



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale
in Biologia Molecolare e Applicata**

**I lieviti *non-Saccharomyces* come strategie fermentative
in vinificazione.**

***Non-Saccharomyces* yeasts as fermentation strategy in
winemaking.**

Tesi di laurea magistrale di
Francesco Pierucci

Relatore
Chiar.mo Prof. Maurizio Ciani

Correlatore
Chiar.ma Prof. Laura Canonico

Sessione estiva
Anno accademico 2023/2024

*Dedicato ai miei genitori e ai miei nonni,
che sin da bambino mi hanno fatto scoprire
la meraviglia della Scienza e della Natura.*

INDICE:

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	7
1.1 Processo di vinificazione.....	7
1.1.1 Raccolta delle uve.....	7
1.1.2 Pigiatura e diraspatura.....	8
1.1.3 Vinificazione in bianco.....	9
1.1.4 Vinificazione in rosso.....	10
1.2 Processo d’Inerbimento.....	13
1.3 Biochimica della fermentazione alcolica.....	18
1.4 Fermentazione spontanea.....	20
1.5 Fermentazione inoculata o indotta.....	25
1.6 Fermentazione mista.....	29
1.6.1 Influenza sui principali caratteri analitici.....	31
1.6.2 Incremento degli aromi e della complessità aromatica.....	34
1.6.3 Riduzione di etanolo.....	36
1.6.4 Attività antimicrobica e biocontrollo.....	37
1.7 I lieviti non- <i>Saccharomyces</i> di interesse vinario.....	41
1.7.1 Genere <i>Hanseniaspora</i> (anamorfo <i>Kloeckera</i>).....	41

1.7.2 Genere *Metschnikowia* (anamorfo *Candida pulcherrima*).....43

1.7.3 Genere *Starmerella*.....47

CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO.....52

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....54

3.1 Allestimento prove sperimentali.....54

3.1.1 Disegno sperimentale delle prove condotte.....54

3.1.2 Produzione di biomassa degli inoculi.....56

3.1.3 Avvio e gestione del processo fermentativo.....57

3.2 Monitoraggio dei processi fermentativi.....59

3.2.1 Acidità volatile.....60

3.2.2 Acidità totale.....62

3.2.3 Determinazione dell'acido Malico.....62

3.2.4 Determinazione degli zuccheri.....64

3.2.5 Determinazione dell'etanolo.....64

3.2.6 Determinazione del glicerolo.....65

3.3 Analisi microbiologiche.....68

3.3.1 Conte vitali.....	68
3.3.2 Terreni utilizzati.....	70
3.4 Gas cromatografia.....	71
3.4.1 Analisi dei composti volatili.....	71
3.4.2 Analisi alcoli superiori.....	74
3.5 Identificazione e analisi molecolari.....	77
3.5.1 Estrazione del DNA.....	78
3.5.2 Reazione di amplificazione tramite PCR.....	79
3.5.3 Elettroforesi su gel di agarosio.....	82
3.5.4 Sequenziamento.....	82
3.6 Analisi statistica.....	83
CAPITOLO 4 RISULTATI.....	84
4.1 Risultati prova: <i>M. pulcherrima</i> su Rosato.....	84
4.1.1 Conte ed evoluzione microbica.....	84
4.1.2 Valutazione attività di biocontrollo di <i>M. pulcherrima</i>	88
4.1.3 Analisi dati finali degli analiti.....	91
4.1.4 Analisi composti volatili e alcoli superiori prodotti.....	92
4.2 Analisi <i>S. bombicola</i> su Montepulciano.....	95

4.2.1 Risultati analisi molecolare e sequenziamento.....	95
4.2.2 Conte ed evoluzione microbica.....	97
4.2.3 Analisi dati finali degli analiti.....	101
4.2.4 Analisi composti volatili e alcoli superiori prodotti.....	102
CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	105
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA.....	111
RINGRAZIAMENTI.....	115

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Processo di vinificazione

La vinificazione è il processo che porta alla trasformazione del mosto in vino. Questo procedimento comprende tutte le fasi di lavorazione successive alla vendemmia, fino ad ottenere il vino pronto per la sua commercializzazione. Ogni fase del processo è caratterizzata da diverse scelte operative, che consentono di definire il prodotto finale entro i limiti stabiliti dalla tipologia di vino desiderata e dalle norme del disciplinare di produzione relativo. Vi è da precisare inoltre che esistono diversi tipi di vinificazioni, a seconda del prodotto che si vuole ottenere, come la vinificazione in bianco, la vinificazione in rosso e quella per i vini rosati, tuttavia, possono essere individuate delle tappe in comune ai differenti processi.

1.1.1 Raccolta delle uve

Non è scorretto considerare come punto iniziale della vinificazione la cura stessa della vite, che richiede infatti specifici accorgimenti durante l'intero periodo pre-fermentativo. La vendemmia rappresenta la fase iniziale del processo di vinificazione, in cui i grappoli vengono raccolti. La decisione su quando avviare questa operazione, e quindi il livello di maturazione delle uve

da raccogliere, dipende dal tipo di vitigno e dal risultato enologico desiderato. Lasciando l'uva più a lungo sulla vite, aumentano i livelli di zuccheri e pigmenti, mentre l'acidità del mosto diminuisce. Una vendemmia anticipata è preferibile per i vini bianchi destinati a essere consumati giovani e freschi, in particolare per gli spumanti. Per i vini destinati all'invecchiamento, si aspetta la maturazione fenolica, portando ad una raccolta più tardiva. Per i passiti o i vini da vendemmia tardiva, si attende la surmaturazione. In questa fase è molto importante considerare alcuni dei fattori che possono influire negativamente sulla qualità delle uve, quali: le alte temperature, la presenza di acqua e l'ammostamento dei grappoli durante la raccolta e la fase di trasporto dell'uva. Per una buona qualità del vino, soprattutto per le vinificazioni in bianco, è molto importante considerare lo stato delle uve che vengono trasportate in cantina ed è raccomandata la raccolta in cassette non troppo capienti ed un trattamento delle uve che sia il più attento e rispettoso possibile ^{1,2}.

1.1.2 Pigiatura e diraspatura

Una volta portata in cantina l'uva subisce il processo di diraspatura e pigiatura: il primo consiste nell'operazione di separazione degli acini dal rachide o raspo. La pigiatura consiste invece nella spremitura degli acini per separare la parte liquida dalle componenti solide (vinacce e vinaccioli), che, dopo un'eventuale

fase di macerazione insieme ai succhi, vengono rimosse dal mosto. L'operazione di diraspatura è effettuata con delle apposite diraspatrici, dotate di un sistema di pale rotanti che permettono la separazione degli acini dai raspi, mentre per quanto riguarda la pigiatura si tratta di un'operazione particolarmente sensibile che deve essere eseguita con cura, tramite delle pigiatrici a rulli. Entrambi i processi, soprattutto in tempi più recenti, possono essere eseguiti insieme, mediante delle pigiadiraspatrici³.

1.1.3 Vinificazione in bianco

La vinificazione in bianco viene effettuata senza la macerazione delle vinacce, evitando, cioè, il contatto del mosto (componente liquida) con le parti solide (bucce, semi e raspi), in modo da prevenire il trasferimento di tannini e sostanze polifenoliche, (presenti nei semi e bucce), responsabili della colorazione del vino. Successivamente alle fasi di diraspatura e pigiatura (in comune alle vinificazioni in rosso) si ha quindi la separazione del succo (mosto) dalle vinacce, che avviene sia per “libero sgrondo” che per leggera pressatura delle vinacce, con la finalità di far fuoriuscire dagli acini schiacciati la polpa interna⁴. Il mosto estratto subirà quindi degli ulteriori processi di “defecazione” e chiarificazione per andare a ridurre il contenuto in fecce grossolane e solidi sospesi, ricchi in sostanze polifenoliche e di enzimi ad attività ossidante, nei

mosti prima della fermentazione. Per attuare questa fase di pulizia si può ricorrere all'uso di coadiuvanti, quali: caseinato di potassio, bentonite, gelatina ed enzimi pectolitici, che permettono di facilitare ed accelerare l'iter di illimpidimento, per il quale potrebbero essere adoperate anche delle tecniche fisiche come: la filtrazione, flottazione e centrifugazione. Alla fase di sfecciatura fa poi seguito quella della fermentazione vera e propria, nella quale avverranno i fenomeni di trasformazione degli zuccheri ad opera dei lieviti, con produzione di metaboliti secondari che andranno a comporre corpo e bouquet del vino; in questa fase è molto importante, per un risultato qualitativamente valido, che la fermentazione avvenga a temperatura controllata, (18-22°C), per evitare il più possibile la perdita di composti aromatici e regolare il corso del processo fermentativo. Terminata la fase cruciale della fermentazione, il vino va incontro a degli step successivi di affinamento, stabilizzazione e conservazione prima di essere pronto per il confezionamento finale del prodotto ¹.

1.1.4 Vinificazione in rosso

Diversamente dalla vinificazione in bianco, la produzione del vino rosso include una fase così detta di macerazione, durante la quale le bucce dell'uva restano a contatto con il mosto nel corso della fermentazione. Tramite il

processo di macerazione, che solitamente avviene in contemporanea al processo fermentativo, il vino acquisisce antociani e tannini, sostanze contenute nelle bucce, semi e raspi, che contribuiscono rispettivamente al colore, alla struttura e corpo finale del vino; la qualità del vino rosso e la sua stabilità dipendono quindi principalmente dalla tipologia e concentrazione di composti fenolici presenti nelle uve e dalla loro estrazione nel mosto e nel vino, che si verifica durante la fase di fermentazione sulle bucce ⁵. In fase di pre-fermentazione è diffuso inoltre l'utilizzo di enzimi pectolitici di macerazione con attività di emicellulasi, cellulasi e proteasi, che grazie all'azione di parziale distruzione delle cellule vegetali, permettono la liberazione di composti tannici e polisaccaridi già nelle prime fasi di macerazione. Inoltre, è consigliato effettuare il processo di fermentazione/macerazione ad una temperatura controllata di 25-30°C, poiché al di sotto di questi valori si può verificare una scarsa estrazione delle sostanze coloranti e al di sopra un'eccessiva estrazione di composti tannici ¹.

La durata della macerazione varia in base al tipo di vino che si desidera produrre: dai 4 ai 7 giorni per vini freschi e fruttati da consumare giovani, e dai 15 ai 20 giorni per vini ricchi di tannini, pensati per un lungo invecchiamento. Gli antociani, infatti, raggiungono il loro picco di rilascio dopo 2-5 giorni, per

poi decrescere. Al contrario, il rilascio dei tannini avviene in modo graduale, rallentando dopo 10-20 giorni. L'operazione di fermentazione viene inoltre accompagnata da procedure di rimontaggi e follature, che favoriscono il rimescolamento delle vinacce, aumentando l'estrazione e promuovendo l'omogeneizzazione della massa in fermentazione, evitando inoltre la risalita, (per effetto della CO₂), del cosiddetto "cappello" di bucce, dando continuità al contatto tra frazione solida e componente liquida ⁴. Alla fase di fermentazione segue lo stadio di svinatura, che permette la separazione del fermentato dalle parti solide, quest'ultime possono essere a loro volta pressate al fine di recuperare parte del vino rimasto a contatto con le bucce. Caratteristica della vinificazione in rosso è la fermentazione malolattica, che comporta la trasformazione dell'acido malico in acido lattico ed anidride carbonica per azione di batteri lattici anaerobi (*Oenococcus oeni* e *Lactococcus lactis*), questa conversione contribuisce a rendere il vino maggiormente stabile e ad ammorbidirne il gusto. Per permettere un avvio più rapido e sicuro del processo fermentativo è molto utile avvalersi di colture di batteri lattici selezionati, che però necessiteranno di un'attenta valutazione e monitoraggio dei fattori nutrizionali e limitanti presenti nell'ambiente del vino, quali: pH, concentrazione di SO₂ ed etanolo, che possono creare seri ostacoli allo sviluppo

dei batteri stessi e al corretto svolgimento dello step fermentativo ⁶. Infine, (così come visto per la vinificazione in bianco), il vino subirà prima uno step di chiarificazione e di successivo affinamento in botti di acciaio inox o di legno, al fine di conferire particolari e specifiche caratteristiche organolettiche, prima ancora di subire un iter di stabilizzazione, che lo renderà pronto per l'ultima fase di imbottigliamento e commercializzazione.

1.2 Processo d'Inerbimento

L'inerbimento rappresenta un'alternativa alle lavorazioni ordinarie del terreno e consiste nel rivestimento del terreno occupato dal vigneto con una copertura erbacea, la cui crescita viene controllata per mezzo di apposite trinciature o sfalci, lasciando la biomassa in situ ¹. L'inerbimento è una pratica consolidata da molto tempo, soprattutto nelle regioni caratterizzate da elevate precipitazioni e per la gestione dell'erosione nei vigneti in collina. Oggi, questa tecnica si sta diffondendo ampiamente anche in altri contesti, mirando a controllare il vigore delle viti, conservare la qualità del suolo e migliorare l'efficienza economica e la qualità delle produzioni, sempre nel rispetto dell'ambiente. La "consociazione vite-prato" rappresenta il metodo più sofisticato di produzione, mirato alla conservazione della fertilità del suolo, al mantenimento

dell'equilibrio tra vegetazione e produzione agricola, con minori interventi colturali ed è inoltre in grado di stabilizzare l'interazione tra clima, vitigno e terreno⁷. Questa tecnica di gestione del suolo può essere distinta in naturale, quando si forma spontaneamente, o artificiale, quando viene effettuata una semina e può essere presente durante tutto l'arco dell'anno (inerbimento permanente) o per un periodo limitato (inerbimento parziale). Si può inoltre scegliere di adottare tale tecnica di gestione del suolo su tutta la superficie dell'impianto (inerbimento totale), oppure limitarlo ad una parte (inerbimento parziale), al fine di ridurre la competizione esercitata dal prato e favorire lo sviluppo delle viti ¹.



Figura 1: vigneto inerbito (L'informatore agrario).

Il metodo più semplice e comune per sviluppare un manto erboso sulla superficie di un vigneto consiste nel permettere alla flora spontanea di crescere e sottoporla poi a tagli periodici. Tuttavia, le specie erbacee autoctone presentano spesso alcuni limiti, tra i quali: copertura lenta e non uniforme, scarsa protezione contro erosione e compattamento, prevalenza di specie molto esigenti in termini di acqua e nutrienti. Per questi motivi si sta volgendo sempre più interesse verso l'utilizzo della pratica dell'inerbimento artificiale, tramite semina mirata di specie pure o di miscele appropriate, che consente di ottenere coperture del suolo più rapide ed efficienti, caratterizzate da differenti livelli di competizione. Uno dei principali criteri di selezione delle specie e della composizione delle miscele è la disponibilità di acqua. Pertanto, è fondamentale scegliere una o più specie che presentino: ridotto fabbisogno idrico, radici poco profonde, crescita della parte aerea contenuta, basse necessità nutritive. Solitamente, la preferenza nella scelta, relativa alla composizione dei miscugli, viene data alle Graminacee, in quanto rispetto alle Leguminose, presentano delle specie/varietà in grado di tollerare stress molto forti e di ogni tipologia, fino a sopportare numerosissimi tagli l'anno, oltre ad un uso intenso (calpestio). La combinazione di specie e varietà nel miscuglio deve portare all'ottenimento di prati con specifiche caratteristiche di base: insediamento

rapido, (in particolar modo nelle aree collinari), capacità di competizione verso le infestanti, crescita moderata per limitare la competizione e manutenzione, resistenza al calpestio, buona persistenza (5-6 anni) ⁷. Dai numerosi studi effettuati si è visto che l'uso di tale tecnologia di gestione del suolo può apportare molteplici effetti positivi all'ecosistema vigneto che riguardano: la difesa e la fertilità del suolo, la salute e la produttività delle viti, la qualità delle uve e del vino. Ecco un breve elenco dei principali benefici apportati dalla pratica dell'inerbimento:

- Limita il ruscellamento dell'acqua e il trascinamento del terreno, contrastando l'erosione, soprattutto nei vigneti in pendio.
- Aumenta il contenuto di sostanza organica nel suolo, che ha riflessi positivi sulle condizioni nutritive del terreno e permette un miglioramento della distribuzione in profondità degli elementi poco mobili, quali: fosforo, potassio e magnesio, oltre che garantire una fornitura di nutrienti costante nel tempo.
- Limita la lisciviazione dell'azoto, con effetti positivi per l'ambiente e per il ciclo produttivo della vite.

- È in grado di riattivare la microflora e la microfauna del terreno, incrementando l'attività biologica del suolo.
- Riduce il vigore delle viti in terreni fertili, favorendo una migliore lignificazione dei tralci e una qualità superiore della vendemmia.
- Migliora l'esposizione dei grappoli alla luce, riducendo l'area fogliare.
- Promuove lo sviluppo dell'apparato radicale in profondità.
- Riduce la comparsa di clorosi e altre carenze nutritive ^{1,7}.

Tutto ciò comporta delle ripercussioni positive anche sulla qualità dei mosti e dei vini prodotti dagli stessi vigneti inerbiti, che permettono di anticipare la maturazione dell'uva, migliorare il contenuto zuccherino e alcolico complessivo, riducendo l'acidità totale, aumentare le caratteristiche sensoriali e incrementare la presenza di polifenoli e antociani. Una delle modifiche più significative, causate dalle pratiche di gestione del suolo, sulla composizione chimica dei mosti, riguarda la quantità di Azoto Prontamente Assimilabile dai lieviti (APA), che è risultata essere notevolmente più bassa nelle uve provenienti da parcelle con copertura vegetale ⁸. La competizione per i nutrienti esercitata dal cotico sulla vite si manifesta principalmente attraverso la disponibilità di azoto nei mosti. La riduzione dell'azoto facilmente assimilabile

provoca una diminuzione della velocità di fermentazione, prolungando così il tempo necessario per completare il processo fermentativo ⁹. Vi è inoltre da sottolineare che la presenza di una biocenosi più complessa e diversificata, che si instaura grazie all'adozione dell'inerbimento in vigneto, può contribuire, in aggiunta, al miglioramento dello stato sanitario delle uve stesse ⁷.

1.3 Biochimica della Fermentazione Alcolica

Il processo di fermentazione alcolica è una forma di metabolismo anaerobico, svolto da particolari microorganismi come lieviti e batteri, che porta alla formazione di etanolo, CO₂ e altri metaboliti secondari a partire da zuccheri semplici quali: glucosio e fruttosio, presenti nel succo d'uva in fase fermentativa. La fermentazione alcolica si articola essenzialmente in due fasi distinte: una prima fase aerobica e a seguire una fase anaerobica, che rappresenta il vero e proprio processo fermentativo. Nella prima fase aerobica si ha la scissione, tramite enzima invertasi, degli zuccheri complessi come il saccarosio, che porta alla formazione di glucosio e fruttosio. La reazione chimica che descrive questa prima fase può essere rappresentata come segue:



Come vediamo il saccarosio viene scisso in glucosio e fruttosio, (2 isomeri aventi stessa formula bruta $C_6H_{12}O_6$), che fungeranno da substrato per la seconda parte del processo fermentativo. Nella seconda parte del meccanismo fermentativo, partendo dagli zuccheri semplici glucosio e fruttosio, nel citoplasma degli organismi che attuano la fermentazione avviene la glicolisi, che porta a sua volta alla formazione di 2 molecole di piruvato, che in condizioni anaerobiche, non intraprendono il normale ciclo di Krebs, ma la via fermentativa. Le molecole di piruvato vengono quindi decarbossilate ad acetaldeide da parte dell'enzima piruvato decarbossilasi e viene liberata CO_2 ; infine, grazie all'azione dell'enzima alcol deidrogenasi, l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo e il NADH ossidato a NAD^+ ¹⁰. La formula generale che descrive la sintesi di etanolo e anidride carbonica a partire dal glucosio è stata formulata dal chimico-fisico francese Louis Gay-Lussac:



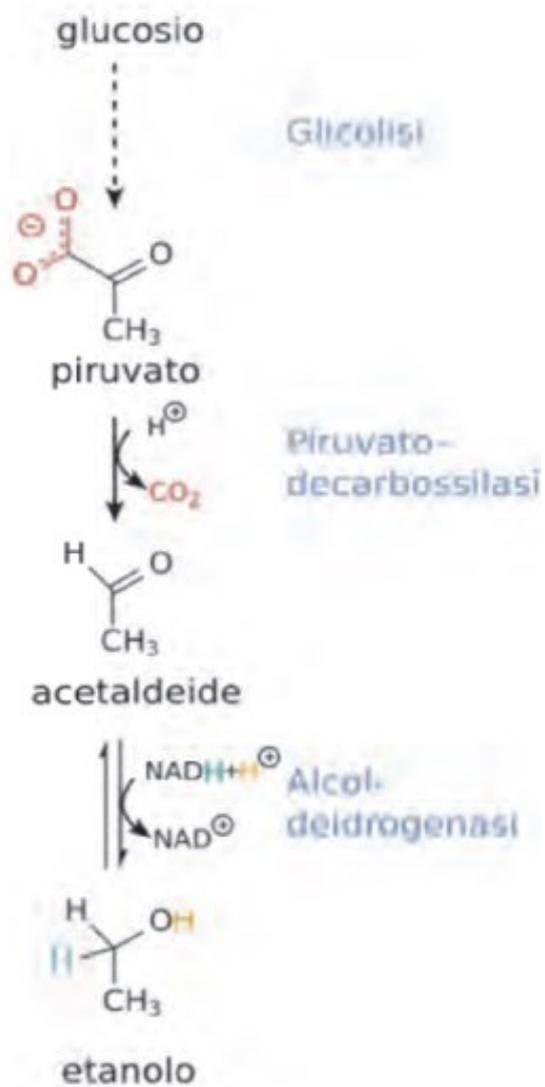


Figura 2: schema riassuntivo del biochimismo della fermentazione alcolica.

1.4 Fermentazione spontanea

La fermentazione spontanea rappresenta una delle metodiche fermentative tradizionalmente e maggiormente utilizzate nel contesto delle procedure di

vinificazione. Il processo di vinificazione è definito spontaneo per l'appunto quando i lieviti impiegati per compiere la fermentazione sono quelli, cosiddetti "indigeni", che risiedono naturalmente sulle bucce dei frutti e/o nell'ambiente di vinificazione, senza l'aggiunta di colture starter. Sono infatti numerose le specie di lieviti fermentanti che sono state rinvenute nei grappoli d'uva e sui raspi, svariate quelle presenti inoltre nelle attrezzature e locali adibiti alle procedure fermentative. Con il procedere della fermentazione, si osserva una continua e progressiva trasformazione della composizione della comunità microbica dominante, in funzione soprattutto delle specifiche condizioni ambientali (concentrazione di etanolo, potenziale redox, disponibilità di azoto), che tendono a fluttuare costantemente, oltre ad alterazioni chimico-fisiche, alle quali va incontro il mosto durante la fermentazione, (composizione chimica del mosto, quantità di ossigeno disciolto, aggiunta di SO₂, utilizzo di pesticidi o fungicidi, temperatura di fermentazione), così come fattori biotici ed interazioni positive e/o negative tra i microorganismi stessi, che possono andare ad influenzare in maniera significativa la composizione del microbiota fermentativo, durante il proprio svolgimento ¹¹. Queste comunità microbiche giocano un ruolo cruciale durante il processo di vinificazione, in quanto metabolizzando gli zuccheri presenti nei grappoli d'uva, producono un ampio

e differente set di metaboliti secondari, che può andare ad influenzare le qualità aromatiche e le caratteristiche organolettiche del vino stesso ¹². In particolare, la fase di avvio della fermentazione alcolica (1°giorno) è generalmente dominata da lieviti *non-Saccharomyces*, appartenenti ai generi *Hanseniaspora* e/o *Starmerella*, presenti in numero piuttosto elevato nel mosto, (10^3 - 10^6 UFC/mL), fungono da iniziatori del processo fermentativo per i primi 2-3 giorni, caratterizzati da bassi livelli di tolleranza all'etanolo, produzione limitata dello stesso, oltre che elevata produzione di composti volatili. I primi 2-4 giorni di fermentazione sono caratterizzati anche dalla crescita di varie specie di lieviti appartenenti ai generi *Metschnikowia*, *Pichia*, *Lachancea* e *Candida*, che possono raggiungere concentrazioni di circa 10^6 - 10^7 UFC/mL e vanno a costituire il consorzio microbico dominante di questi primi step, prima ancora di essere, anch'esse, inibite dalle elevate concentrazioni di etanolo prodotte. Queste specie, infatti, vengono ben presto sostituite da specie di lieviti alcol-tolleranti, che portano a termine il processo fermentativo, fino al consumo quasi completo degli zuccheri. Tra questi lieviti ritroviamo soprattutto la specie *S. cerevisiae*, (appartenente al gruppo *Saccharomyces sensu strictu*), che domina le fasi centrali e finali del processo (la cosiddetta fase di fermentazione "tumultuosa") e che alla fine dell'iter fermentativo risulta essere una delle

pochissime, se non l'unica specie presente nel vino ^{13,14}. Tutto ciò è reso possibile dalla capacità di *S. cerevisiae* di prosperare nelle avverse condizioni del mosto fermentato, quali: alte concentrazioni di etanolo, bassa disponibilità di azoto, basso pH. In aggiunta, *S. cerevisiae* presenta una spiccata capacità di resistenza alle elevate concentrazioni di SO₂, in confronto agli altri lieviti. Oltre a *S. cerevisiae*, nelle fasi centrali e finali del meccanismo fermentativo, possono essere presenti anche altre specie, dotate di un discreto potere alcoligeno, come: *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Sch. japonicus*¹⁵. Vi è inoltre da aggiungere che, ancora oggi, specialmente in Italia, un nuovo stile di vinificazione spontanea/naturale sta guadagnando sempre più importanza, poiché i vini prodotti derivano dal complesso meccanismo di azione di microrganismi autoctoni, “indigeni”, evitando l'impiego di additivi chimici e rispecchiando quindi quel carattere di “territorialità” e tipicità del vino, che viene visto e percepito sempre in maniera molto positiva. I fautori della fermentazione spontanea ritengono infatti che i vini prodotti con questa metodologia presentino una notevole unicità stilistica e una complessità superiore in termini di aromi, sapore e struttura rispetto a quelli realizzati con l'inoculazione di ceppi di lievito commerciali ¹⁶. Tuttavia, la fermentazione spontanea presenta alcuni limiti e rischi associati. Il processo

di fermentazione “naturale” potrebbe infatti svolgersi in maniera imprevedibile e i lieviti indigeni che conducono il processo, potrebbero produrre degli aromi e/o degli odori non desiderati (i cosiddetti off-flavours e off-odours), che potrebbero essere controllati ed attenuati con relativa difficoltà; affidarsi allo svolgimento naturale del meccanismo può portare inoltre a fermentazioni lente o limitate, con conseguenze potenzialmente negative per il prodotto finale ¹⁷. Ai lieviti indigeni viene inoltre spesso accostato l'appellativo di lieviti cosiddetti “spoilage”, poiché isolati da vini con presenza di anomalie sensoriali e analitiche. È stato inoltre dimostrato che processi di fermentazione in coltura pura di lieviti autoctoni possono portare, in alcuni casi, alla produzione di vari metaboliti indesiderati e presentare caratteristiche fermentative che impediscono generalmente il loro utilizzo come colture starter. Tra i principali sottoprodotti di queste fermentazioni vi sono acido acetico, acetaldeide, acetoino e acetato di etile, i quali possono conferire profili sensoriali sgradevoli al vino; inoltre, i vinil-fenoli ed etil-fenoli, composti volatili associati alla presenza di specie contaminanti come *Brettanomyces* e *Dekkera*, possono contribuire ulteriormente in negativo allo sviluppo di sapori o aromi indesiderati nel vino ¹⁸. Tuttavia, nonostante i possibili rischi e fattori negativi associati al meccanismo di fermentazione spontanea, soprattutto in Italia e in

generale in Europa, una notevole quantità di vini, in particolare quelli di alta qualità, vengono ancora oggi prodotti tramite questa metodologia fermentativa¹⁹.

1.5 Fermentazione inoculata o “indotta”

Alla luce di quanto detto precedentemente, soprattutto a riguardo dei possibili rischi associati al processo di fermentazione spontanea, oggi sembra che si sia giunti ad una consapevolezza sempre maggiore dell'impiego, (in specifici ambiti produttivi), di microrganismi selezionati, al fine di rendere i processi fermentativi più facilmente controllabili e sicuri, sia in termini di andamento del processo, che di qualità del prodotto finale. L'impiego di colture microbiche selezionate rappresenta una pratica piuttosto antica: basti pensare infatti che alla fine del XIX secolo Christian Hansen isolò la prima coltura pura derivata da una singola cellula di lievito e solo successivamente Muller-Thurgau introdusse il concetto di fermentazione inoculata in enologia. La pratica delle fermentazioni guidate si affermò poi nel corso del tempo grazie al progresso delle conoscenze scientifiche, dei mosti in fermentazione e della microbiologia delle uve, grazie anche alle numerose attività, azioni di divulgazione e di selezione dei lieviti vinari che si andavano sempre più diffondendo. A partire

dagli anni 60 del secolo scorso, le aziende produttrici di lieviti, (sotto pressione dell'industria dei cereali), iniziarono sempre di più ad interessarsi a questo approccio di fermentazione guidata con uso di colture starter applicate ai fini enologici e misero a punto dapprima la forma di lievito compresso (che presentava però numerose limitazioni soprattutto a livello di conservazione) e in seguito la forma disidratata come lievito secco attivo (LSA), caratterizzata da elevata conservabilità a temperatura ambiente e maggiore stabilità, che hanno permesso un'elevata diffusione degli starter enologici selezionati a livello mondiale; in Italia l'uso di lieviti selezionati si diffuse rapidamente a partire dal 1978, in seguito all'entrata in vigore del Decreto Ministeriale del 10 ottobre 1977 che ne autorizzava l'uso. L'uso di lieviti starter selezionati consente di pilotare e garantire il completamento del processo di fermentazione, permettendo di ottenere prodotti più omogenei, di qualità superiore, prendendo il sopravvento su microrganismi indesiderati ed essendo capaci di affrontare diverse tipologie di stress ambientali ¹¹. Affinché un ceppo di lievito possa essere adoperato come coltura starter, deve possedere però delle specifiche caratteristiche, che possono andare ad influire sulla composizione finale del vino stesso e sulla sua qualità, contribuendo a definire meglio il prodotto con un profilo sensoriale distintivo e immediatamente riconoscibile

sul mercato. Si parla pertanto di caratteri tecnologici e qualitativi, che vengono attentamente valutati e selezionati. Tra i caratteri tecnologici, (che riguardano gli aspetti metabolici dei lieviti, in grado di influenzare l'efficienza del processo), ritroviamo: il vigore fermentativo, la resistenza alla SO₂, il potere alcoligeno, la tolleranza all'etanolo ecc... Per quello che concerne invece i caratteri qualitativi di selezione, annoveriamo: la produzione di glicerolo, l'acidità volatile e purezza fermentativa, la produzione di alcoli superiori, produzione di esteri, acetaldeide, composti solforati ecc...Quest'ultimo raggruppamento di caratteri è definito da una serie di processi metabolici di degradazione e/o trasformazione dei componenti presenti nel mosto, che incidono sulla composizione e qualità del vino ^{11,20}. *S. cerevisiae* rappresenta il principale lievito del processo fermentativo in enologia e grazie anche alle sue caratteristiche metaboliche è il lievito che meglio si adatta alle condizioni chimico-fisiche di vinificazione. Per questo motivo l'impiego di ceppi selezionati delle specie *S. cerevisiae* e *S. bayanus* come colture starter rappresenta una delle metodologie più comuni nella conduzione della fermentazione alcolica. Tuttavia, l'aggiunta di ceppi selezionati di *Saccharomyces* nei mosti non sempre assicura che essi prevalgano al termine della fermentazione ²¹. Infatti, nonostante la loro elevata competitività, i ceppi

commerciali non riescono a sopprimere completamente i ceppi selvatici fino a diversi giorni dopo l'inizio del processo. La coltura starter infatti deve competere non solo con i lieviti *non-Saccharomyces*, ma anche con i ceppi autoctoni di *S. cerevisiae*, che in teoria si adattano meglio alle condizioni del mosto ²². La capacità di adattamento del ceppo starter, congiuntamente alla combinazione di fattori abiotici della cantina, determina la potenzialità concreta del ceppo di dominare o meno l'attività fermentativa. In generale, mediante l'inoculo adeguato del lievito starter e l'aggiunta contemporanea al mosto di SO₂, gli operatori di cantina riescono ad eliminare o ridurre al minimo la possibile influenza di lieviti differenti dal ceppo starter di *Saccharomyces* che è stato inoculato, raggiungendo un controllo efficace del processo ¹¹. D'altra parte, sta crescendo sempre di più l'interesse nella selezione di nuovi ceppi indigeni di *S. cerevisiae*, provenienti da vigneti e fermentazioni vinicole, meglio adattati alle condizioni locali di fermentazione e alla specifica composizione del mosto d'uva che, oltre a garantire l'affidabilità del processo fermentativo e la qualità del vino, sono in grado di riflettere anche la biodiversità di una determinata regione ^{23,24}. Oltre al genere *Saccharomyces*, si è diffusa l'adozione di starter commerciali di lieviti che includono anche specie *non-Saccharomyces*, da utilizzare in fermentazione mista controllata, in

cofermentazione o in successione con i lieviti *Saccharomyces*, durante la vinificazione. Parallelamente a questa tipologia di starter commerciali, è stata sviluppata un'altra linea di selezione di lieviti starter provenienti da regioni/aree geografiche ristrette e varietà specifiche di uve. L'utilizzo di questi starter di lieviti indigeni/autoctoni, ben adattati a fermentare le varietà locali di uva, può rappresentare un'alternativa valida sia alla rischiosa fermentazione spontanea che all'uso di starter commerciali, contribuendo a contrastare e ridurre la standardizzazione dei vini, causata dall'uniformità degli starter microbici ¹¹.

1.6 Fermentazione mista

Come già accennato anche in precedenza, negli ultimi anni vi è stata una forte rivalutazione del ruolo dei lieviti *non-Saccharomyces* e sono state condotte numerose ricerche per comprendere al meglio l'impatto dei ceppi *non-Saccharomyces* sulla chimica e sulle proprietà sensoriali del vino prodotto ²⁵. Diversi studi hanno rivelato una significativa variabilità intraspecifica per i diversi caratteri di interesse enologico sui quali operare una selezione, la presenza di tratti enologici unici e positivi e, in particolare, un comportamento differente in co-coltura a causa delle possibili interazioni con *S. cerevisiae*.

Questi aspetti hanno dimostrato l'importanza di questi lieviti “non convenzionali” nel definire il profilo analitico e sensoriale, oltre che la complessità aromatica del vino prodotto. Come abbiamo detto, infatti, i lieviti *non-Saccharomyces* seppur mostrano una limitata attitudine fermentativa (scarso potere alcoligeno, bassa velocità di fermentazione, ridotta resistenza all’etanolo e alla SO₂) in confronto al *S. cerevisiae*, sono in grado di produrre differenti metaboliti secondari, che hanno la capacità di influire sia positivamente (glicerolo, acidi organici, polisaccaridi) che negativamente (acido acetico, etilfenoli, etilacetato) sulla qualità e aromaticità del prodotto finale. La rivalutazione del possibile ruolo dei lieviti *non-Saccharomyces*, la selezione e il loro utilizzo in fermentazioni miste controllate con *S. cerevisiae* rappresenta dunque una valida ed innovativa strategia biotecnologica, al fine di raggiungere differenti obiettivi qualitativi, tecnologici e di processo ²⁶. Va precisato che le fermentazioni miste possono essere condotte secondo 2 approcci differenti: come coinoculo, nel quale il ceppo di *S. cerevisiae* viene inoculato contemporaneamente al lievito *non-Saccharomyces*, oppure secondo la modalità di inoculo sequenziale, in cui *S. cerevisiae* viene inoculato dopo 48-72 ore dall’inoculo del lievito *non-Saccharomyces*. Seguendo la seconda modalità si permette agli starter *non-Saccharomyces* di esprimere le proprie

attività metaboliche, senza dover affrontare lo stress della competizione con il ceppo di *S. cerevisiae*. È inoltre importante precisare che una buona gestione del processo di fermentazione mista parte soprattutto dallo studio e dalla conoscenza dei diversi fattori abiotici (concentrazione di etanolo, competizione per vitamine, composti azotati, disponibilità di ossigeno, temperatura) e dei fattori biotici (rilascio di molecole antimicrobiche, meccanismi di contatto cellula-cellula), che possono avere un'azione modulante sulla presenza e dominanza delle differenti specie di lieviti, durante lo svolgimento del processo fermentativo. Le fermentazioni miste-controllate di lieviti *non-Saccharomyces* con lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae* possono essere allestite per il conseguimento di diversi obiettivi: influenza su alcuni dei principali caratteri analitici, incremento di aromi e della complessità aromatica, riduzione di etanolo, attività antimicrobica e biocontrollo ¹¹.

1.6.1 Influenza sui principali caratteri analitici

Tommaso Castelli fu uno dei primi a proporre, negli anni 60 del Novecento, l'uso di fermentazioni miste in vinificazione, con la fermentazione sequenziale di *Torulaspora delbrueckii* e *S. cerevisiae*, al fine di ridurre l'acidità volatile, sfruttando la capacità di *T. delbrueckii* di produrre basse quantità di acido acetico e di apportare un impatto benefico sul sapore e sull'aroma generale delle

bevande alcoliche, producendo quantità ridotte di acetaldeide, acetoino, acetato ed etil acetato ²⁷. Uno degli impieghi più studiati delle colture miste nella produzione del vino riguarda inoltre la deacidificazione biologica del mosto e/o del vino, grazie alla capacità di alcuni lieviti *non-Saccharomyces* di effettuare il processo di fermentazione malo-alcolica. *Schizosaccharomyces pombe* e *Schizosaccharomyces japonicus* presentano infatti la capacità di degradare totalmente l'acido malico, attuando un vero e proprio processo di disacidificazione biologica, permettendo di ottenere vini più stabili e con minor grado di acidità; un sistema ancora più controllato è stato sviluppato adoperando *S. cerevisiae* e cellule immobilizzate di *S. pombe* ²⁸. Altri lieviti non convenzionali possono andare ad influenzare fortemente la struttura del vino, variando la sua composizione o aumentandone l'acidità volatile, come nel caso di *Lachancea thermotolerans* che porta alla produzione di livelli consistenti di acido lattico ²⁹. Tra i lieviti non convenzionali utilizzati nella vinificazione, le specie che producono elevate quantità di glicerolo (*St. bombicola*, *St. bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima*, *L. thermotolerans*) sono state impiegate in fermentazioni miste per incrementare il contenuto di glicerolo nei vini. Il glicerolo rappresenta infatti un sottoprodotto della fermentazione molto ricercato, (dopo etanolo e CO₂ rappresenta il principale

prodotto in termini quantitativi), in quanto può influenzare la dolcezza e la morbidezza del vino, oltre che essere associato ad una persistenza del sapore. È stato osservato ad esempio che, le cellule immobilizzate di *C. stellata* hanno portato ad un aumento del contenuto di glicerolo di circa il 100% in fermentazioni miste, in combinazione con *S. cerevisiae*³⁰. Anche il processo di fermentazione mista con *M. pulcherrima* ha mostrato un aumento del contenuto di glicerolo nel vino¹⁸. Un altro importante aspetto che viene preso in considerazione per l'impiego dei lieviti *non-Saccharomyces*, riguarda la produzione di polisaccaridi; infatti, i lieviti *non-Saccharomyces* sono generalmente caratterizzati da una maggiore produzione di polisaccaridi rispetto alle colture starter di *S. cerevisiae*. Alcune specie di *Schizosaccharomyces* sono capaci di produrre un'elevata quantità di polisaccaridi, determinando un incremento significativo della struttura e del corpo del vino, che può essere ottenuto anche grazie agli acidi organici prodotti durante la fermentazione¹¹. L'utilizzo di lieviti *non-Saccharomyces* nella vinificazione sta sempre più emergendo come una promettente innovazione, offrendo una gamma di potenziali benefici che spaziano dal miglioramento delle caratteristiche organolettiche del vino, alla promozione della biodiversità

microbiologica, passando per la riduzione dei solfiti e l'enhancement della complessità aromatica.

1.6.2 Incremento degli aromi e della complessità aromatica

Numerose sono state le indagini che hanno concentrato la loro attenzione sulla complessità aromatica e gustativa del vino, facendo uso dei lieviti *non-Saccharomyces* in fermentazione mista. Alcuni lieviti non convenzionali, appartenenti ai generi: *Torulaspota*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Lachancea*, possono influenzare in maniera positiva il profilo aromatico del vino e migliorare la sua complessità sensoriale attraverso la biosintesi di numerosi composti, quali: norisoprenoidi, esteri, terpeni, acidi grassi volatili, alcoli superiori, composti carbonilici e tiolici. Oltretutto, le modalità e le quantità di produzione dei diversi composti aromatici possono differire sia tra le diverse specie di lieviti *non-Saccharomyces* sia all'interno della stessa specie (variazioni di ceppo) ¹¹. Anche *H. uvarum* e *H. vineae* sono stati proposti in fermentazioni miste, per migliorare il profilo aromatico dei vini. Infatti, queste specie hanno determinato un aumento nella produzione di terpeni ed esteri di acetato, incrementando ulteriormente le caratteristiche aromatiche positive come quelle "floreali" e "fruttate" ³¹. Per di più, le prove di

fermentazione mista con colture starter di *H. uvarum* e *S. cerevisiae* hanno incrementato il contenuto di acetato di isoamile, mentre l'impiego di *Hanseniaspora osmophila* ha incrementato la produzione di 2-fenilettil acetato³². La fermentazione sequenziale del mosto di Macabeo, eseguita con *Hanseniaspora vineae* e *S. cerevisiae*, ha mostrato un incremento del fenilettil acetato e ha conferito note più fruttate e floreali rispetto ai vini fermentati con il solo *S.cerevisiae*. Un altro lievito non convenzionale che mostra un comportamento fermentativo interessante è *M. pulcherrima*, identificato nelle fasi iniziali della fermentazione alcolica. Ben noto per l'elevata produzione di β -glucosidasi, la sua presenza in colture miste può migliorare in maniera significativa il contenuto di alcoli superiori, esteri e terpenoidi nel vino. In fermentazione mista, il profilo aromatico di questo lievito ha mostrato note di "agrumi/uva spina" e caratteristiche affumicate e floreali nelle varietà di uva Riesling e Macabeo²⁶. Durante la fermentazione simultanea, *Z. bailii* contribuisce positivamente all'aroma del vino Chardonnay, aumentando la produzione di esteri etilici³³. Parallelamente, *Z. florentina* arricchisce di note fruttate e floreali il succo d'uva Sangiovese³⁴, mentre *Pichia kluyveri* è caratterizzata da un'ampia produzione di aromi: nella fermentazione mista del vino insieme con *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* ha aumentato infatti le

concentrazioni di tioli varietali nel Sauvignon Blanc e l'impressione generale con caratteri di pesca-albicocca ³⁵.

1.6.3 Riduzione di etanolo

L'esigenza di ridurre il contenuto alcolico nei vini è legata al suo incremento negli ultimi decenni, dettato soprattutto dai numerosi cambiamenti climatici e dai nuovi stili di vinificazione, associati ad una maggiore maturazione dell'uva; l'alto contenuto di etanolo nel vino influisce negativamente sulla percezione aromatica del prodotto e può avere anche effetti dannosi sulla salute umana. In particolare, sta crescendo molto l'interesse verso lo studio dei lieviti vinari non convenzionali, i quali mostrano una notevole variabilità nella produzione di etanolo e potrebbero rappresentare un valido strumento per ridurre il contenuto alcolico nei vini. I risultati di numerosi studi hanno infatti mostrato che ceppi di alcune specie di lievito *non-Saccharomyces*, con inoculo sequenziale di *S. cerevisiae*, possono essere impiegati per ridurre il contenuto di etanolo nel vino ^{11,26}. Oltre a una bassa produzione di etanolo, alcune specie e ceppi di lieviti vinari *non-Saccharomyces* hanno dimostrato di riuscire a consumare zuccheri attraverso la respirazione (Crabtree negativo). Questi due approcci suggeriscono che l'uso di lieviti vinari non convenzionali sia molto promettente per limitare la quantità di etanolo prodotta. Una bassa resa di etanolo è stata

riscontrata in alcuni ceppi di *Candida zemplinina*³⁶, in ceppi appartenenti ai generi *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces*³⁷, così come in ceppi di *M. pulcherrima*, *Schizosaccharomyces malidevorans* e *Candida stellata*³⁸.

1.6.4 Attività antimicrobica e biocontrollo

Un'altra possibile applicazione dei lieviti *non-Saccharomyces* come starter in fermentazioni miste riguarda la loro possibile azione di biocontrollo, ovvero la potenzialità di un ceppo di contrastare lo sviluppo di microrganismi indesiderati, che possono determinare la presenza di caratteri organolettici sgraditi nel prodotto finale. In aggiunta a ciò, al giorno d'oggi, si sta sempre più cercando di andare verso un'ottica di riduzione degli agenti chimici tradizionali, come l'impiego di solfiti e di SO₂ in vinificazione, il cui uso generalizzato può essere potenzialmente dannoso per la salute dei consumatori, per rivolgere ancora più attenzione ed interesse verso l'uso di antimicrobici naturali, per il controllo dei microrganismi alterativi presenti nelle diverse bevande e alimenti durante lo svolgimento dell'iter fermentativo. In particolare, l'attività antimicrobica viene esercitata attraverso meccanismi di interazione tra i microrganismi indigeni e il ceppo con azione di biocontrollo, come ad esempio: produzione di composti ad attività antimicrobica, quali micocine o specifici pigmenti, la competizione per le sostanze nutritive con il microbiota

naturale del mosto, l'occupazione fisica dello spazio presente nell'ecosistema. Questi lieviti con attività antimicrobica possono essere adoperati in fermentazioni miste già in fase prefermentativa, per il controllo dei microrganismi indigeni provenienti dalle uve, in particolar modo per il controllo dei lieviti "apiculati" ^{11,26}. A tal proposito, alcuni dei lieviti più interessanti per il raggiungimento di tale obiettivo appartengono al genere *Metschnikowia*, (*M. pulcherrima* e *M. fructicola* in particolare), in grado di produrre un pigmento insolubile dal colore rosso, di nome pulcherrimina, capace di impoverire il mezzo di ferro, rendendolo quindi indisponibile per gli altri lieviti ed agendo dunque come antimicrobico naturale, con spiccata attività antifungina ³⁹. Sulla base di queste caratteristiche, le specie appartenenti al genere *M. pulcherrima* potrebbero essere adoperate come strategia per contenere i microrganismi deterioranti e ridurre l'uso di anidride solforosa nella produzione biologica del vino. Altre specie di lieviti con azione inibitoria nei confronti di lieviti indesiderati sono *Wickerhamomyces anomalus* (denominato in precedenza *Pichia anomala*), *Kluyveromyces wickerhamii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida pyralidae*, *Tetrapisispora phaffii* e molti altri ancora. Questi lieviti esercitano la loro azione di biocontrollo tramite la produzione di tossine killer, come ad esempio micocine: composti di natura proteica, la cui

attività antimicrobica è dovuta alla degradazione di componenti della parete cellulare e la cui produzione è stata inizialmente evidenziata in *S. cerevisiae*, ma in seguito studiata con ancor più attenzione all'interno dei lieviti non convenzionali. Ad esempio, è stato dimostrato che *Kluyveromyces phaffii* è in grado di produrre una tossina killer, nota come zimocina KpKt, attiva contro i lieviti del vino che possono andare a contaminare la fase prefermentativa (in particolare lieviti appartenenti al genere *Hanseniaspora*)⁴⁰. Inoltre, si è visto che i suoi effetti fungicidi o fungistatici sono dipendenti dalla concentrazione e l'attività inibitoria della tossina killer KpKt nel succo d'uva si è dimostrata paragonabile a quella dell'anidride solforosa⁴¹. Durante la fermentazione e, in particolare, nelle fasi di invecchiamento, un altro lievito che desta non poche preoccupazioni ai viticoltori è il *Brettanomyces bruxellensis*, noto per causare odori sgradevoli nel vino e per il quale non esiste ancora un metodo efficace per controllarne la crescita. A tal proposito, recentemente, Mehlomakulu e collaboratori⁷ hanno focalizzato la loro attenzione sull'identificazione e caratterizzazione delle tossine killer prodotte da *Candida pyralidae*, le quali hanno dimostrato un potenziale effetto antimicrobico contro *B. bruxellensis* nel vino⁴². Anche Santos e colleghi hanno esaminato, nel loro lavoro, una nuova tossina killer, PMKT2, prodotta da *Pichia membranifaciens*, che ha mostrato

efficacia nel contrastare *Brettanomyces bruxellensis* ⁴³. Dai numerosi studi riportati, si apprende quindi che tutte queste micocine si sono rivelate molto efficaci nell'inibizione dei principali lieviti contaminanti del vino, quali ad esempio *Dekkera/Brettanomyces*; inoltre, il grande punto di forza di questi composti risiede nel fatto che la loro efficacia non è influenzata dai parametri critici per la vinificazione, come il pH, la temperatura, la concentrazione di etanolo e non svolgono azione inibente nei confronti di *S. cerevisiae* e dei batteri lattici, non andando quindi ad interferire con i processi di fermentazione alcolica e malolattica. Per quello che concerne, invece, l'azione di bioprotezione sulle uve, alcuni lieviti, tra i quali *M. pulcherrima*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Starmerella bacillaris*, si sono rivelati molto efficienti come agenti di biocontrollo, con azione inibente nei confronti di *Botrytis cinerea*, (noto anche come “muffa grigia” o “botrite”), rendendosi utili come possibili strumenti di protezione, sia delle uve da vino che da tavola ¹¹. I possibili effetti delle interazioni tra i diversi ceppi di lievito rappresentano una questione applicativa molto complessa; ad ogni modo, sebbene *S. cerevisiae* sia il principale responsabile della fermentazione alcolica, le specie *non-Saccharomyces* possono manifestare e rivelare delle potenzialità molto importanti per quanto riguarda la produzione di aromi, di etanolo e

l'azione di bioprotezione nei confronti dei diversi microrganismi presenti nel vino ²⁶.

1.7 Lieviti *non Saccharomyces* di interesse vinario

Per lungo tempo, come detto, i lieviti *non Saccharomyces* sono stati considerati dei microrganismi contaminanti, responsabili di rallentamenti e/o arresti di fermentazione e produzione di metaboliti non voluti. Tuttavia, è ormai accertato che l'impiego controllato di ceppi selezionati di alcuni lieviti *non Saccharomyces* in coltura mista con *S. cerevisiae*, può consentire la produzione di vini con caratteristiche peculiari ed uniche. Riportiamo quindi sotto alcune delle principali caratteristiche morfo-tecnologiche dei principali generi e specie di lieviti *non Saccharomyces* di interesse vinario.

1.7.1 Genere *Hanseniaspora* (anamorfo *Kloeckera*)

I generi *Hanseniaspora/Kloeckera* rappresentano la categoria dei cosiddetti “lieviti apiculati”, che presentano una tipica riproduzione vegetativa per gemmazione bipolare, che determina, a sua volta, la particolare morfologia ovoide-allungata ai 2 poli delle cellule, viste al microscopio ottico (la forma “a limone” è ben visibile in figura 3). Questi lieviti vengono generalmente isolati

a partire da frutta, fiori, corteccia e diffondono nei diversi ambienti vinari, trasportati da insetti.

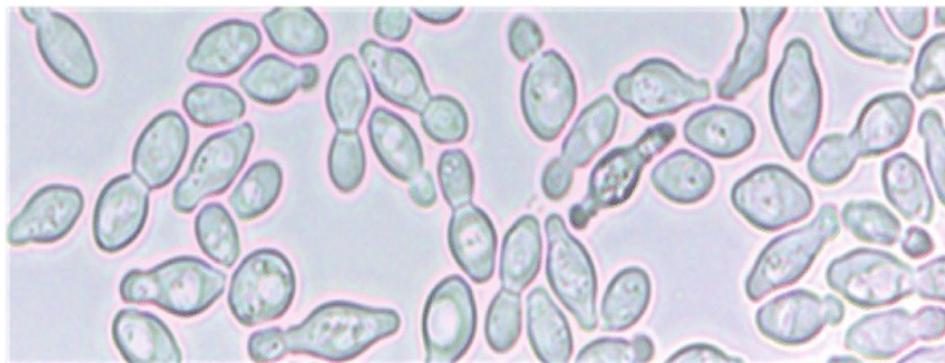


Figura 3: lieviti del genere *Hanseniaspora* al microscopio ottico (ResearchGate).

Specie *Hanseniaspora uvarum*

Sono dei lieviti molto frequenti nel suolo e nella frutta, costituiscono parte del microbiota di insetti, uccelli e molluschi. Rappresentano i principali costituenti del microbiota delle uve e dei mosti e la loro presenza nelle prime fasi del processo fermentativo è stata documentata in tutte le regioni vitivinicole del mondo. Su terreno WL le colonie appaiono piatte, lucide, di colore verde scuro e circondate da un sottile bordo color crema. Tali microrganismi sono in grado di fermentare il glucosio e il fruttosio e crescere a temperature comprese tra gli 8 e i 36°, non assimilano il nitrato ed utilizzano la lisina come unica fonte di azoto, sono inoltre dei lieviti piuttosto sensibili all'anidride solforosa. Data la loro elevata numerosità sulle uve, dominano le prime fasi della fermentazione

alcolica, nelle quali sono in grado di produrre attorno al 3-4% di etanolo (v/v); viene riconosciuta generalmente come una specie scarsamente tollerante all'alcol e questo ne influenza la persistenza nel corso del processo fermentativo. È in grado di produrre concentrazioni elevate di acido acetico rispetto alla quantità di etanolo prodotta, presenta inoltre attività β -glucosidasica, xilosidasica, proteasica e lipasica, che possono influenzare le caratteristiche qualitative e aromatiche dei vini prodotti. Considerata a lungo tempo una specie indesiderata in vinificazione, il suo sviluppo viene contrastato con la procedura di solfitazione dei mosti, data la sua scarsa tolleranza alla SO₂. Tuttavia, dagli studi effettuati, sembra presentare delle proprietà enologiche molto interessanti e può trovare applicazione nelle fermentazioni vinarie tramite l'associazione con *S. cerevisiae* in colture miste ¹¹.

1.7.2 Genere *Metschnikowia* (anamorfo *Candida pulcherrima*)

Il genere *Metschnikowia*, appartenente all'ordine *Saccharomycetales*, (famiglia *Metschnikowiaceae*), annovera numerosissime specie, tra le quali *M. fructicola*, *M. pulcherrima* e *M. viticola* sono comuni sulle uve, nel mosto e negli ambienti vinari. Negli ultimi anni, soprattutto le specie *M. pulcherrima* e *M. fructicola* hanno destato notevole interesse per la loro applicazione in fermentazioni miste

e per la loro azione di bioprotezione soprattutto contro funghi patogeni, quali *Penicillium* e *Botrytis*.

Specie *Metschnikowia pulcherrima* (anamorfo *Candida pulcherrima*)

Rappresenta la specie più studiata del genere, colonizza frutta matura, fiori, linfa degli alberi e si riscontra spesso nei succhi di frutta, sull'uva e nel mosto in fermentazione. Su terreno WL produce colonie di medie dimensioni, lucide, cremose, convesse, caratterizzate da un evidente contorno rosso-bruno, dato dalla produzione di un particolare pigmento, la pulcherrimina, che diffonde nel mezzo, formando un alone colorato intorno alla colonia. In merito alla produzione di pulcherrimina, ad oggi, è stata riportata la sua azione di biocontrollo su: *Candida tropicalis*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Botrytis cinerea*. Al microscopio ottico le cellule appaiono di forma globosa/ellissoidale e la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multipolare ¹¹ (figura 4).

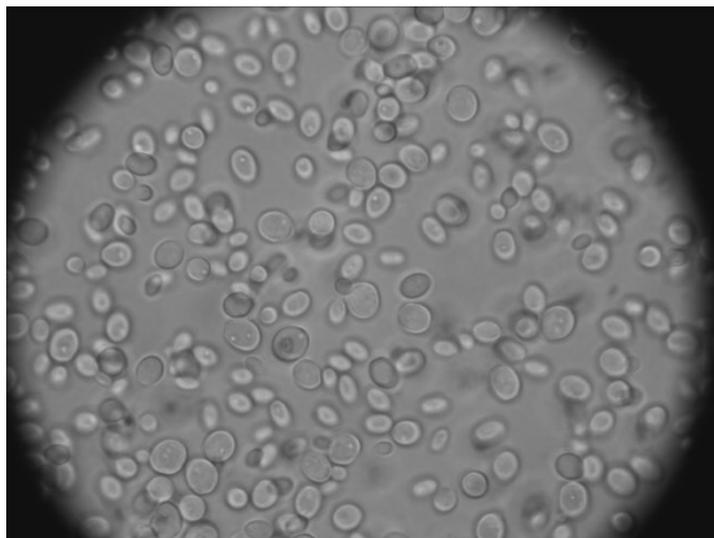


Figura 4: *M. pulcherrima* al microscopio ottico.

Per quanto concerne le caratteristiche fisiologiche, metaboliche e tecnico-enologiche del lievito, sappiamo che è in grado di fermentare glucosio e fruttosio, prediligendo temperature comprese tra i 15 e i 20°C. Richiede biotina per la propria crescita e non assimila il nitrato, utilizza la lisina come unica fonte di azoto ed è particolarmente sensibile alla SO₂. I microrganismi appartenenti a questa specie presentano un basso potere fermentativo, con produzione di etanolo che raggiunge il 4-5% (v/v); data inoltre la bassa tolleranza all'etanolo, *Mp* non è in grado di persistere a lungo nel corso della fermentazione alcolica, pertanto, viene spesso adoperato in fermentazioni sequenziali o miste con *S. cerevisiae* per portare a termine l'iter fermentativo¹¹. Produce generalmente una bassa acidità volatile e presenta un corredo enzimatico di grande interesse: oltre all'attività β-lasica (che agisce nei

confronti dei precursori tioli varietali) e glicosidasica, spicca la sua attività β -glucosidasica, che permette la scissione di terpeni liberi e tioli, permettendo di conferire un tipico aroma floreale e migliorare l'aroma fruttato varietale in molte tipologie di uve ⁴⁴. Alcuni studi, hanno dimostrato che l'utilizzo di fermentazioni miste Mp/Sc ha portato alla produzione significativa di esteri acetici e β -damascenone, con minori quantità di alcoli C6 nei vini da ghiaccio derivanti dalla varietà di uva Vidal blanc. Inoltre, le fermentazioni sequenziali con *Mp* hanno evidenziato un incremento nella produzione di alcoli superiori, con particolare abbondanza di isobutanolo e feniletanolo ⁴⁵. In aggiunta a ciò, *M. pulcherrima* mostra anche un'elevata attività proteolitica, che permette la rapida scomposizione delle proteine in aminoacidi, che possono, a loro volta, essere utilizzati come fonte di nutrienti da parte di *S. cerevisiae* e rappresentano anche i substrati necessari per la formazione di esteri etilici, insieme all'etanolo ⁴⁶. Recenti studi hanno dimostrato che l'uso di ceppi di *Metschnikowia* durante la fermentazione sequenziale aumenta la concentrazione finale di glicerolo nei vini, che può variare dal 4-20%, fino ad arrivare al 40%; *M. pulcherrima* è stato inoltre ampiamente studiato per la capacità di riduzione di etanolo in differenti condizioni fermentative: cellule libere/immobilizzate e diverse condizioni di aerazione ⁴⁷.

1.7.3 Genere *Starmerella*

Il genere *Starmerella* (ordine *Saccharomycetales*) include al suo interno le 2 specie di lieviti di maggiore interesse enologico: *St. bacillaris* e *St. bombicola*.

Specie *Starmerella bacillaris* (sinonimo *Candida zemplinina*)

I microrganismi facenti parte di questo raggruppamento sono molto spesso rinvenuti su uve passite o bottrizzate, per lo più associati a mosti, vini, frutta e sono presenti anche nel suolo. Su WL le cellule appaiono lucide, convesse, con parte centrale di colore verde intenso, circondata da un bordo bianco-crema; dalla visione al microscopio ottico le cellule appaiono globose-ellissoidali, singole o in coppia, con gemmazione multipolare (figura 5).

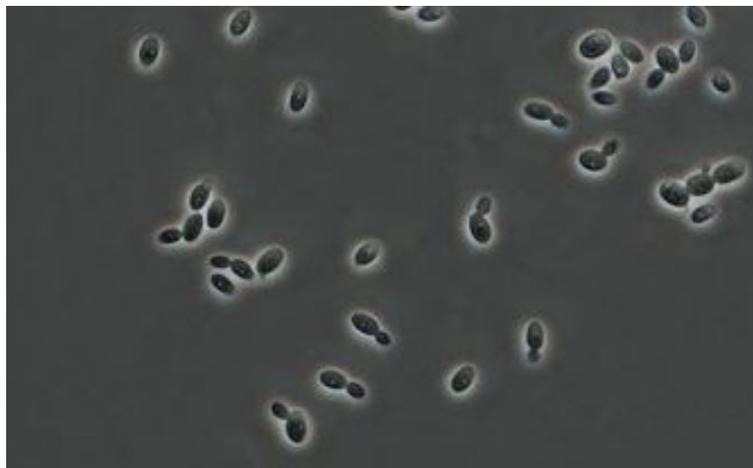


Figura 5: lievito *St. bacillaris* al microscopio ottico (infowine).

I lieviti appartenenti a questa specie sono in grado di fermentare il glucosio, saccarosio e fruttosio (presentano una marcata preferenza per quest'ultimo) e sono osmotolleranti e psicotolleranti, esibiscono una limitata richiesta di azoto, non assimilano il nitrato e utilizzano la lisina come unica fonte di azoto. Alcuni ceppi fermentano in presenza di 50 mg/L di SO₂, ma in generale presentano una resistenza variabile a tale antimicrobico. Sono delle specie facilmente rinvenibili sulle bacche d'uva e nelle differenti superfici di cantina, ancor prima della vendemmia, a partire da queste superfici sono in grado di colonizzare i mosti, nei quali si possono ritrovare in concentrazioni piuttosto elevate (10⁴-10⁶ cell/mL) nelle fasi iniziali delle fermentazioni spontanee, prima di essere superati dalla crescita dei ceppi autoctoni di *Saccharomyces cerevisiae*, che prevalgono nelle fasi intermedie e finali del processo. Studi ecologici recenti hanno comunque messo in risalto il fatto che, in fermentazioni miste, alcuni ceppi di *St. bacillaris* sono in grado di raggiungere concentrazioni pari a 10⁷ UFC/mL e di completare il processo insieme a *S. cerevisiae*, quest'ultimo, tuttavia, durante questa fase cresce rapidamente, fino a diventare in maniera graduale la specie dominante fino al termine della fermentazione alcolica⁴⁸. La produzione di etanolo si assesta intorno al 4-6% (v/v) ed è inferiore a quella di *S. cerevisiae*, al contrario, la produzione di glicerolo è più elevata, al fine del

mantenimento del bilanciamento redox NADH/NAD⁺ nel corso della fermentazione stessa. Alcuni lavori descrivono *St. bacillaris* come una specie acidogena, tuttavia, sono state riscontrate diverse discrepanze riguardo la produzione di acido acetico, indicando che la produzione di questo metabolita dipende dal ceppo e può variare anche in base all'ambiente di fermentazione, come la temperatura e la composizione del mosto. Per quello che riguarda la produzione di acido piruvico, alcuni autori hanno evidenziato che la produzione di tale acido organico, (seppur superiore rispetto a quella di *S. cerevisiae*) non supera i 100 mg/L^{11,48}. Altre caratteristiche interessanti di questa tipologia di lievito comprendono un'aumentata produzione di terpeni, glicerolo, acetato di etile e lattoni e la degradazione dell'acido malico, rispetto alle fermentazioni pure con *S. cerevisiae*, migliorando ed aumentando la qualità e la complessità aromatica globale del vino stesso⁴⁹; tutto ciò è dovuto principalmente alla capacità di questa specie di produrre un ampio spettro di enzimi idrolitici extracellulari di interesse enologico, quali β -glucosidasi e proteasi⁵⁰. *St. bacillaris* ha dimostrato di possedere, inoltre, un'efficace attività antifungina contro *Botrytis cinerea*, sia in vitro che in vivo, suggerendo l'impiego di questo lievito come agente di biocontrollo sulle piante di vite e sui grappoli d'uva⁵¹. Tutte queste peculiarità evidenziate, hanno reso i lieviti appartenenti alla specie

St. bacillaris degli ottimi candidati per l'impiego in fermentazioni miste con *S. cerevisiae*, per il raggiungimento degli obiettivi enologici desiderati.

Specie *Starmerella bombicola*

Il gruppo comprende lieviti precedentemente identificati come *Candida bombicola* e *C. stellata*, questa specie di lievito *non-Saccharomyces* viene generalmente isolata da miele di bombo, succo d'uva concentrato, fiori e varie tipologie di insetti e mostra morfologie di colonia diverse a seconda delle condizioni di crescita. Ad esempio, su agar di malto, le colonie appaiono piccole, convesse e bianche. Le cellule mostrano una forma ovoidale o allungata e la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multipolare⁵². Per ciò che riguarda le caratteristiche fisiologiche, metaboliche e tecnico-ecologiche, *St. bombicola* è in grado di fermentare il glucosio, saccarosio e, (come nel caso di *St. bacillaris*), predilige il fruttosio. Il lievito utilizza la lisina come unica fonte di azoto, sopravvive in assenza di amminoacidi, ma non di vitamine ed è in grado di crescere in un ampio intervallo di temperature, comprese tra 4 e 32°C. È un microrganismo osmotollerante, caratterizzato da bassa velocità di fermentazione e basso potere fermentativo, distinto da una produzione di etanolo che raggiunge il 4%(v/v), oltre che da elevata produzione di glicerolo e acido succinico^{11,52}. Per queste sue interessanti proprietà, viene

adoperato nell'industria enologica, dove viene spesso proposto nella formulazione di starter misti, soprattutto con *S. cerevisiae*. I risultati di un recente lavoro hanno mostrato che la fermentazione sequenziale *St. bombicola/S. cerevisiae* sotto condizione di aerazione, ha determinato una riduzione dell'etanolo del 1,46% (v/v) rispetto alla fermentazione pura di *S. cerevisiae*. La condizione di aerazione non ha influenzato negativamente sul profilo analitico della fermentazione sequenziale *St. bombicola/S. cerevisiae*, in particolare non si è osservata una sovrapproduzione di acidità volatile ed etil acetato, mentre è stato evidenziato un incremento dei livelli di etil butirrato ed alcoli superiori, grazie alla supplementazione di ossigeno. In aggiunta a ciò, queste condizioni hanno fortemente migliorato la produzione di glicerolo e acido succinico, che influenzano positivamente la struttura e il corpo del vino⁵³. In ulteriori studi, *St. bombicola* in fermentazione mista con *S. cerevisiae* ha mostrato un'influenza positiva sull'aroma e composizione del vino Chardonnay e un incremento significativo dei livelli di glicerolo in Trebbiano Toscano. Complessivamente, le specie appartenenti al genere *Starmerella* (in riferimento specifico a *St. bacillaris* e *St. bombicola*) hanno mostrato molteplici caratteristiche positive, quali: riduzione dell'acidità volatile ed etanolo, aumento dei livelli di glicerolo e di alcuni composti volatili¹¹.

CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

Numerosi studi hanno rivalutato il contributo dei lieviti *non-Saccharomyces* nelle fermentazioni alcoliche, evidenziando il loro ruolo nell'influenzare la complessità aromatica del prodotto finale, abbassare il contenuto di etanolo e avere un'azione di biocontrollo. Nel seguente lavoro sono state allestite 2 differenti prove fermentative, tramite l'utilizzo di 2 lieviti *non-Saccharomyces*, in fermentazione sequenziale con un ceppo commerciale di *S. cerevisiae*. Nella prima prova, fermentazione mista *M. pulcherrima/S. cerevisiae*, lo scopo principale del lavoro è stato quello di valutare la possibile azione di biocontrollo del ceppo inoculato di *M. pulcherrima* sul pool di lieviti *non-Saccharomyces*, presenti in un mosto proveniente da parcelle di vigneto inerbito con aggiunta di *M. pulcherrima*, rispetto ad un campione di mosto da vigneto non inerbito senza aggiunta dello starter stesso, con l'intento di poter trovare un'alternativa valida all'utilizzo della SO₂ in vinificazione, andando quindi a ridurre l'impiego, soprattutto in fase pre-fermentativa, cercando di evitare i possibili rischi per la salute umana, legati al suo utilizzo. Inoltre, sempre nella stessa prova, è stato valutato e confrontato anche il livello di azoto prontamente assimilabile (APA) nei campioni di mosto inerbito e quelli non

inerbiti. Nella seconda prova tramite la fermentazione mista sequenziale (*S. bombicola/S. cerevisiae*) è stato valutato l'impiego del lievito non-*Saccharomyces* per ridurre il contenuto di etanolo nel vino, problema particolarmente sentito negli ultimi anni, a causa degli effetti dei cambiamenti climatici che hanno sulla filiera della vite. In entrambe le prove, condotte in vinificazioni su scala pilota, sono stati valutati l'andamento fermentativo, i principali caratteri enologici ed i più importanti metaboliti aromatici prodotti, con l'intento di studiare l'influenza di tali lieviti *non-Saccharomyces* nell'andamento del processo di vinificazione e nel prodotto finale.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento prove sperimentali

3.1.1 Disegno sperimentale delle prove condotte

Nel progetto di Tesi sono state allestite due tipologie di prove fermentative, condotte a partire da mosti diversi, ottenuti durante la vendemmia del 2023. La fase di raccolta, elaborazione delle uve e successive fermentazioni dei mosti, sono state eseguite e monitorate in collaborazione con l'azienda Terre Cortesi Moncaro S.r.l., la più grande cantina della regione Marche, situata a Montecarotto (AN), nella zona di produzione DOC del Verdicchio Classico dei Castelli di Jesi. Nello specifico, le due prove di fermentazione sono state così articolate:

- 1) La prima prova ha previsto l'aggiunta di *M. pulcherrima* (10^6 cell/mL) su mosto rosato in fase di chiarifica del mosto, mantenuto a 10°C per 24 ore. Nella cantina Moncaro è stato condotto e monitorato il processo fermentativo di 3 tipologie di mosto, tutte derivate da uve rosato: un mosto di controllo, un mosto da vigneto inerbito e un mosto da vigneto inerbito con aggiunta iniziale (T0) di uno starter d'inoculo di *M. pulcherrima*. I tre mosti (Controllo, Inerbimento, e Inerbimento + *M.*

pulcherrima) sono stati fermentati in sei serbatoi di acciaio (due serbatoi in duplicato A/B per ciascuna tipologia) e i campioni sono stati prelevati per analisi successive a vari tempi durante il processo fermentativo. L'aggiunta del ceppo di *S. cerevisiae* EC1118 è avvenuta, per tutte le 3 tesi previste in duplicato, 24 ore dopo l'avvio del processo ad una concentrazione di 10^6 cell/mL.

- 2) La seconda prova di fermentazione ha valutato il processo fermentativo a seguito dell'aggiunta dello starter di *S. bombicola* su Montepulciano. La fermentazione è stata condotta su mosto di uve Montepulciano: un mosto di controllo e un mosto con aggiunta iniziale (T0) di uno starter d'inoculo di *S. bombicola* (5×10^6 cell/mL). Ciascun mosto è stato fermentato in due serbatoi di acciaio, ciascuno in duplicato A/B, per un totale di quattro serbatoi. Nel mosto di controllo, l'inoculo del ceppo EC1118 di *S. cerevisiae* è avvenuto al tempo T0, mentre nel caso della fermentazione mista con *S. bombicola*, l'inoculo sequenziale del ceppo di *S. cerevisiae* è avvenuto 72 ore dopo l'avvio del processo. Anche in questa seconda prova fermentativa, i campioni delle 2 tipologie di mosto sono stati prelevati a intervalli regolari per le successive analisi.

3.1.2 Produzione biomassa degli inoculi

I ceppi di lievito utilizzati nelle prove condotte sono:

Genere e specie	Provenienza
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	M48/DISVA 269
<i>Starmerella bombicola</i>	3827 DISVA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EC1118

Tabella 1: Ceppi d'inoculo utilizzati nelle 2 prove.

I ceppi sono stati rinfrescati su terreno YPD agar e conservati alla temperatura di 4°C. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno contenente glicerolo alla temperatura di -80°C. Le precolture di ciascun ceppo di lievito (*M. pulcherrima* e *S. bombicola*), inoculate durante le 2 prove fermentative, sono state allestite su YPD liquido modificato:

- Yeast extract 0.5%
- Peptone 0.1%
- Glucosio 2%

Le precolture sono state poi incubate a 25 °C per 72 ore a 150 rpm. Trascorso tale periodo si è proceduto al recupero della biomassa mediante centrifugazione. L'inoculo del mosto è stato eseguito calcolando la concentrazione cellulare della precoltura, mediante conta microbica totale con camera conta globuli di Thoma, da cui si è potuto stimare il volume dell'inoculo alla concentrazione desiderata. Per tutti e 3 gli inoculi di lievito (*M. pulcherrima*, *S. bombicola*, *S. cerevisiae*) si è raggiunta la concentrazione utile per l'inoculazione nei rispettivi mosti.

3.1.3 Avvio e gestione del processo fermentativo

Come già accennato, le fasi di raccolta ed elaborazione delle uve Rosato e Montepulciano, oltre alle varie fasi di allestimento, avvio e conduzione dei processi di vinificazione, per entrambe le prove, sono state prese in gestione dalla cantina Terre Cortesi Moncaro.

Per la prima prova, con *M. pulcherrima* su Rosato, è stata condotta una vinificazione in bianco di uve Montepulciano. Le uve appena raccolte sono state trattate seguendo la procedura standard di vinificazione: pigiatura e diraspatura, pressatura pneumatica soffice, chiarificazione a freddo a 10 °C per 24 ore, senza aggiunta di SO₂. I mosti delle tre tesi, ciascuna in duplicato A/B,

sono stati lasciare fermentare in tini di acciaio inox da 1 HI, ad una temperatura di 18 °C.

Per la seconda prova, *S. bombicola* su Montepulciano, è stata condotta una vinificazione in rosso classica, che comprende le fasi di pigiatura e diraspatura delle uve, seguita da fermentazione dei mosti delle 2 tesi, in duplicato A/B, in tini di acciaio inox da 1HI, alla temperatura di 25 °C in presenza di bucce fino alla fase di svinatura. Nella prova con inoculo di *S. bombicola*, l'aria è stata fornita per 3 giorni con un flusso di 20 mL/L/min, poi interrotta. I substrati utilizzati per il processo di vinificazione della prima prova, con *M. pulcherrima* su Rosato, erano: un mosto di controllo e un mosto inerbito, che presentavano ciascuno differenti caratteristiche analitiche:

- Parametri analitici mosto di controllo, prova *M. pulcherrima* su Rosato:

ALCOOL	ACIDITA' TOTALE	PH	ZUCCHERI	MALICO	LATTICO	NH2	NH3	APA	CU++	SO2 LIBERA	SO2 TOTALE	BRIX	BABO
0	5,71	3,29	220,46	1,17	0,5	71	3	74	0,76	17	41	22,25	19,17

- Parametri analitici mosto inerbimento, prova *M.pulcherrima* su Rosato:

ALCOOL	ACIDITA' TOTALE	PH	ZUCCHERI	MALICO	LATTICO	NH2	NH3	APA	CU++	SO2 LIBERA	SO2 TOTALE	BRIX	BABO
0	5,65	3,32	219,44	1,22	0,7	84	11	95	0,83	20	42	22,15	19,08

Il mosto adoperato nel processo fermentativo della 2° prova, *S. bombicola* su Montepulciano, presentava, invece, le seguenti caratteristiche analitiche:

ALCOOL	ACIDITA' TOTALE	PH	ZUCCHERI	MALICO	LATTICO	NH2	NH3	APA	CU++	SO2 LIBERA	SO2 TOTALE	BRIX	BABO
0	4,02	3,52	255,71	0,87	0,36	67	6	73	1,32	45	82	25,06	21,56

3.2 Monitoraggio dei processi fermentativi

I differenti parametri analitici di fermentazione sono stati successivamente monitorati e registrati, per ciascuna tesi in duplicato per entrambe le prove, lungo i vari tempi fermentativi, per monitorare lo stato e l'andamento dei processi nel tempo.

3.2.1 Acidità volatile

Per determinare l'acidità volatile è stato utilizzato l'acidimetro Juffman, che consente di effettuare misurazioni rapide, ma precise in corrente di vapore. L'acidimetro Juffman è un apparecchio elettrico che opera su 5 ml di vino e comprende i seguenti componenti:

- Recipiente per la raccolta del vino esausto e delle acque di lavaggio dopo l'analisi.
- Beuta contenente acqua distillata per la generazione del vapore acqueo, riscaldata da una piastra elettrica, e dotata di un tappo a due fori: attraverso un foro passa il tubo di sicurezza, utilizzato anche per riempire la beuta, mentre nell'altro foro è inserita una valvola.
- Valvola per indirizzare il flusso del vapore all'esterno (prima dell'analisi) o dentro il palloncino di distillazione in corrente di vapore (durante l'analisi).
- Palloncino di distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori.
- Mantello scaldante o piastra elettrica per riscaldare il palloncino di distillazione in corrente di vapore.

- Refrigerante.
- Beuta di raccolta del distillato.

Per iniziare, bisogna riempire la beuta generatrice di vapore con acqua distillata fino a metà o poco più del suo volume, e azionare la piastra per portare l'acqua a ebollizione. Si attiva il refrigerante e si posiziona sotto di esso il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle e il flusso di vapore esce dal tubo di sicurezza, si prelevano esattamente 5 ml di vino con una pipetta avvinata (priva di bolle) e si mettono nel palloncino di distillazione. Dopo aver chiuso il palloncino e acceso il mantello scaldante, si attende la formazione delle prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione. A questo punto, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato nel palloncino e investa il vino in ebollizione. Si distillano poi 40 ml di vino, mantenendo costante il livello del vino nel palloncino. Terminata la distillazione, si spegne il mantello scaldante e si riporta la valvola nella posizione iniziale per convogliare nuovamente il vapore all'esterno. Infine, dopo aver aspirato il vino esausto e le acque di scarto, si determina l'acidità volatile mediante una titolazione acidimetrica con una soluzione di NaOH N/50 (0,02 N) in una buretta e 3 gocce di fenolftaleina come indicatore, aggiunto nel

becher contenente il campione, fino a ottenere un viraggio del campione in un colore rosa vivo.

3.2.2 Acidità totale

L'acidità totale viene espressa in g/L di acido tartarico (M.E. = 75) e misurata mediante titolazione con una soluzione standard di una base, utilizzando un pHmetro per rilevare il punto finale. Il procedimento è il seguente: si prelevano 25 ml da ogni campione e si versano in un becher; si immerge l'elettrodo nel vino, che deve essere a una temperatura il più possibile vicina a 20 °C; si titola con NaOH, aggiungendo l'idrossido di sodio goccia a goccia da una buretta fino a raggiungere un pH stabile intorno a 7; si annota la quantità di NaOH utilizzata nella titolazione; infine, si calcola il valore dell'acidità totale di ogni campione analizzato, utilizzando la seguente formula:

Acidità totale (g/L di acido tartarico) = ml di NaOH × 0,75 dove:

ml di NaOH = volume di titolante utilizzato

0,75 = fattore di correzione

3.2.3 Determinazione dell'acido malico

Il rilevamento dell'acido malico richiede due reazioni enzimatiche. Nella prima reazione, riportata di seguito:



catalizzata dalla L-malato deidrogenasi (L-MDH), l'acido malico è ossidato a ossalacetato dalla nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD⁺). Poi si ha un'ulteriore reazione di conversione dell'ossalacetato in L-aspartato e 2-ossoglutarato, in presenza di un grande eccesso di L-glutammato, da parte della transaminasi glutammato-ossalacetato. La quantità di NADH formata nella reazione accoppiata è proporzionale alla quantità di acido malico. Il NADH viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm, determinando così la differenza di assorbanza (A₂-A₁) sia per il bianco che per il campione. Il Δ A L-acido malico si ottiene sottraendo la differenza di assorbanza del bianco dalla differenza di assorbanza del campione. La concentrazione di acido L-malico può essere così calcolata:

$$C = (V \times \text{MW} / \epsilon \times d \times v) \times \Delta A \text{ L-malico (g/L)}$$

Dove:

V = volume finale (ml)

MW = peso molecolare dell'acido malico (g/mol)

E = coefficiente di estinzione del NADH a 340 nm (6300)

d = corsa della luce (cm)

v = volume del campione (ml)

3.2.4 Determinazione degli zuccheri

L'andamento dei processi fermentativi nelle 2 prove è stato inoltre monitorato attraverso l'analisi periodica degli zuccheri, con densimetro Baumè. I risultati ottenuti sono stati inoltre riportati anche in gradi Babo.

3.2.5 Determinazione dell'etanolo (alcool)

La preparazione del campione prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 μm , a cui si aggiunge uno standard interno, il 3-metil-2-butanolo ad una concentrazione di 10 ml/l. A questo punto si procede all'analisi mediante gas-cromatografia (GC) impiegando lo stesso apparecchio utilizzato per l'analisi dei composti volatili e degli alcoli superiori. La calibrazione del sistema analitico è stata effettuata mediante una curva di taratura ottenuta dall'iniezione di soluzioni standard contenenti etanolo a differente concentrazione e lo standard interno. Relativamente alla determinazione gascromatografica dell'etanolo, perciò, i campioni di vino filtrati (filtro cut-off 0.2 μm) sono stati iniettati direttamente utilizzando la colonna 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 di campione;
- temperatura: 40 °C per 5 minuti fino a 150 °C, poi 5 °C per 5 minuti fino a 220 °C, infine 20 °C per due minuti
- gas vettore: azoto.

3.2.6 Determinazione del glicerolo

La determinazione del glicerolo è stata effettuata mediante un kit enzimatico della ditta Megazyme.

La confezione del kit conteneva:

- un flacone con all'interno: glicinglicina buffer (pH 7.4);
- 7 mg di NADH; 22 mg di ATP; 11 mg di PEP-CHA;
- un flacone con 0,4 ml di sospensione di piruvato chinasi e L-lattato deidrogenasi;
- un flacone contenente una soluzione di glicerolchinasi (0,4 ml);

- un flacone con una soluzione di controllo.

Principio:

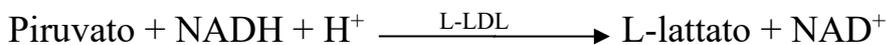
Il glicerolo viene fosforilato dall'ATP attraverso la glicerolo chinasi (GK), per produrre glicerolo-3-fosfato e ADP:



L'ADP formato nella reazione precedente è riconvertito in ATP in presenza di fosfoenolpiruvato (PEP), tramite la piruvato chinasi (PK), con formazione di piruvato:



In presenza dell'enzima L-lattato-deidrogenasi (L-LDH), il piruvato è ridotto a lattato con relativa ossidazione del NADH a NAD⁺.



Il quantitativo di NAD⁺ che si forma è stechiometrico con il quantitativo di glicerolo. Misurando l'assorbanza a 340 nm possiamo risalire alla concentrazione di glicerolo.

Modalità di esecuzione:

Il contenuto del primo flacone, contenente buffer, NADH, ATP e PEP-CHA è stato disciolto in 11 ml di acqua deionizzata (miscela di reazione). Nel mentre sono state preparate una serie di cuvette: bianco, campione 1, campione 2, ecc... Nelle quali sono state aggiunte le seguenti quantità:

	BIANCO	CAMPIONE	CONTROLLO
Soluzione (NADH/ATP/PEP)	2,10 ml	2,00 ml	2,00 ml
Campione	-	0.10ml	
Acqua	2.10 ml	2.00 ml	2.00 ml
Soluzione con PK ed L-LDH	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml
Soluzione di controllo	-	-	100 µl

Tabella 2: quantità di ciascuna soluzione aggiunte alle rispettive cuvette.

Dopo aver ricoperto le cuvette con del parafilm e averle agitate, sono state lasciate riposare per 5-7 minuti ed è stata letta l'assorbanza a 340 nm. Successivamente, ad ogni cuvetta sono stati aggiunti 10 µl di soluzione contenente la glicerolchinasi; dopo averle agitate, capovolgendole dolcemente, sono stati attesi circa 10 minuti, affinché la reazione fosse completata ed è stata letta ed annotata l'assorbanza finale a 340 nm.

Calcoli:

1. $\Delta A = A \text{ iniziale} - A \text{ finale}$
2. **Concentrazione glicerolo (g/l)** = $(\Delta A \text{ campione} - \Delta A \text{ bianco}) \times 0,44$
3. **Controllo (g/l)** = $(\Delta A \text{ controllo} - \Delta A \text{ bianco}) \times 0,44$

3.3 Analisi microbiologiche

Per monitorare l'andamento, nel corso delle fermentazioni, delle differenti tipologie di lieviti inoculati (*M. pulcherrima*/*S. bombicola*/*S. cerevisiae*) e dei lieviti "indigeni" presenti nelle tesi di mosto delle 2 prove, sono state effettuate le conte vitali su piastra delle differenti morfologie di lievito rilevate. I diversi campioni di mosto, (in duplicato A/B), sono stati prelevati dalle vasche di fermentazione nei vari tempi di fermentazione (T0, T1, T2, ecc... Fino a termine del processo fermentativo), per entrambe le prove, poi trasportati presso il laboratorio per le successive analisi microbiologiche.

3.3.1 Conte vitali

Per effettuare le conte vitali su piastra è stato utilizzato il metodo delle diluizioni seriali (figura 6). È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è

stato aggiunto a una provetta contenente 9 ml di acqua sterile, ottenendo una diluizione 1:10 (10^{-1}). Dopo aver agitato, è stato prelevato 1 ml da tale soluzione e trasferito in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Tale processo è stato ripetuto fino a raggiungere le diluizioni desiderate, pronte per la semina su piastra.

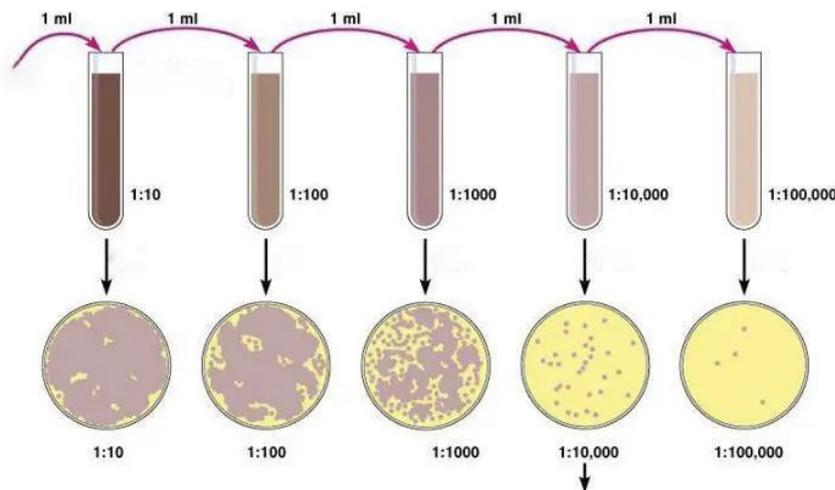


Figura 6: metodo delle diluizioni seriali per le conte vitali (Microbiologia Italia).

Successivamente, 100 μ l di ciascuna sospensione sono stati trasferiti su delle piastre Petri, precedentemente preparate con terreno WL. Utilizzando una bacchetta di vetro a forma di "L", immersa in alcool, passata alla fiamma e raffreddata sul bordo della piastra, è stata effettuata la procedura di semina per spatolamento. Le piastre sono state poi messe ad incubare a 25°C per 2/3 giorni. Atteso il periodo di incubazione, sono state effettuate le conte su piastra delle diverse morfologie di colonie cresciute.



Figura 7 e 8: allestimento diluizioni seriali e semina su piastre WL.

3.3.2 Terreni utilizzati

Sono stati utilizzati per la crescita dei ceppi: il terreno WL e la sua variante WL+ Bifenile, (permette di rallentare la crescita delle muffe), mentre per quanto concerne l'isolamento e il mantenimento nel tempo dei ceppi è stato adoperato il terreno YPD.

WL (Wallerstein Laboratory) NUTRIENT AGAR 80g/L:

È un terreno solido differenziale utilizzato per l'analisi qualitativa e quantitativa della popolazione microbiologica, in particolare dei lieviti, durante le fasi di produzione dei prodotti alcolici fermentati, come vino e birra. La sua composizione in polvere è la seguente: estratto di lievito (4 g/l), triptone (5 g/l), destrosio (50 g/l), fosfato di potassio diidrogeno (0,55 g/l), cloruro di potassio (0,425 g/l), cloruro di calcio (0,125 g/l), solfato di magnesio (0,125 g/l), cloruro

di ferro (0,0025 g/l), solfato di manganese (0,0025 g/l), verde di bromocresolo (0,022 g/l) e agar (15 g/l). Circa 80 g di questa polvere vengono disciolti in 1 litro di acqua distillata e la soluzione viene portata ad ebollizione. Successivamente, il terreno viene distribuito in piastre Petri sterili, pronte per l'utilizzo.

YPD (Yeast peptone dextrose)

Questo terreno ricco contiene fonti di amminoacidi, vitamine e carbonio, che permettono la rapida crescita dei lieviti e la corretta conservazione dei ceppi nel tempo. La sua composizione è la seguente: estratto di lievito (10 g/L), peptone (20 g/L), D-glucosio (20 g/L), estratto di malto (30 g/L). Per la preparazione, tutti gli ingredienti in polvere vengono pesati e la miscela viene portata a volume in 1 litro di acqua distillata. La soluzione viene poi sterilizzata in autoclave e successivamente distribuita in piastre Petri.

3.4 Gas cromatografia

3.4.1 Analisi dei composti volatili

La determinazione della componente volatile prodotta è stata effettuata tramite la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). Questa tecnica

può essere applicata in due modalità: SPME a immersione diretta (DI-SPME) o SPME in spazio di testa (HS-SPME). In questo studio, l'analisi è stata condotta utilizzando la modalità HS-SPME con una fibra a tripla fase composta da divinilbenzene (DVB), carboxen (CAR) e polidimetilsilossano (PDMS) (figura 9).

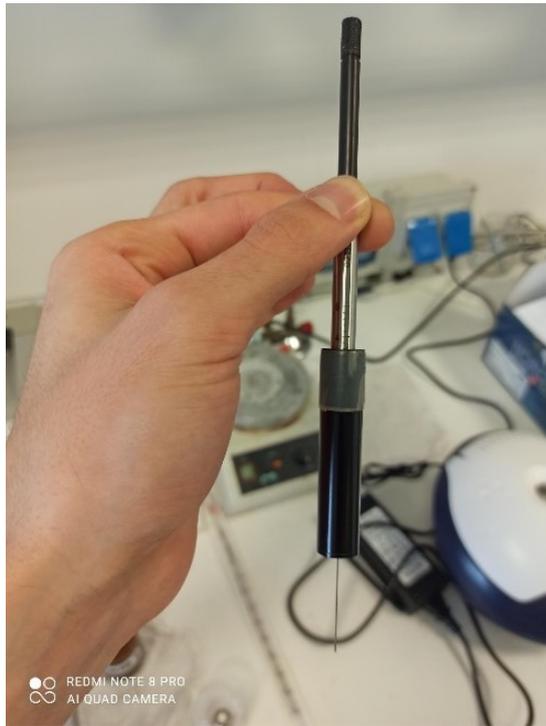


Figura 9: fibra a tripla fase divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS).

Una piccola aliquota di campione (5 ml) viene aggiunta, (tramite pipetta monouso da 10mL), all'interno di un flacone vial. Successivamente, al campione presente nella vial, viene aggiunto 1 g di NaCl, viene inserita un'ancoretta magnetica, chiusa la vial con tappo in teflon e il tutto posto in

agitazione al minimo per 10 minuti, a T ambiente. L'aggiunta dell'NaCl e l'agitazione facilitano il passaggio delle componenti volatili dalla fase liquida alla regione sovrastante (spazio di testa) della vial. Trascorsi i 10 minuti, avviene l'inserimento della fibra nella vial. Regolare il supporto della fibra sul valore 1 (consultare la scala graduata presente sul supporto). Prendere il supporto della fibra e la vial, posizionando quest'ultima in un apposito becker, per facilitare la stabilità del supporto. Spostarsi vicino alla stufa, precedentemente impostata alla temperatura di 55°C. Posizionare il becker contenente la vial nella stufa e inserire il supporto della fibra nel gommino di teflon presente sul tappo della vial. Verificare che il supporto rimanga in posizione verticale e sia stabile. Una volta confermata la stabilità, estrarre delicatamente la fibra dal supporto e bloccarla. L'intero sistema viene mantenuto in stufa alla temperatura di 55°C per 30 minuti. Trascorsi i 30 minuti, rimettere delicatamente la fibra nel supporto. Una volta che la fibra è stata inserita, estrarre con cura il supporto dalla vial. Spostarsi con il supporto e la vial nei pressi del gascromatografo (GC). Impostare il supporto della fibra a 3,6 ed inserire, con cura, il supporto nel gommino apposito presente sul GC. Estrarre la fibra e bloccarla. A questo punto per iniziare l'analisi, dal terminale GC solution, presente sul PC di controllo dello strumento, premere "START" e

il sistema passerà direttamente allo stato “ACQUIRE”. Trascorsi 5 minuti dall’avvio della corsa, chiudere la fibra ed estrarre il supporto, (verificare sempre che la fibra non si sia danneggiata nella procedura). L’analisi per la determinazione delle componenti volatili, (per ciascuna tesi analizzata in entrambe le prove), ha richiesto una durata di circa 82 minuti. Al termine della corsa, il programma “GC solution”, ha restituito un cromatogramma per ciascun campione analizzato. Evidenziando nel cromatogramma i valori di area di ciascun picco di ritenzione, corrispondenti ai composti volatili ricercati e facendo riferimento allo standard interno S.I., (tramite apposita formula matematica caricata su Excel), si è riusciti a risalire alla concentrazione, (espressa in mg/L), di ciascun composto volatile presente nei campioni analizzati.

3.4.2 Analisi alcoli superiori

La preparazione dei campioni/tesi per le analisi degli alcoli superiori ha previsto la filtrazione di 10 ml di ciascun campione di vino, utilizzando un filtro non sterile, con cut-off di 0,2 μm , ai quali sono stati aggiunti 2 μl di standard (1-pentanol). Dopo la preparazione iniziale di ciascun campione in steriline, con aggiunta dello standard, si è passati all'analisi dei campioni tramite gas-cromatografia. La calibrazione del sistema analitico è stata eseguita mediante

una curva di taratura, ottenuta dall'iniezione di soluzioni standard contenenti i composti volatili da analizzare a diverse concentrazioni. Dopo una fase di settaggio preliminare dello strumento (GC), tramite il "software GC solution", presente nel terminale di controllo, si è passati alla procedura di prelievo del campione per l'analisi. Innanzitutto, prima di procedere con il prelievo, viene effettuata la pulizia della siringa da iniezione Hamilton tramite acqua ultrapura ed esano (la procedura è stata eseguita anche tra un campione e il successivo della serie). Una volta effettuata la pulizia della siringa, si preleva 1 µl di campione, facendo molta attenzione ad avvinare bene la siringa e cercando di evitare la formazione di bolle. A questo punto la determinazione gascromatografica degli alcoli superiori è stata effettuata iniettando direttamente il volume di campione di vino prelevato in una colonna Zebron ZB-WAX Plus, secondo il seguente protocollo:

- Temperatura dell'iniettore: 150 °C
- Colonna: Zebron ZB-WAX Plus in polietilenglicole
- Iniettore: siringa Hamilton, iniezione di 1 µl di campione
- Programma di temperatura: 40 °C per 5 minuti fino a 150 °C, poi 5 °C per 5 minuti fino a 220 °C, infine 20 °C per due minuti.



Figura 10: da sx dettaglio della siringa Hamilton usata per il prelievo e immagine del GC utilizzato per la determinazione dei volatili e alcoli superiori.

Così come per l'analisi dei volatili, al termine della corsa, della durata di 40-45 minuti, il programma "GC solution" restituisce dei cromatogrammi con dei picchi, che corrispondono ciascuno allo specifico tempo di ritenzione di un composto. I picchi vengono adeguatamente ripuliti ed integrati e il programma, sulla base della grandezza delle aree dei picchi individuati, è in grado di calcolare, in automatico, il valore di concentrazione di ciascun composto, (espresso in mg/L), presente nel campione.

3.5 Identificazione e analisi molecolari

Le procedure di analisi molecolare sono state utilizzate nella seconda prova della Tesi: "*S. bombicola* su Montepulciano". Durante la fase di conte e valutazione quali-quantitativa delle colonie, sia su piastra che al microscopio ottico, è emersa una notevole somiglianza e un'estrema difficoltà nell'identificazione, in particolare di 3 differenti morfologie di lievito, che sembravano tutte appartenere al genere *Starmerella spp.* Pertanto, si è deciso di affidarsi alle analisi molecolari per identificare la morfologia del lievito d'inoculo *S. bombicola 3827* e cercare di distinguerla dalle altre 2 morfologie di lieviti, anch'esse appartenenti al genere *Starmerella spp.*, ma facenti parte del microbiota selvaggio. Per eseguire questa operazione, è stato necessario iniziare con l'estrazione del DNA di tutti i lieviti "sospetti", isolati prima in colonie singole su terreno YPD, utilizzando una tecnica specifica per i lieviti *non-Saccharomyces*. Successivamente, la regione ITS è stata amplificata tramite PCR, per ottenere i rispettivi profili molecolari. È stata effettuata, inoltre, una valutazione preliminare della migrazione degli amplificati su gel elettroforetico ed infine i risultati ottenuti dal sequenziamento hanno

permesso di identificare, con un'alta percentuale d'identità, le diverse morfologie di lievito precedentemente isolate.

3.5.1 Estrazione del DNA

Come accennato in precedenza, per l'estrazione del DNA dalle colonie sottoposte a identificazione molecolare, è stato utilizzato un protocollo specifico per l'estrazione di DNA da lieviti *non-Saccharomyces*. Ecco nello specifico i passaggi eseguiti:

- 1) Crescita O.N. delle cellule su piastra (YPD-agar).
- 2) Prelevare le cellule dalla piastra con un'ansa di plastica (1/8 della superficie totale) e metterle in un'epENDORF con 300 µl di tampone (0.1M Tris pH 8,5, 50 mM EDTA pH8, 1% SDS).
- 3) Aggiungere le sferette di vetro (circa 1/3 del contenuto dell'epENDORF).
- 4) Vortexare per 1 min e porre in ghiaccio per 1 min (ripetere tre volte).
- 5) Bollire le epENDORF in acqua per 10 min.
- 6) Mettere in ghiaccio per 3 min.
- 7) Aggiungere 20 µl TRIS HCL M1 e 15 µl di EDTA 0.5M.
- 8) Aggiungere 50 µl di SDS 10% e mescolare con la pipetta.

- 9) Aggiungere 200 μ l di potassio acetato 5M e spipettare brevemente.
- 10) Porre 30 min in ghiaccio.
- 11) Centrifugare 10 min a 14000 rpm.
- 12) Prelevare 500 μ l di sovrinatante (buttare via le sferette) e aggiungere un egual volume di isopropanolo freddo (-20°C).
- 13) Incubare 5 min in ghiaccio e centrifugare 10 min a 14000 rpm.
- 14) Eliminare il sopranatante ed aggiungere 500 μ l di etanolo al 70% freddo (-20°C).
- 15) Centrifugare per 5 min ed eliminare l'etanolo.
- 16) Risospendere su 100 μ l di TE pH 8.
- 17) Incubare in stufa a 30°C per 15 min (va bene anche 45°C).
- 18) Spipettare bene, vortexare e conservare a -20°C.

3.5.2 Reazione di amplificazione tramite PCR

I geni che codificano per i diversi frammenti di rRNA sono ripetuti e formano le regioni organizzatrici del nucleolo (NOR, Nucleolus Organizer

Region). All'interno del cromosoma, questi geni sono raggruppati in unità strutturali, separate da sequenze non codificanti, chiamate spaziatori non trascritti (NTS, Non Transcribed Spacer) o spaziatori intergenici (IGS, Intergenic Spacer). Ogni unità strutturale è composta da un trascritto esterno spaziatore (ETS, External Transcribed Spacer), situato all'estremità 3' del gene 18S, e due trascritti interni spaziatori (ITS, Internal Transcribed Spacer): l'ITS1 tra il gene 18S e il gene 5,8S, e l'ITS2 tra il gene 5,8S e l'estremità 3' del gene 28S. Nello studio condotto, abbiamo amplificato una regione che comprende le due regioni spaziatrici interne e l'RNA ribosomiale 5,8S; la dimensione e la struttura nucleotidica di questa regione variano da specie a specie, rendendo l'amplificazione di questo frammento genomico ideale per la nostra ricerca.

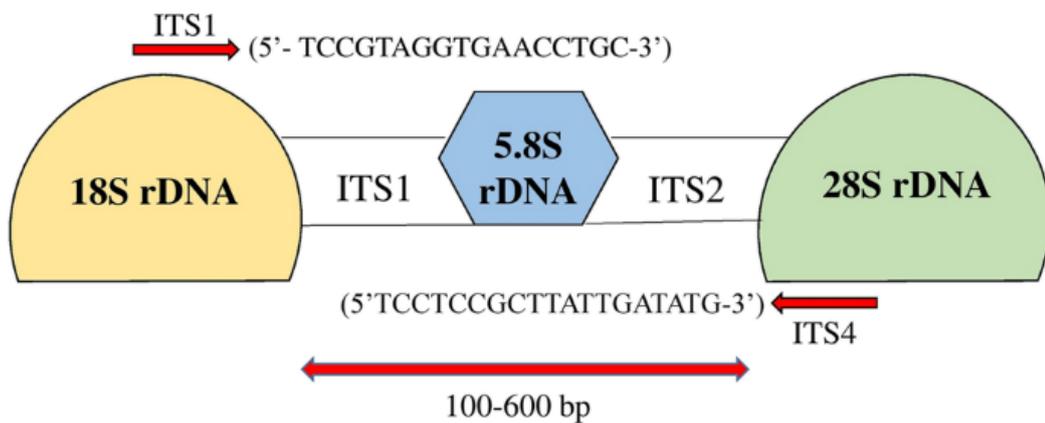


Figura 11: dettaglio della regione amplificata mediante reazione di PCR.

Sequenze dei primer utilizzati nella reazione di PCR:

primer ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTCGCG-3'

Primer ITS4: 5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3'

Si è preparata la mix così composta, per ottenere un volume finale di 50 µl:

- Acqua molecolare 40.9 µL
- Buffer 5 µL
- dNTPs (10 µM) 0.5 µL
- ITS1 (50 µM) 0.5 µL
- ITS4 (50 µM) 0.5 µL
- Taq polimerasi 0.1 µL
- DNA 2.5 µL

Le work solution dei dNTPs e dei primers sono state preparate a partire dagli stock a -20°C, sfruttando l'equazione matematica:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Sono stati effettuati 34 cicli termici di PCR con le seguenti caratteristiche: Denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita da un altro minuto a 94°C; annealing a 55°C per 45 secondi; allungamento a 72°C per 2 minuti; nell'ultimo ciclo la fase di allungamento a 72°C ha una durata di 10 minuti.

3.5.3 Elettroforesi su gel di agarosio

Gli ampliconi ottenuti dalla reazione di PCR sono stati separati su un gel di agarosio preparato con una concentrazione di 1,5 g di agarosio per 100 mL di tampone TBE 0,5X. Il TBE 0,5X è stato ottenuto diluendo 100 mL di una soluzione stock di TBE 5X, composta da 54 g/L di Trizma base, 27,5 g/L di acido borico e 20 mL di EDTA, con 900 mL di acqua deionizzata. Nel primo pozzetto del gel sono stati caricati 3 μ L di marcatore (1 Kb DNA Ladder ready to use, GeneRuler™). In tutti gli altri pozzetti, sono stati caricati 8 μ L di amplicone, miscelati con 2 μ L di colorante Safe Green. Le condizioni per l'elettroforesi sono state impostate a 80 Volt per circa un'ora. Le immagini del gel sono state visualizzate utilizzando una lampada UV.

3.5.4 Sequenziamento

Il sequenziamento della regione ITS è stato eseguito utilizzando il metodo di Sanger automatizzato ⁵⁴. Le sequenze ottenute in formato FASTA sono state confrontate con quelle presenti nella banca dati GenBank tramite il BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) per identificare i frammenti.

3.6 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle analisi di alcoli superiori, composti volatili e dati finali degli analiti di entrambe le prove condotte, sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA). Le medie ottenute sono state elaborate utilizzando il software STATISTICA 7. Le differenze significative tra le medie sono state determinate mediante il test di Duncan, con un livello di significatività fissato a $P < 0,05$.

CAPITOLO 4: RISULTATI

4.1 Risultati prova: *M. pulcherrima* su Rosato

4.1.1 Conte ed evoluzione microbica

Le conte vitali su piastra sono state effettuate ai vari tempi di fermentazione (dal giorno 0 al giorno 10) andando a misurare le unità formanti colonia CFU/ml in scala logaritmica, così da poter monitorare l'evoluzione della popolazione microbica durante il processo fermentativo. Nella figura 12 viene riportato l'andamento nel tempo del ceppo di *S. cerevisiae* e dei *non-Saccharomyces*. Il numero di colonie appartenenti a ciascuna categoria di lievito è stato espresso, tramite il grafico, come logaritmo del valore medio di lieviti rilevato tra i campioni A/B di ciascuna Tesi e ne è stato riportato anche il valore di deviazione standard, calcolato sui valori LogA e LogB per ciascuna tipologia di lievito, ai vari tempi fermentativi.

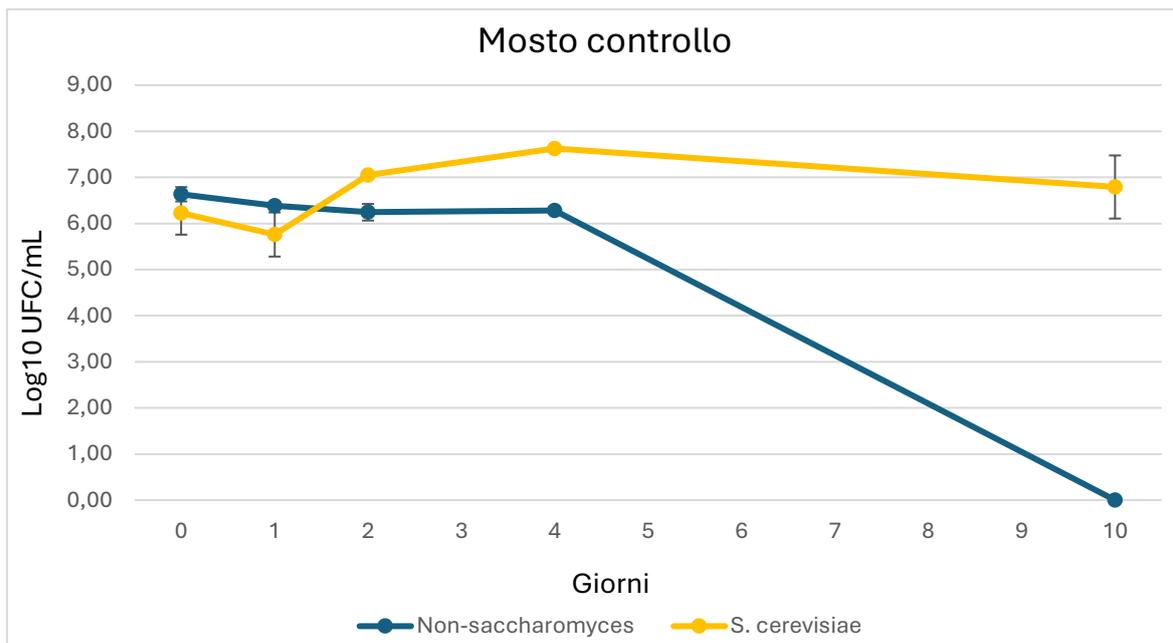


Figura 12: Evoluzione della popolazione microbica presente nel mosto di controllo: *S. cerevisiae* e *non-Saccharomyces*.

Come possiamo apprezzare dalla figura 12: i lieviti *non-Saccharomyces*, rimangono presenti nel mosto, (con valori di concentrazione superiori a 10^6 UFC/mL), per i primi 4 giorni di fermentazione, mentre il *S. cerevisiae EC1118*, domina il processo fermentativo dal secondo giorno sino al termine della fermentazione, dove rimane presente ad elevate concentrazioni ($\approx 10^7$ UFC/mL).

Nella figura 13, seguendo le stesse procedure per le conte e la rappresentazione grafica dei dati, viene riportata l'evoluzione della popolazione microbica presente nei mosti, (in duplicato A/B), proveniente da vigneto inerbito.

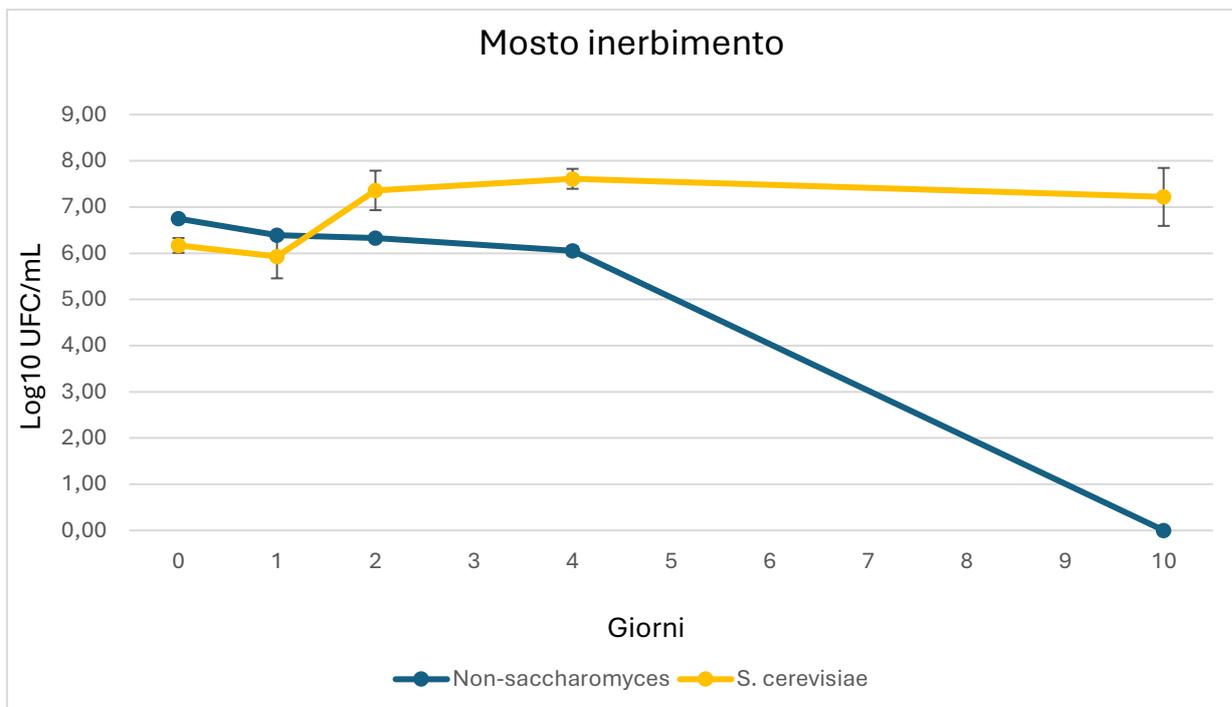


Figura 13: Evoluzione della popolazione microbica presente nel mosto inerbimento: *S. cerevisiae* e *non-Saccharomyces*.

Come possiamo vedere dalla figura 13, anche qui, i lieviti *non-Saccharomyces* persistono nel mosto fino al 4° giorno di fermentazione, con valori di concentrazione superiori a 10^6 UFC/mL, per poi scomparire lentamente alla fine del processo. Il lievito *S. cerevisiae EC1118* d'inoculo mostra, invece, un

andamento molto simile a quello rilevato nel mosto di controllo, con una crescita di circa 1 log UFC/mL nella prima fase fermentativa, per poi subire un assestamento della crescita nella fase intermedia fino a fine fermentazione, con concentrazione superiore a 10^7 UFC/mL.

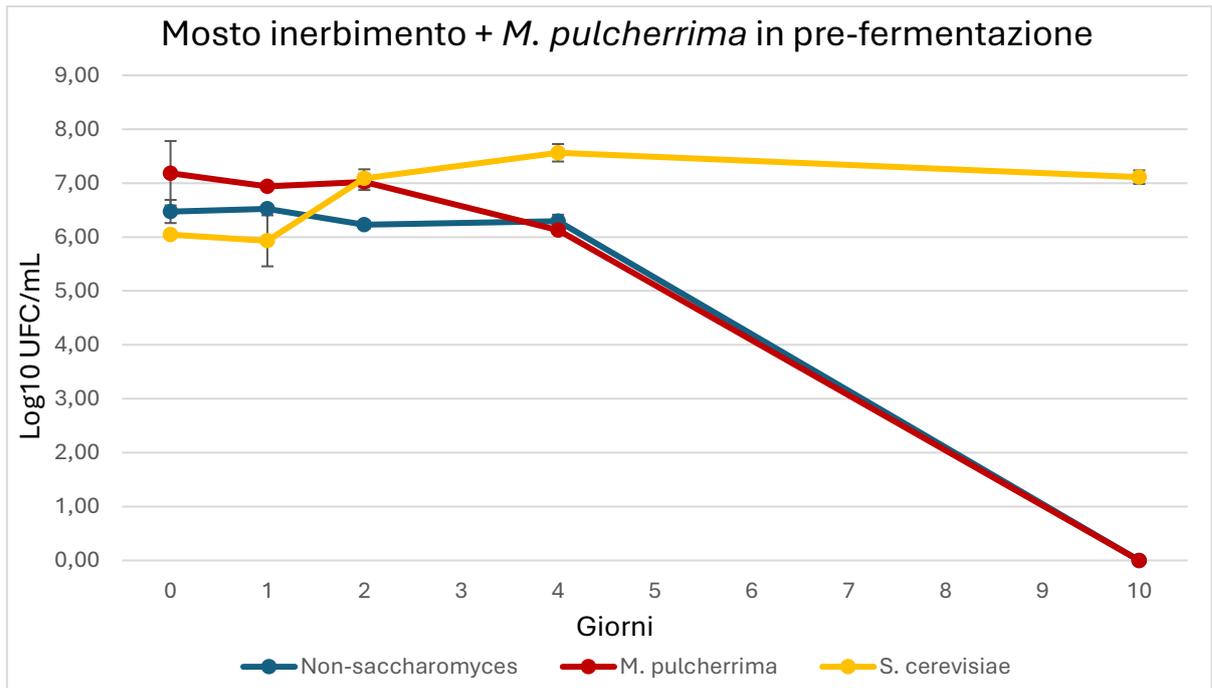


Figura 14: Evoluzione della popolazione microbica, presente nel mosto inerbimento con aggiunta di *M. pulcherrima* M48: *S. cerevisiae*, non-Saccharomyces e *M. pulcherrima*.

Nella figura 14 l'aggiunta in fase pre-fermentativa di *M. pulcherrima* M48 ha determinato un trend paragonabile delle popolazioni di lieviti non-Saccharomyces e *S. cerevisiae* EC1118 a quello presente nel mosto di controllo e in quello proveniente da vigneto inerbito, ma con una concentrazione iniziale

più bassa dei non-*Saccharomyces* (circa 1 log inferiore). Da notare, inoltre, come il lievito *M. pulcherrima*, dopo una prima fase di crescita ad elevate concentrazioni (10^7 UFC/mL), tenda a diminuire progressivamente; dal 4° giorno fino a scomparire del tutto a fine fermentazione.

4.1.2 Valutazione attività di biocontrollo di *M. pulcherrima*

La potenziale azione di biocontrollo del lievito d'inoculo *M. pulcherrima* M48 sui lieviti "indigeni" presenti nel mosto, è stata valutata confrontando i valori di log₁₀ UFC/mL dei lieviti *non-Saccharomyces* nel mosto proveniente da un vigneto inerbito con e senza l'aggiunta di *M. pulcherrima*. L'analisi è stata condotta durante la fase iniziale di chiarifica di 24 ore a 10°C, comparando i risultati tra il tempo T0 e il tempo T1 di fermentazione. Nella figura 15 A, si può osservare che nel mosto proveniente da parcelle inerbite, senza l'aggiunta di *M. pulcherrima* M48, il numero di lieviti *non-Saccharomyces* aumenta di circa un ordine di grandezza logaritmica durante la prima fase di chiarifica del mosto, tra i tempi T0 e T1. Come previsto, i lieviti *non-Saccharomyces*, costituiti principalmente da lieviti apiculati (*Hanseniaspora spp.*), mostrano un netto incremento durante la fase di chiarifica.

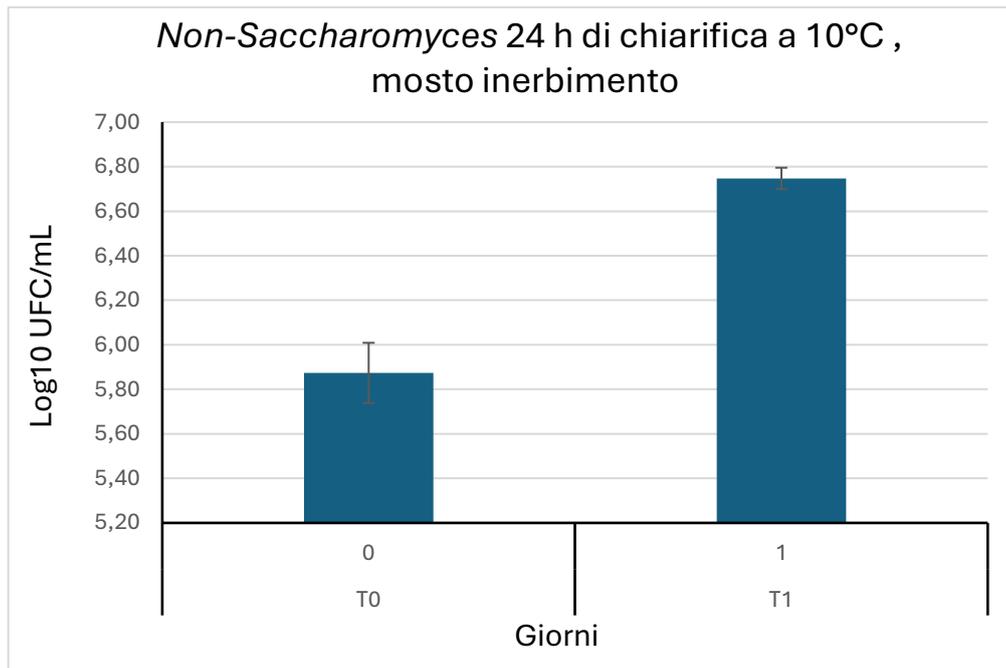


Figura 15 A: Confronto del numero di lieviti *non-Saccharomyces* presenti nel mosto proveniente da parcelle inerbite, valutati nella fase di chiarifica di 24h a 10°C. In ascissa vengono riportati il giorno 0 (T0) e 1 (T1) di fermentazione e in ordinata il numero di lieviti *non-Saccharomyces*, espresso in Log10 UFC/mL.

Dai valori riportati nella figura 15 B, si può evidenziare invece come l'aggiunta dell'inoculo di 10^6 cell/mL di *M. pulcherrima* M48, in fase di chiarifica di 24h a 10°C, al mosto proveniente da parcelle di vigneto inerbite, permetta in qualche modo di controllare il numero di lieviti selvaggi, (soprattutto apiculati), presenti nel mosto. Seppur in questa Tesi (figura 15 B), il numero di lieviti *non-Saccharomyces* parta da un valore più elevato di Log₁₀ UFC/mL, rispetto al

grafico riferito alla Tesi di mosto proveniente da parcelle inerbite (figura 15 A), si può constatare come lo stesso numero di lieviti al tempo T1 non aumenti come nel caso del grafico precedente, ma anzi, subisca addirittura un lieve calo. Il valore di Log₁₀ UFC/mL dei lieviti *non-Saccharomyces* tra T0 e T1 nella figura 15 B, passa infatti da un valore di 6,55 ad un valore di 6,47, suggerendo un'azione di biocontrollo da parte del lievito d'inoculo *M. pulcherrima*, sulla popolazione di lieviti indigeni presente nel mosto proveniente da vigneto inerbito.

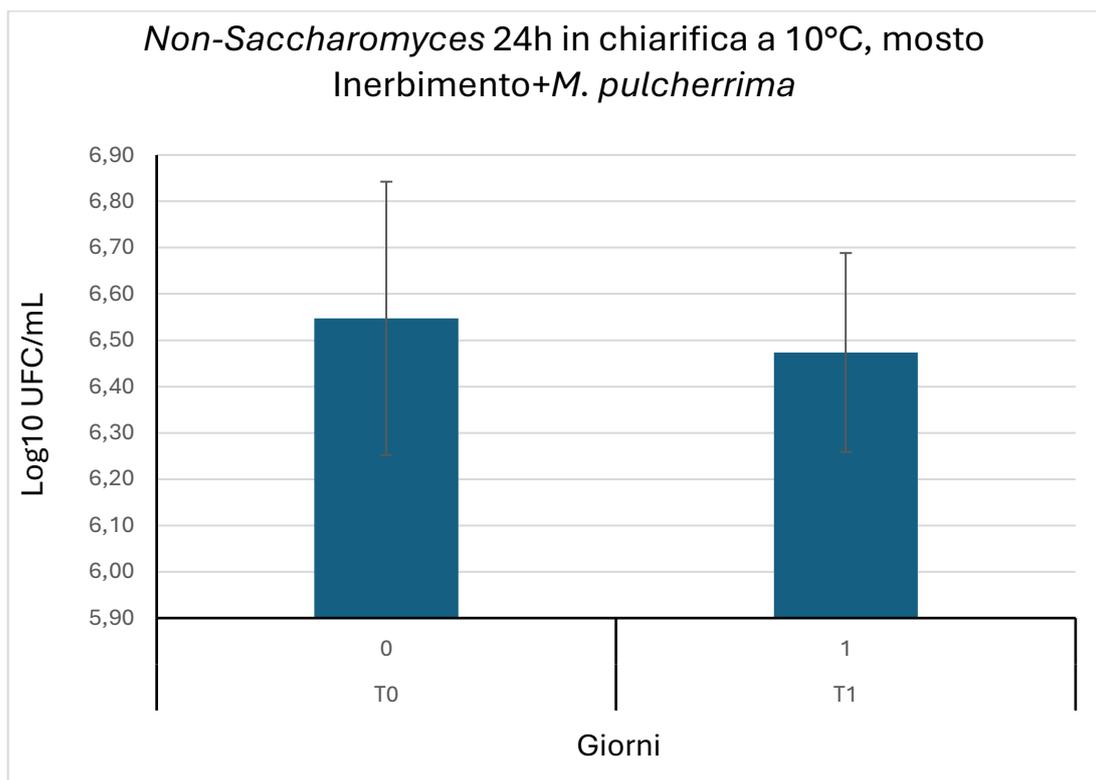


Figura 15 B: confronto del numero di lieviti *non-Saccharomyces* presenti nel mosto proveniente da parcelle inerbite, valutati nella fase di chiarifica di 24h a 10°C.

4.1.3 Analisi dati finali degli analiti

L'analisi dei principali analiti è stata effettuata utilizzando i dati finali di fermentazione per ciascuna prova.

	Controllo	Inerbimento	Inerbimento + <i>M. pulcherrima</i>
pH	3,25 ± 0,01 a	3,23 ± 0,00 a	3,25 ± 0,04 a
Zuccheri (g/L)	2,51 ± 0,30 a	2,59 ± 0,81 a	2,25 ± 0,06 a
Acidità volatile (g/L acido acetico)	0,23 ± 0,00 a	0,21 ± 0,01 a	0,23 ± 0,01 a
Acidità totale (g/L acido tartarico)	6,73 ± 0,08 a	6,64 ± 0,06 a	6,59 ± 0,21 a
Alcool (% V/V)	13,46 ± 0,00 a	13,38 ± 0,07 a	13,21 ± 0,04 b
Malico (g/L)	1,31 ± 0,09 a	1,27 ± 0,01 a	1,25 ± 0,08 a
Lattico (g/L)	0,14 ± 0,03 a	0,10 ± 0,02 a	0,08 ± 0,06 a
Estratto netto (g/L)	21,18 ± 0,25 a	20,25 ± 0,10 b	20,46 ± 0,16 b
SO₂ libera	14,50 ± 0,71 a	14,50 ± 2,12 a	13,50 ± 0,71 a
SO₂ totale	66,50 ± 2,12 a	66,00 ± 2,83 a	60,00 ± 1,41 a

Tabella 3: nella tabella sono mostrati i principali caratteri analitici analizzati per le 3 Tesi in duplicato A/B: mosto controllo, mosto proveniente da parcelle inerbite, mosto proveniente da

parcelle inerbite + aggiunta di *M. pulcherrima* M48. I valori riportati si riferiscono ai dati finali, indicati come valore medio +/- dev.st. I dati sono stati inoltre sottoposti ad analisi di significatività statistica, lettere diverse (a, b, c) tramite il Duncan's test (0.05%), utilizzando il software di analisi statistica: "Statistica 7".

Come possiamo osservare dai valori medi \pm deviazione standard dei diversi analiti indicati in tabella, non emergono differenze significative. L'unico parametro che mostra una piccola variazione è la percentuale di etanolo (alcool) prodotta. Nel mosto proveniente da parcelle inerbite con l'aggiunta di *M. pulcherrima*, si nota un lieve calo, anche l'estratto netto (g/L) sembra essere leggermente superiore nella tesi del mosto di controllo, rispetto alle altre due. Per gli altri parametri analitici non si evidenziano differenze significative.

4.1.4 Analisi composti volatili e alcoli superiori prodotti

L'analisi dei principali composti volatili e degli alcoli superiori presenti nei vini finali è riportata nella Tabella 4.

	Controllo	Inerbimento	Inerbimento + <i>M. pulcherrima</i>
Esteri (mg/L)			
Etilbutirrato	0,188 ± 0,025 b	0,796 ± 0,006 a	0,113 ± 0,006 c
Etilacetato	9,776 ± 0,224 a	9,556 ± 0,529 a	11,096 ± 0,844 a
Feniletilacetato	0,074 ± 0,015 a	0,075 ± 0,011 a	0,092 ± 0,031 a
Etilottanoato	0,003 ± 0,000 a	0,003 ± 0,000 a	0,003 ± 0,000 a
Acetato di isoamile	1,064 ± 0,426 a	1,261 ± 0,199 a	0,954 ± 0,017 a
Esilacetato	0,001 ± 0,000 b	0,002 ± 0,000 a	0,003 ± 0,000 a
Dietilsuccinato	0,019 ± 0,000 a	0,024 ± 0,003 a	0,008 ± 0,001 b
Composti carbonilici (mg/L)			
Acetaldeide	17,410 ± 1,829 a	16,426 ± 1,278 a	17,050 ± 2,301 a
Terpeni (mg/L)			
Linalolo	0,034 ± 0,011 a	0,037 ± 0,006 a	0,038 ± 0,002 a
Geraniolo	0,029 ± 0,019 a	0,083 ± 0,052 a	0,127 ± 0,028 a
Nerolo	0,099 ± 0,008 b	0,031 ± 0,029 c	0,160 ± 0,013 a
Norisoprenoidi (mg/L)			
β-damascenone	0,016 ± 0,003 a	0,015 ± 0,007 a	0,030 ± 0,016 a
Alcoli (mg/L)			
Esanolo	0,037 ± 0,001 b	0,051 ± 0,007 a	0,024 ± 0,003 b
2-feniletanolo	60,75 ± 6,95 a	50,23 ± 5,15 a	67,11 ± 10,20 a
Alcoli superiori (mg/L)			
Propanolo	16,018 ± 0,383 a	16,429 ± 0,566 a	17,636 ± 0,833 a
Isobutanolo	15,211 ± 0,985 a	11,497 ± 0,088 b	13,196 ± 0,185 b
Amilico attivo	57,799 ± 4,777 a	39,497 ± 3,040 b	30,961 ± 0,050 b
Isoamilico	117,280 ± 5,935 b	141,753 ± 0,043 a	141,718 ± 1,185 a

Tabella 4: nella tabella vengono riportati i valori di concentrazione dei principali composti volatili ed alcoli superiori, rilevati tramite analisi al GC e suddivisi nelle rispettive categorie di appartenenza. I dati sono relativi ai valori di media ± deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative con lettere diverse (a, b, c) elaborate con il Duncan's test (0.05%).

Dai dati riportati nella Tabella 4, non emergono differenze statisticamente significative per quanto riguarda le concentrazioni degli esteri: etil acetato, fenil etil acetato, etil ottanoato e acetato di isoamile. I valori di concentrazione di questi esteri risultano essere molto simili in tutte e tre le condizioni sperimentali. L'etil butirrato presenta concentrazioni significativamente superiori nel mosto inerbimento in confronto al mosto di controllo e al mosto inerbimento + *M. pulcherrima*, dove sono osservati valori inferiori. L'etil acetato si trova a concentrazioni maggiori nei mosti inerbimento ed inerbimento + *Mp* rispetto al controllo, sebbene le concentrazioni siano molto basse in tutte e tre le condizioni sperimentali. Infine, il dietil succinato mostra concentrazioni superiori nei mosti di controllo ed inerbimento, (lettere "a"), rispetto al mosto inerbimento + *Mp* (indicato dalla lettera "b"). Per ciò che riguarda l'acetaldeide e il β -damascenone: non si notano differenze di concentrazione significative nelle 3 Tesi. In merito ai terpeni, è da sottolineare come le concentrazioni riportate per il linalolo, geraniolo e nerolo siano maggiori per il mosto inerbimento + *Mp* rispetto alle altre 2 Tesi, anche se tanto il linalolo, quanto il geraniolo, non evidenziano differenze significative. Il nerolo, invece, mostra concentrazioni più elevate in presenza di *M. pulcherrima* in fase di chiarifica (mosto inerbimento + *Mp*). Il 2-feniletanolo, non evidenzia

differenze significative. L'esanolo sembra essere stato prodotto in quantità più elevate nel mosto inerbimento. Circa la produzione di alcoli superiori: l'isobutanolo è presente in quantità inferiori nei mosti inerbimento, con e senza aggiunta dell'inoculo di *M. pulcherrima*, mentre l'isoamilico presenta concentrazioni maggiori proprio nelle 2 tesi provenienti da parcelle inerbite, rispetto al controllo. Il propanolo non sembra manifestare nelle 3 prove differenze significative, mentre la produzione di amilico attivo risulta essere nettamente superiore nel mosto controllo, rispetto alle altre 2 Tesi.

4.2 Risultati prova: *S. bombicola* su Montepulciano

4.2.1 Risultati analisi molecolari e sequenziamento

Come già accennato, durante la fase di conte e valutazione quali-quantitativa (macro-micro morfologica) delle colonie, è emersa una notevole somiglianza e un'estrema difficoltà nell'identificazione, in particolare, di 3 differenti morfologie di lievito, che sembravano potessero appartenere al genere *Starmerella spp.* Pertanto, si è deciso di affidarsi alle analisi molecolari per identificare la morfologia del lievito d'inoculo *S. bombicola 3827* e distinguerla dalle altre 2 morfologie di lieviti, anch'esse appartenenti al genere

Starmerella spp., ma facenti parte del microbiota selvaggio. La prima procedura, seppur molto complessa e delicata, è stata quella di cercare di isolare dalle piastre di terreno WL in terreno YPD le 3 morfologie di lieviti “sospette”, per poi andarle ad identificare con i successivi step molecolari di: estrazione del DNA, amplificazione della regione ITS, corsa elettroforetica degli amplificati e step di sequenziamento finale. Nella figura 12 è mostrato il profilo elettroforetico ottenuto dalla migrazione degli amplificati della regione ITS per i 4 isolati di lieviti: 1A, 1B, 1I, *S. bombicola* 3827 d’inoculo. Come si può notare da questa prima corsa effettuata, i profili di migrazione degli amplificati delle morfologie 1I e 1A risultano essere sovrapponibili a quello della *S. bombicola* d’inoculo (si ritrovano infatti alla stessa altezza) e si attestano sulle 600bp circa. Mentre la migrazione della banda relativa all’amplificato della morfologia 1 B si ritrova ad un’altezza superiore alle 1000bp.

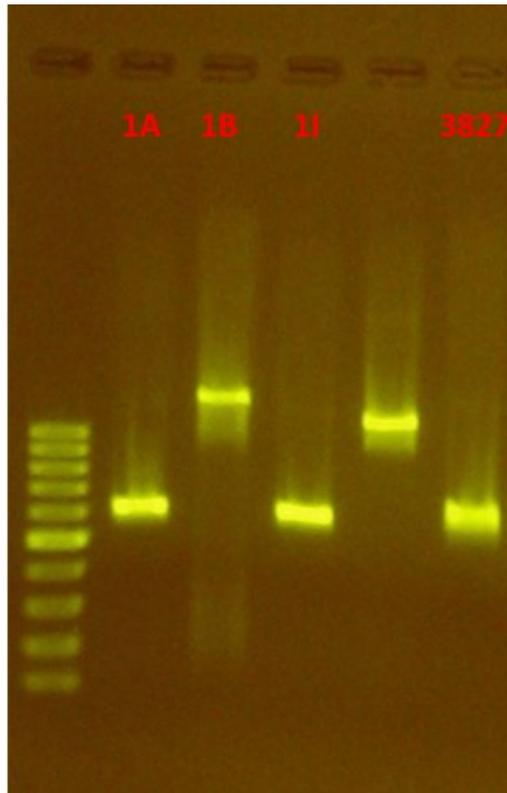


Figura 16: profilo elettroforetico della prima migrazione degli amplificati: 1A, 1B, 1I, *S. bombicola* 3827 d'inoculo. Nel primo pozzetto è ben evidente la presenza del marcatore Generuler.

4.2.2 Conte ed evoluzione microbica, prova di riduzione dell'etanolo

Le conte vitali su piastra sono state effettuate, (come per la precedente prova), ai vari tempi di fermentazione (dal giorno 0 al giorno 20 di fine fermentazione). Nella figura 17 viene riportato l'andamento nel tempo delle morfologie di lieviti rinvenuti nelle piastre WL, relative ai mosti di controllo A/B, valutando: *S. cerevisiae*, *non-Saccharomyces* e *S. bacillaris*. Nel grafico sottostante,

(figura 17), si evidenzia uno sviluppo tipico di crescita del lievito *S. cerevisiae*, con dominanza sulla popolazione dei *non-Saccharomyces* presente nel mosto di controllo. I *non-Saccharomyces*, dopo una fase di crescita molto accentuata nei primi 2 giorni di fermentazione, (con incremento $>$ di 1 Log UFC/mL), subiscono un calo progressivo a partire dal 6° giorno di fermentazione. Da registrare invece il dato molto interessante riguardo la popolazione di *Starmerella bacillaris*, facente parte del microbiota indigeno del mosto, che sembra persistere a concentrazioni leggermente inferiori a 10^7 UFC/mL per tutta la fase intermedia della fermentazione, per poi decrescere progressivamente fino a fine processo.

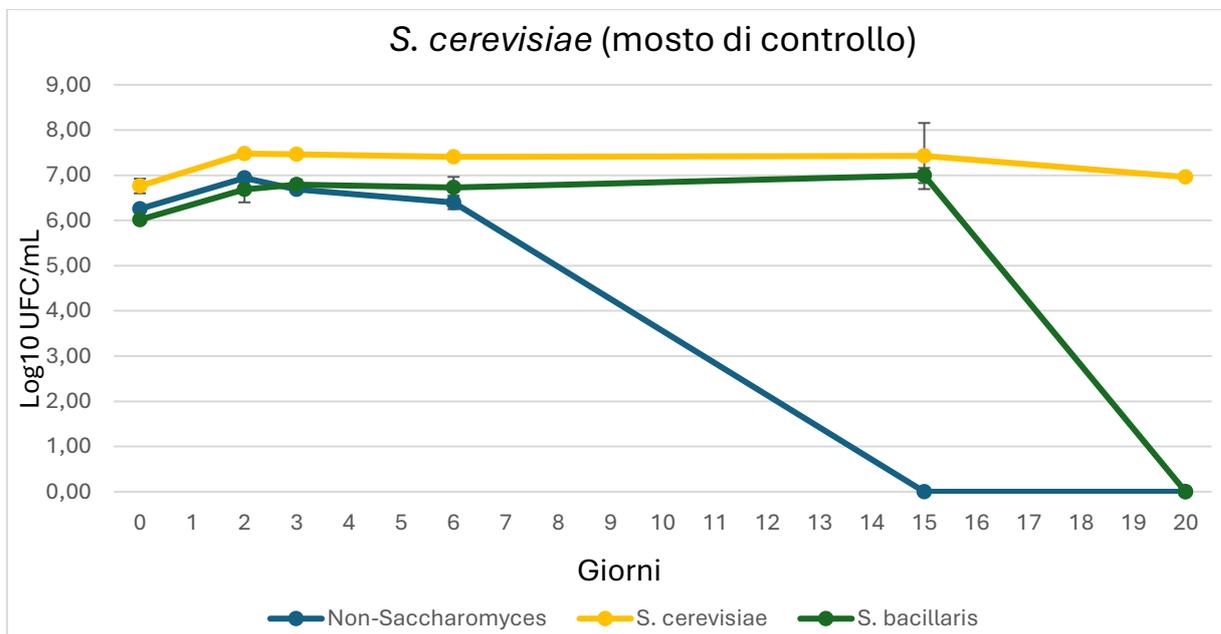


Figura 17: Evoluzione della popolazione microbica presente nel mosto di controllo, distinta in 3 categorie: *S. cerevisiae*, *non-Saccharomyces*, *S. bacillaris*.

Nella figura 18 viene riportata l'evoluzione della popolazione microbica presente nei mosti, provenienti da uve Montepulciano, con inoculazione del lievito starter *Starmerella bombicola* al T0 e aggiunta sequenziale del ceppo di *S. cerevisiae* EC1118 a 72h (T3) dall'avvio del processo. La figura 18 mette in evidenza uno sviluppo ridotto per quanto riguarda il lievito *S. cerevisiae*, inoculato dopo 3 giorni, che stenta a raggiungere valori elevati di concentrazione, (soprattutto nella prima fase di crescita), limitato dall'elevata presenza di lieviti *non-Saccharomyces* e di *Hanseniaspora uvarum* in particolare, raggiungendo, inoltre, una sorta di fase stazionaria (attestata sui 10^7 UFC/mL) nella fase finale del processo fermentativo. I lieviti *non-Saccharomyces*, dopo una fase molto rapida di crescita (di circa 1 ordine di Log_{10} UFC/mL) nei primi 2 giorni di fermentazione, subiscono un calo piuttosto netto di concentrazione nella fase intermedia e finale della fermentazione, pur manifestando un'inaspettata resistenza alle elevate concentrazioni di etanolo e alle ostili condizioni fermentative presenti nella fase finale del processo. Altro aspetto da evidenziare è la crescita sorprendente manifestata dalla *S. bombicola* 3827 d'inoculo, che dopo una rapida crescita iniziale (primi 3 giorni), sembra assestarsi su valori di 10^7 UFC/mL nella fase intermedia, per poi apparentemente subire una nuova proliferazione a termine

dell'iter fermentativo. La *S. bacillaris*, invece, contrariamente a quanto visto nel mosto di controllo, subisce un progressivo declino, per poi scomparire del tutto dal giorno 15 in poi.

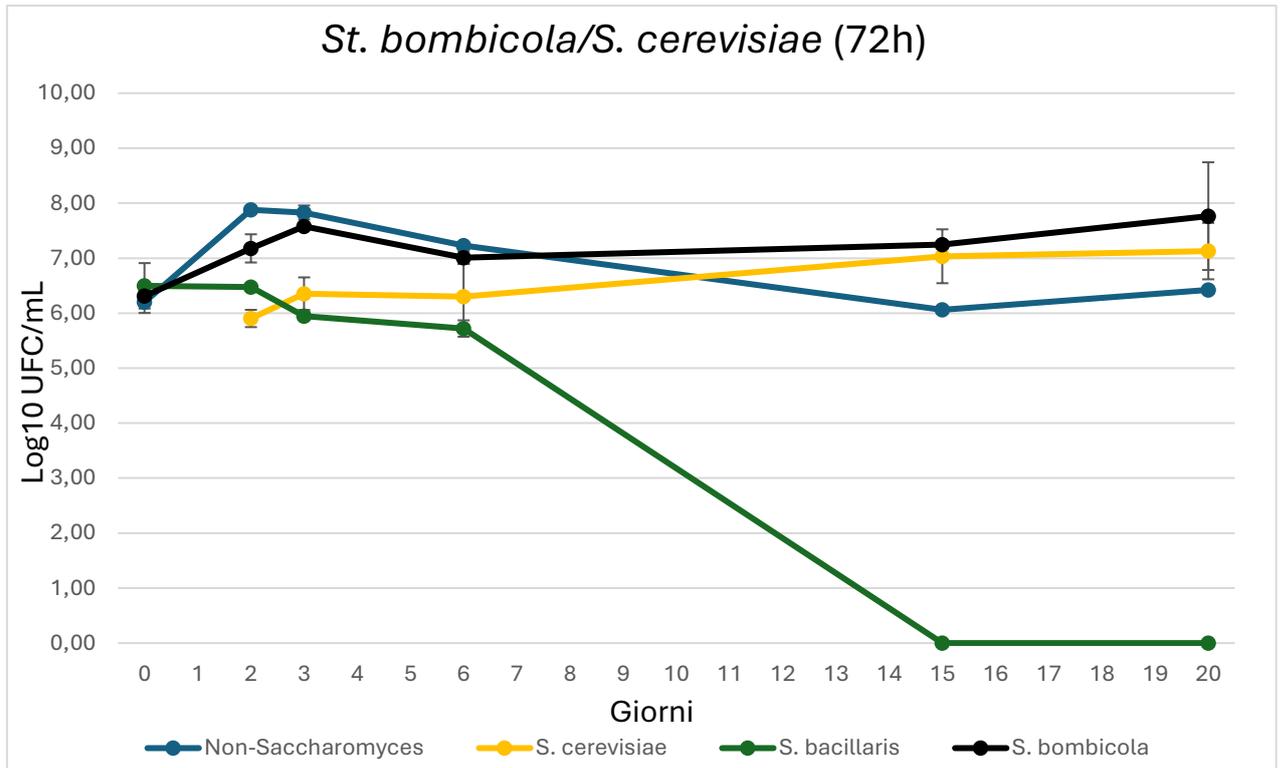


Figura 18: Evoluzione della popolazione microbica presente nel mosto proveniente da uve Montepulciano, con aggiunta dello starter *S. bombicola* 3827 al T0 e aggiunta sequenziale di *S. cerevisiae* I4 al T3, distinta in 4 categorie: *S. cerevisiae*, *non-Saccharomyces*, *S. bombicola* 3827 e *S. bacillaris*.

4.2.3 Analisi dati finali degli analiti

	pH	Zuccheri (g/L)	Acidità volatile (g/L acido acetico)	Acidità totale (g/L acido tartarico)	Alcool (%V/V)	Malico (g/L)	Lattico (g/L)	E.nett (g/L)	Glicerolo (g/L)
Controllo	3,43 ± 0,00 b	9,11 ± 0,08 b	0,33 ± 0,01 b	7,44 ± 0,00 a	14,72 ± 0,02 a	1,98 ± 0,02 a	0,00 ± 0,00	27,27 ± 0,06 b	8,98 ± 0,85 b
<i>S. bombicola</i>	3,57 ± 0,04 a	10,56 ± 1,24 a	0,55 ± 0,06 a	7,19 ± 0,40 a	13,74 ± 0,06 b	1,33 ± 0,37 a	0,00 ± 0,00	32,10 ± 0,16 a	13,60 ± 0,36 a

Tabella 5: nella tabella sono mostrati i principali caratteri analitici analizzati per le 2 Tesi in duplicato A/B: mosto controllo e mosto *S. bombicola*. I valori riportati si riferiscono allo 0 Babo (considerato nella prova come stadio finale) degli analiti monitorati, indicati come valore medio +/- dev.st. I dati sono stati inoltre sottoposti ad analisi di significatività statistica, tramite il Duncan's test (0.05%), utilizzando il software di analisi statistica: "Statistica 7".

Dai dati riportati nella tabella 5, che presenta i valori degli analiti registrati a 0° Babo, emerge un aumento significativo dell'acidità volatile nel mosto sottoposto a fermentazione mista sequenziale con *S. bombicola* 3827 e *S. cerevisiae* EC1118, rispetto al mosto di controllo inoculato solo con *S. cerevisiae* al tempo T0. Un altro dato rilevante è la riduzione del contenuto di etanolo di circa 1 grado alcolico nel vino prodotto dal mosto con *S. bombicola*, rispetto al controllo, che presenta una concentrazione di etanolo più elevata.

Questo risultato è particolarmente significativo poiché risponde con successo a uno degli obiettivi principali dell'esperimento con *S. bombicola*, ossia la produzione di vini a gradazione alcolica inferiore, tramite fermentazioni miste sequenziali di ceppi *non-Saccharomyces* con *S. cerevisiae*, una delle esigenze più richieste nel campo enologico odierno. Inoltre, il valore dell'estratto netto (g/L) è superiore nel mosto con *S. bombicola* rispetto al controllo, così come la produzione di glicerolo, che risulta essere di 4,6 g/L (50%) maggiore nel mosto con *S. bombicola* rispetto al controllo, un dato particolarmente significativo. Anche i livelli di zuccheri residui (g/L) sono superiori nel mosto con *S. bombicola* rispetto al controllo, sebbene questo dato debba essere ulteriormente confrontato con i tempi fermentativi finali, dove il valore degli zuccheri scende progressivamente al di sotto dei 2 g/L, indicando la conclusione del processo. Non si notano differenze statisticamente significative per le concentrazioni e i valori di: pH, acido malico e acidità totale. Infine, non si registra produzione di acido lattico in entrambe le tesi.

4.2.4 Analisi composti volatili e alcoli superiori prodotti

L'analisi dei principali composti volatili e degli alcoli superiori presenti nei vini finali è riportata nella Tabella 6.

	Controllo	<i>S. bombicola</i>
Esteri (mg/L)		
Etilbutirrato	1,277 ± 0,723 a	3,705 ± 0,938 a
Etilacetato	23,696 ± 4,457 b	95,207 ± 3,074 a
Feniletilacetato	0,067 ± 0,005 b	0,089 ± 0,004 a
Etilottanoato	0,003 ± 0,001 a	0,005 ± 0,001 a
Acetato di isoamile	0,563 ± 0,057 a	0,655 ± 0,049 a
Esilacetato	0,002 ± 0,000 a	0,004 ± 0,000 a
Dietilsuccinato	0,024 ± 0,006 a	0,066 ± 0,024 a
Composti carbonilici (mg/L)		
Acetaldeide	1,845 ± 0,665 a	20,585 ± 10,677 a
Terpeni (mg/L)		
Linalolo	0,027 ± 0,012 b	0,129 ± 0,014 a
Geraniolo	0,016 ± 0,001 a	0,019 ± 0,000 a
Nerolo	0,038 ± 0,000 a	0,018 ± 0,005 b
Norisoprenoidi (mg/L)		
β-damascenone	0,016 ± 0,005 a	0,027 ± 0,005 a
Alcoli (mg/L)		
Esanolo	0,018 ± 0,001 a	0,016 ± 0,002 a
2-feniletanolo	96,17 ± 11,15 a	113,66 ± 6,84 a
Alcoli superiori (mg/L)		
Propanolo	18,700 ± 1,804 a	17,258 ± 1,358 a
Isobutanolo	16,412 ± 0,953 b	45,927 ± 4,793 a
Amilico attivo	71,081 ± 0,576 a	43,998 ± 4,201 b
Isoamilico	158,968 ± 1,044 a	140,994 ± 11,476 a

Tabella 6: Nella tabella sono riportati i valori di concentrazione dei principali composti volatili e degli alcoli superiori, rilevati tramite analisi GC e suddivisi nelle rispettive categorie. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Le lettere differenti all'interno di ogni riga indicano differenze statisticamente significative, elaborate con il test di Duncan (0.05%).

Osservando i dati relativi alla classe degli esteri prodotti, presenti in tabella, non si notano differenze di concentrazioni particolarmente rilevanti tra le 2

Tesi, eccezion fatta per l'etilacetato e il feniletacetato che sono prodotti in concentrazioni maggiori nel mosto sottoposto a fermentazione sequenziale *S. bombicola/S. cerevisiae*, rispetto al mosto di controllo. Anche qui, così come nella prima prova, non si notano particolari differenze nei livelli di acetaldeide e β -damascenone per le 2 Tesi. In merito alla produzione di terpeni: tanto il linalolo, quanto il geraniolo risultano essere prodotti in maggiori quantità nel mosto con inoculo di *S. bombicola* rispetto al mosto di controllo; al contrario, la concentrazione del nerolo è maggiore nel mosto di controllo. Per quel che concerne la produzione di alcoli: esanolo e 2-feniletanolo, non si registrano differenze significative, seppur i livelli di 2-feniletanolo sembrerebbero essere superiori nel mosto *S. bombicola*. Passando, infine, alla valutazione dei principali alcoli superiori rilevati: non si notano differenze significative nei livelli di propanolo e isoamilico tra le 2 Tesi. La fermentazione mista sequenziale *S. bombicola/S. cerevisiae* su mosto di uve Montepulciano favorisce la produzione di livelli maggiori di isobutanolo, al contrario dell'amilico attivo, che viene prodotto a concentrazioni più elevate nel mosto di controllo.

CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Per quanto riguarda la prova *M. pulcherrima* condotta in mosto Rosato, i dati riportano la presenza di una popolazione piuttosto cospicua, (soprattutto nelle fasi iniziali del processo), di lieviti *non-Saccharomyces*, costituita prevalentemente da apiculati, (appartenenti al genere *Hanseniaspora* spp.), che, con il procedere della fermentazione, tendono gradualmente a scomparire, per l'azione del *S. cerevisiae* inoculato. Tale dato, rilevato per tutte e 3 le Tesi, è supportato da numerosissimi lavori e libri presenti in letteratura (Ribéreau-Gayon, Trattato di enologia)² che mettono in luce il maggior vigore fermentativo e capacità di resistenza all'alcol da parte della specie *S. cerevisiae*, rispetto alla frazione di apiculati e dei *non-Saccharomyces* in generale, compresa la specie *M. pulcherrima*, che in fermentazione mista con *S. cerevisiae*, dopo i primi 3 giorni, tende progressivamente a scomparire, seguendo il profilo degli altri *non-Saccharomyces*. Anche quest'ultimo risultato è in linea con studi precedenti, presenti in letteratura. Ciani et al (2011)¹⁸, infatti, avevano già confermato l'assenza d'influenza di *M. pulcherrima* sulla velocità di crescita e fermentazione del ceppo di *S. cerevisiae*. I risultati

riportati inoltre in Figure 15 A e 15 B confermano e dimostrano l'azione di biocontrollo del lievito d'inoculo *M. pulcherrima* sulla popolazione di lieviti indigeni, nella fase di chiarifica del mosto condotta a 24h a 10°C, rispetto ai controlli. Questo risultato va ancora una volta a supportare gli esiti ottenuti dal lavoro di Agarbati et al.(2023)⁵⁵. Per quanto riguarda la valutazione dei principali analiti non si registrano differenze significative nei valori riportati per le 3 Tesi, eccezion fatta però, per la riduzione di etanolo che risulta significativa rispetto alle altre due tesi di controllo nella tesi con inoculo sequenziale di *M. pulcherrima/S. cerevisiae*. La produzione dei principali composti volatili e alcoli superiori, evidenziano una minore produzione di isobutanolo e una maggiore produzione di isoamilico nei mosti provenienti da parcelle inerbite e inerbite con aggiunta di *M. pulcherrima*. Questo risultato potrebbe indicare una variazione nella produzione di alcoli superiori nei mosti provenienti da parcelle inerbite, probabilmente dovuta alla concentrazione e composizione di APA iniziale, che nella prova risulta essere maggiore per il mosto inerbimento rispetto al controllo. I composti terpenici sono i principali responsabili dell'aroma floreale del vino. La fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/ S. cerevisiae* ha prodotto inoltre la maggior parte dei terpeni, tra i quali: linalolo, nerolo e geraniolo. I risultati hanno confermato da questo punto

di vista i dati già presenti in letteratura, sottolineando quindi il ruolo positivo dell'utilizzo dei lieviti *non-Saccharomyces* per la produzione di vini con aromi desiderabili, Ciani et al. (2020)²⁶. Questi risultati sono rilevanti poiché, oltre ad un'azione di biocontrollo, *M. pulcherrima* contribuisce, in maniera significativa, anche all'incremento e complessità della porzione aromatica del vino.

Per quanto concerne, invece, la seconda prova, la valutazione degli andamenti della popolazione microbica della prova con inoculo di *S. bombicola* su Montepulciano non evidenziano dati particolarmente rilevanti. Da sottolineare l'andamento di *S. bacillaris*, (individuata e quantificata con l'aiuto dell'analisi molecolare), che conferma una rilevante capacità di persistenza, in fermentazione con il *S. cerevisiae* d'inoculo, come già rilevato (ROMANO, P. MICROBIOLOGIA DELLA VITE E DEL VINO)¹¹. L'andamento della popolazione microbica della fermentazione mista sequenziale *S. bombicola/S. cerevisiae*, è determinato dall'inoculo del ceppo *S. bombicola* 3827, che mostra una crescita molto accentuata, favorita anche dalle condizioni di areazione, (flusso di 20 mL/L/min per 3 giorni). Questi risultati ottenuti in scala pilota sono in linea con i risultati riportati da Canonico et al. (2021)⁵³. Il ceppo

di *S. cerevisiae*, (inoculato dopo 72h), mostra inoltre uno sviluppo ridotto, limitato in parte dalla crescita a concentrazioni piuttosto elevate ($> 10^6$ UFC/mL) della popolazione di *non-Saccharomyces* e di *Hanseniaspora uvarum* in particolare. Per quanto riguarda la prova con inoculo sequenziale di *S. bombicola* e in presenza di microareazione ha evidenziato un rilevante incremento di glicerolo (50%), rispetto al mosto di controllo, il che può contribuire, come messo in risalto dai lavori di Ciani et al.(2020)²⁶ e Canonico et al.(2021)⁵³, a migliorare le caratteristiche organolettiche del prodotto finale. Il dato più significativo riguarda però la capacità di *S. bombicola* di ridurre in fermentazione sequenziale con *S. cerevisiae* di circa 1 grado il contenuto di etanolo, rispetto al mosto di controllo. Questo risultato ha confermato in fermentazioni pilota in cantina quello ottenuto in laboratorio in un precedente risultato (Canonico et al., 2021)⁵³. In questo lavoro, condotto in laboratorio la coltura con flusso d'aria di *S. bombicola/S. cerevisiae* mostra una riduzione di etanolo dell'1,46% (v/v) rispetto alla coltura pura di *S. cerevisiae*. L'aumento del valore di estratto netto (g/L) nel mosto *S. bombicola* è da attribuire alla sua maggiore produzione di composti secondari, quali glicerolo e acido succinico, mentre l'incremento di acidità volatile sempre nel mosto *S. bombicola*, potrebbe essere provocata da una maggiore presenza di apiculati e altri *non-*

Saccharomyces, oltre che al flusso d'aria fornito durante la prima fase della fermentazione (72h). Per quanto riguarda la prova con *S. bombicola*, la fermentazione mista *S. bombicola/S. cerevisiae* ha portato a una maggiore produzione di esteri, in particolare etilbutirrato, etilacetato e feniletacetato, che contribuiscono alla produzione di un vino distinto da aromi fruttati, floreali e dolci. Tale risultato è in concordanza con quello di Canonico et al. (2021)⁵³, che hanno evidenziato un incremento significativo di esteri (soprattutto etilbutirrato) e alcoli superiori durante la fermentazione mista *S. bombicola/S. cerevisiae* sempre in condizioni di areazione. Tuttavia, non è possibile determinare l'effetto generale dell'ossigeno sul profilo volatile del vino. Anche i livelli di linalolo e geraniolo sembrano aumentare nella fermentazione mista rispetto al controllo. Per quanto riguarda la produzione di alcoli superiori, tutti i composti tranne l'isobutanolo hanno mostrato un aumento significativo nel mosto di controllo rispetto alla fermentazione mista sequenziale *S. bombicola/S. cerevisiae*.

In conclusione, le potenzialità dei lieviti *non-Saccharomyces* in vinificazione si sono rivelate estremamente valide. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che l'impiego di questi lieviti, in fermentazioni miste con *Saccharomyces cerevisiae*, può arricchire il profilo aromatico del vino,

migliorare la complessità sensoriale e influenzare positivamente diverse caratteristiche chiave. In particolare, si è osservato un incremento nella produzione di esteri, alcoli superiori e/o composti volatili, nonché una riduzione del contenuto di etanolo e un aumento della produzione di glicerolo, contribuendo così ad una maggiore qualità del prodotto finale. Questo studio sottolinea quindi l'importanza e la necessità di esplorare e integrare l'uso dei lieviti *non-Saccharomyces* per innovare e perfezionare le tecniche di vinificazione, aprendo nuove possibilità per ottenere vini unici e di elevata qualità.

CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA

1. Cozzolino, E. *Viticultura ed enologia biologica: mercato, tecniche di gestione, difesa, vinificazione e costi*. (Edagricole, Bologna, 2004).
2. Ribéreau-Gayon, P. *Trattato di enologia. 1, Microbiologia del vino, vinificazioni*. (Edagricole, Milano, 2017).
3. Gerbi, V., Caudana, A., Rolle, L., Cagnasso, E. & Zeppa, G. LA VINIFICAZIONE DEL 'NEBBIOLO'.
4. Grisafi, G. Pratiche di cantina per una vinificazione di qualità.
5. Bautista-Ortín, A. B. *et al.* Application of high-power ultrasounds during red wine vinification. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 1314–1323 (2017).
6. Guzzon, R. Strumenti per una corretta gestione della fermentazione malolattica.
7. Inerbimento Vigneto - Guida per il viticoltore - libro definitivo 19.05.04 - Angelo Costacurta *et al.*
8. Bertamini M., Sicher L., Mescalchin E., 1999. Ruolo dell'inerbimento controllato sull'attività della vite e la complessità dell'ecosistema vigneto: esperienze in Trentino. Atti dei Convegni XXIV MOMEVI sulla gestione del suolo in viticoltura. Notiziario tecnico n°58: 21-23.
9. Bisson L.F., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. Proc. Int. Symp. on Nitrogen in grapes and wines. Rantz J. M. Ed, The American Society for Enology and Viticulture.
10. I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.: la tipicità attraverso le biotecnologie - a cura di Giancarlo Moschetti e Nicola Francesca - ISBN: 978-88-95230-20-7.
11. ROMANO, P. *MICROBIOLOGIA DELLA VITE E DEL VINO*. (CEA - CASA EDITRICE, S.I., 2022).
12. Fleet, G. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 11–22 (2003).
13. Pinto, C. *et al.* Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
14. Fleet, G. H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **8**, 979–995 (2008).
15. UNA NUOVA FRONTIERA PER L'ENOLOGIA: L'UTILIZZO DEI LIEVITI NON-SACCHAROMYCES IN FERMENTAZIONE.
16. Francesca, N. *et al.* The Wine: Typicality or Mere Diversity? The Effect of Spontaneous Fermentations and Biotic Factors on the Characteristics of Wine. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **8**, 769–773 (2016).

17. Navarrete-Bolaños, J. L. Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Eng. Life Sci.* **12**, 410–418 (2012).
18. Comitini, F. *et al.* Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873–882 (2011).
19. Rainieri, S. & Pretorius, I. S. Selection and improvement of wine yeasts.
20. Iorizzo, M. ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E PRIMA CARATTERIZZAZIONE DI LIEVITI DI INTERESSE ENOLOGICO. (2004).
21. Capece, A. *et al.* Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 187–192 (2010).
22. Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J. & Briones, A. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 2703–2710 (2011).
23. Pretorius, I. S., Van Der Westhuizen, T. J. & Augustyn, O. P. H. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* **20**, (2017).
24. Romano, P., Capece, A., Serafino, V., Romaniello, R. & Poeta, C. Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1797–1802 (2008).
25. Ciani, M. & Maccarelli, F. [No title found]. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 199–203 (1998).
26. Ciani, M., Canonico, L., Oro, L. & Comitini, F. Footprint of Nonconventional Yeasts and Their Contribution in Alcoholic Fermentations. in *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* 435–465 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-816678-9.00014-X.
27. 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.* **10**, 123–133 (2010).
28. Magyar, I. & Panyik, I. Biological Deacidification of Wine with *Schizosaccharomyces pombe* Entrapped in Ca-Alginate Gel. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 233–240 (1989).
29. Mora, J., Barbas, J. I. & Mulet, A. Growth of Yeast Species During the Fermentation of Musts Inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**, 156–159 (1990).
30. Ciani & Ferraro. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 247–254 (1998).

31. Tristezza, M. *et al.* The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
32. Moreira, N., Guedes De Pinho, P., Santos, C. & Vasconcelos, I. Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. *Food Chem.* **123**, 1198–1203 (2010).
33. Garavaglia, J. *et al.* Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. *Microbiol. Res.* **173**, 59–65 (2015).
34. Lencioni, L. *et al.* Controlled mixed fermentation at winery scale using *Zygorulaspora florentina* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **234**, 36–44 (2016).
35. Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F. & Benito, S. Combine Use of Selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. *Molecules* **20**, 9510–9523 (2015).
36. Magyar, I. & Tóth, T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 94–100 (2011).
37. Gobbi, M. *et al.* *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* **33**, 271–281 (2013).
38. Contreras, A. *et al.* Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1670–1678 (2014).
39. Canonico, L., Agarbati, A., Galli, E., Comitini, F. & Ciani, M. *Metschnikowia pulcherrima* as biocontrol agent and wine aroma enhancer in combination with a native *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* **181**, 114758 (2023).
40. Comitini, F. & Ciani, M. The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking: *Tetrapisispora phaffii* killer toxin in winemaking. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 50–56 (2010).
41. Ciani, M. & Fatichenti, F. Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Biopreservative Agent To Control Apiculate Wine Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3058–3063 (2001).
42. Mehlomakulu, N. N., Prior, K. J., Setati, M. E. & Divol, B. *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 747–758 (2017).

43. Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E. & Marquina, D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* **155**, 624–634 (2009).
44. Fernández, M., Úbeda, J. F. & Briones, A. I. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 29–36 (2000).
45. Morata, A. *et al.* Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation* **5**, 63 (2019).
46. Borren, E. & Tian, B. The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods* **10**, 13 (2020).
47. Vicente, J. *et al.* The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms* **8**, 1038 (2020).
48. Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L. & Cocolin, L. *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* **17**, 30–35 (2017).
49. Sadoudi, M. *et al.* Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol.* **32**, 243–253 (2012).
50. Englezos, V. *et al.* Exploitation of the non-Saccharomyces yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* **199**, 33–40 (2015).
51. Lemos, W. J. *et al.* Biocontrol Ability and Action Mechanism of *Starmerella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) Isolated from Wine Musts against Gray Mold Disease Agent *Botrytis cinerea* on Grape and Their Effects on Alcoholic Fermentation. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
52. De Graeve, M., De Maeseneire, S. L., Roelants, S. L. K. W. & Soetaert, W. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. *FEMS Yeast Res.* **18**, (2018).
53. Canonico, L., Galli, E., Agarbati, A., Comitini, F. & Ciani, M. *Starmerella bombicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Sequential Fermentation in Aeration Condition: Evaluation of Ethanol Reduction and Analytical Profile. *Foods* **10**, 1047 (2021).
54. França, L. T. C., Carrilho, E. & Kist, T. B. L. A review of DNA sequencing techniques. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 169–200 (2002).
55. Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M. & Comitini, F. *Metschnikowia pulcherrima* in Cold Clarification: Biocontrol Activity and Aroma Enhancement in Verdicchio Wine. *Fermentation* **9**, 302 (2023).

RINGRAZIAMENTI:

Un ringraziamento speciale va al Professor Maurizio Ciani, la cui eccezionale professionalità e vastissima conoscenza, unite a gentilezza e disponibilità, mi hanno permesso di scoprire e apprezzare ancor di più il meraviglioso e affascinante mondo delle biotecnologie applicate ai microrganismi. Desidero inoltre esprimere la mia profonda gratitudine a Silvia Gattucci, Laura Canonico, Laura Moretti e Alice Agarbati, che mi hanno sempre fornito aiuto e supporto costante nell'elaborazione della mia tesi, rispondendo con costanza e pazienza alle mie domande e ai miei dubbi. Il clima di collaborazione e rispetto reciproco creatosi in questi mesi ha reso il lavoro molto più leggero e stimolante. Ringrazio di cuore tutta la mia famiglia: i miei genitori, mia sorella e i miei nonni, che mi hanno sempre sostenuto e incoraggiato, anche nei momenti più difficili e bui durante questo percorso universitario. Un grazie speciale va anche ai miei amici, compagni di squadra e colleghi di corso, con cui ho condiviso momenti di studio e serietà, alternati a momenti di gioia, vittorie, festeggiamenti e risate, anche al di fuori dell'ambito accademico. Siete stati per me un porto sicuro dove trovare riparo e aiuto, anche nei momenti più difficili. Un ringraziamento speciale va alla mia ragazza Irene. I tuoi consigli e il tuo sostegno costante e incondizionato mi hanno permesso di superare ostacoli che mi sembravano insormontabili. La distanza che ci ha separato

durante questo periodo accademico ha rafforzato ulteriormente il nostro legame, dandomi energia e forza per affrontare lo studio e il lavoro quotidiano con maggiore determinazione e fiducia in me stesso.