di controllo.

A causa delle sue specificità fenotipiche, l'inoculo sequenziale con *M. pulcherrima* ha portato a modifiche dell'evoluzione di popolazione, della cinetica di fermentazione e della produzione di metaboliti e aromi centrali del carbonio rispetto le tesi di controllo inoculate con solo *S. cerevisiae* selezionato.

Per quanto riguarda la dinamica di popolazione, l'inoculo sequenziale di *M. pulcherrima* con i 3 ceppi *S. cerevisiae*, mostra un comportamento uniforme in quanto in tutte le prove si registra una riduzione anticipata della popolazione di *H. uvarum* associata ad un anticipato sviluppo dello starter *S. cerevisiae* rispetto le prove di controllo.

In tutte le prove di controllo in cui è stato inoculato solo lo starter *S. cerevisiae* (OKAI, I4 e FREEWINE) la scomparsa di *H. uvarum* avviene più lentamente rafforzando l'affermazione che *M. pulcherrima* produce un'azione antimicrobica nei confronti di *H. uvarum*.

Un aspetto altrettanto interessante è che la presenza di *M. pulcherrima* conduce a importanti modificazioni della cinetica di fermentazione questo può essere legato, almeno in parte, all'esaurimento di alcune fonti di azoto da parte di *M. pulcherrima* durante la prima parte della fermentazione come suggerisce anche lo studio svolto da Pauline S. et al. 2020.

Anche per quanto riguarda la produzione dei composti secondari e i composti volatili la presenza di *M. pulcherrima* porta a delle modificazioni nella distribuzione dei flussi di carbonio che è ceppo specifica al partner di fermentazione, infatti non c'è un comportamento

uniforme in quanto con alcuni ceppi di *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* accentua la produzione di un determinato composto mentre con altri ceppi di *S. cerevisiae*, la presenza di *M. pulcherrima* determina una diminuzione nella produzione di tale composto.

Nello specifico questo comportamento è stato significativamente evidente per l'etil acetato, il propanolo, l'amilico attivo, il 2-fenil etanolo e linalolo dove la presenza di *M. pulcherrima* nelle fermentazioni miste, mostra tra i ceppi starter di *S. cerevisiae* comportamenti opposti.

La conclusione che si può trarre da questo studio è che *M. pulcherrima* ha un effetto antimicrobico nei confronti di *H. uvarum* e sulle popolazioni di *S. cerevisiae* selvaggi e ciò lo rende un potenziale agente sostitutivo della SO₂ per il controllo dello sviluppo di microrganismi indesiderati nel vino, mentre per quanto riguarda la produzione di composti secondari e volatili *M. pulcherrima* ha un comportamento altamente ceppo specifico in relazione allo starter *S. cerevisiae* con cui viene inculato.

Queste differenze derivano da interazioni metaboliche tra le due specie, che possono essere attribuite, almeno in parte, alle regolazioni in *S. cerevisiae* legate ai cambiamenti ambientali indotti dalla crescita di *M. pulcherrima* (consumo di nutrienti, produzione di metaboliti...). Tuttavia, le basi metaboliche e molecolari che governano queste interazioni non sono chiare e richiederanno studi approfonditi per comprendere a fondo quali siano le caratteristiche necessarie che rendano due microrganismi ottimi partner di fermentazione.

6. BIBLIOGRAFIA

- Lorenzo N, Taboada J, Ramos M, (2012) Influence of climate on grape production and wine quality in the Rias Baixas, north-western Spain.
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (1998) Trattato di enologia II. Microbiologia del vino, vinificazioni. Edizioni Edagricole, Bologna.
- Lambrechts MG & Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. A review. S Afr J Enol Vitic, 21, pp. 97-129.
- Nord F. F. (1939) Facts and interpretations in the mechanism of alcoholic fermentation
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2008), Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. Journal of Applied Microbiology, 104: 1182-1191.
- Folch-Mallol, Garay-Arroyo, Lledías F, Covarrubias A: La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología 2004
- Cocolin L, Pepe V, Comitini F, Comi G, Ciani M: Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. FEMS Yeast Research 2004; 5: 37-245.
- Bartra E: Genética de levaduras. Estación de Viticultura y Enología de Vilafranca del Penedès, INCAVI 2000. Nº 3.
- Maqueda M, Zamora E, Álvarez M, Ramírez M: Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. Applied and Environmental Microbiology 2012; 78(3): 735-743.
- Mas A, Torija MJ, Beltrán G, Novo M, Hierro N, Oblat M, Rozés N, Guillamón JM: Selección de Levaduras. México DF, Alfa Editores Técnicos, 2006.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P: Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non- *Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res 2009; 10:123-133.

- Esteve-Zarzoso, Manzanares P, Ramón D, Querol A: The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International microbiology* 1998. 1: 143–148.
- I. Loira, R. Vejarano, M.A. Bañuelos, A. Morata, W. Tesfaye, C. Uthurry, A. Villa, I. Cintora, J.A. Suárez-Lepe, Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 59, Issue 2, Part 1, 2014, Pages 915-922, ISSN 0023-6438.
- Morata, Antonio; Loira, Iris; Tesfaye, Wendu; Bañuelos, María A.; González, Carmen; Suárez Lepe, José A. 2018. "Lachancea thermotolerans Applications in Wine Technology" *Fermentation* 4, no. 3: 53.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. and Suárez-Lepe, J.A. (2012), New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 47: 2101-2108.
- Vasileios Englezos, Simone Giacosa, Kalliopi Rantsiou, Luca Rolle, Luca Cocolin, *Starmarella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks, *Current Opinion in Food Science*, Volume 17, 2017, Pages 30-35, ISSN 2214-7993,
- Rabosto, X.; Carrau, M.; Paz, A.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau, F.M. Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006, 57, 332–338.
- Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 2011, 28, 873–882.
- Romano, P.; Granchi, L.; Caruso, M.; Borra, G.; Palla, G.; Fiore, C.; Ganucci, D.; Caligiani, A.; Brandolini, V. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 86, 163–168.

- Escott, C.; Loira, I.; Morata, A.; Bañuelos, M.A.; Antonio Suárez-Lepe, J. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. In *Yeast—Industrial Applications*; Morata, A., Loira, I., Eds.; InTech: London, UK, 2017; p. 98.
- Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 1209–1217.
- Spadaro, D.; Ciavarella, A.; Dianpeng, Z.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Can. J. Microbiol.* 2010, 56, 128–137.
- Ryu, D., Choi, B., Kim, E., Park, S., Paeng, H., Kim, C. I., ... Koh, E. (2015). Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and fermented foods sold in Korea. *Toxicological Research*, 31, 289.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23– 50
- De Filippis, F, Aponte, M., Piombino, P., Lisanti, M. T., Moio, L., Ercolini, D., & Blaiotta, G. (2018). Influence of microbial communities on the chemical and sensory features of Falanghina sweet passito wines. *Food Research International*, in press.
- Bartowsky, E. J. (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 149– 156.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications (Vol. 1)*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Stratford, M., & Rose A. H. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 1– 6.
- Vincenzini M., Romano P., & Farris G. A. (2005). *Microbiologia del vino*. Milan, Italy: Casa Editrice Ambrosiana.
- L. Waterhouse, Gavin L. Sacks, David W. Jeffery, 2016 *Understanding Wine Chemistry*

- Rauhut, D. (2009). Usage and formation of sulphur compounds. (pp. 181– 207). In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Wells, A., & Osborne, J. P. (2011). Production of SO₂ binding compounds and SO₂ by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation and the impact on malolactic fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32, 267– 279.
- Fazio, T., & Warner, C. R. (1990). A review of sulphites in foods: Analytical methodology and reported findings. *Food Additives & Contaminants*, 7, 433– 454.
- Costanigro, M., Appleby, C., & Menke, S. D. (2014). The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preference*, 31, 81– 89.
- Tredoux, H.G., Tracey, R.P. & Tromp, A., 1986. Killer factor in wine yeasts and its effect on fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 7, 105-112.
- Ciani, M. & Comitini, F., 2011. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* 61, 25-32.
- Marco S. Lucas, José A. Peres, Gianluca Li Puma, Treatment of winery wastewater by ozone-based advanced oxidation processes (O₃, O₃/UV and O₃/UV/H₂O₂) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics, *Separation and Purification Technology*, Volume 72, Issue 3, 2010, Pages 235-241
- Pauline Seguinot, Anne Ortiz-Julien and Carole Camarasa, Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation With *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*, 28 February 2020.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., and Varela, C. (2014). Evaluation of non-saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678. doi: 10.1128/AEM.03780-13
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., and Curtin, C. (2016). Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast

species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57–64. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.024

- Brou, P., Taillandier, P., Beaufort, S., and Brandam, C. (2018). Mixed culture fermentation using *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: impact of anaerobic growth factors. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 1699–1710. doi: 10.1007/s00217-018-3095-3
- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M., and Henick-Kling, T. (2002). 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. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., and Caballero, A. C. (2010). Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19–25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., et al. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 183–191. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., and Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 210–215. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026