

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	3
1.1 La fermentazione	3
1.1.1 La fermentazione spontanea e i lieviti indigeni	5
1.1.2 La fermentazione inoculata e i lieviti selezionati	7
1.2 Lieviti in ambito vinario.....	9
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.2.2 Lieviti non- <i>Saccharomyces</i>	13
1.3 Fermentazioni miste.....	17
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI.....	27
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....	29
3.1 Ceppi di lievito.....	29
3.2 Identificazione e caratterizzazione degli isolati di <i>S. cerevisiae</i>	29
3.3 Saggio del potere fermentativo	30
3.4 Prove di microfermentazione.....	30
3.5 Procedure analitiche	31
3.5.1 Determinazione del glicerolo	31
3.5.2 Determinazione dell'ammonio.....	33
3.5.3 Determinazione dell'etanolo.....	34
3.5.4 Determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili.....	35
3.5.5 Analisi acidità totale	36
3.5.7 Estrazione ed analisi dei composti volatili	39
3.6 Analisi statistica.....	41
CAPITO 4: RISULTATI	43
4.1 Biotipizzazione delle culture selezionate	43
4.2 Valutazione del potere fermentativo e della velocità di fermentazione	43
4.3 Prove di micro-fermentazioni eseguite a 16°C e a 22°C	44
4.4 Principali caratteristiche analitiche.....	45
4.5 Principali composti volatili	46
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....	48

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 La fermentazione

La fermentazione è il metodo più antico per conservare gli alimenti ed è strettamente correlato a complesse comunità microbiche multispecie. Nel corso di migliaia di anni, per ottenere i prodotti specifici desiderati, l'uomo ha ottimizzato inconsapevolmente questo processo tecnologico con scarsa attenzione, però, all'aspetto microbico. In effetti, per molto tempo si è pensato che il processo tecnologico fosse l'aspetto principale che definisce principalmente le caratteristiche organolettiche del prodotto finale (Khan et al., 2013) ma negli ultimi anni, è stato dato maggiore risalto alla componente microbica, intesa come responsabile della specificità del prodotto finale (Bourdichon et al., 2012). Ora i ricercatori sono concordi sul fatto che l'insieme delle interazioni microbiche e le caratteristiche della singola specie sono fondamentali per il controllo, la sicurezza, il sapore, la consistenza e l'aroma degli alimenti e delle bevande fermentati.

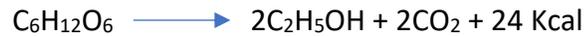
Tra le bevande fermentate, il vino è il risultato di complesse interazioni biochimiche, che a livello microbiologico si svolgono tra lieviti, batteri e funghi che hanno origine nei vigneti e che continua con il processo della fermentazione alcolica in cantina. Infatti, dopo la pigiatura, una volta ottenuto il mosto ed effettuate le eventuali correzioni, inizia la fermentazione alcolica, che porterà ad ottenere il vino propriamente detto.

Il ruolo della fermentazione alcolica è primariamente quello di trasformare lo zucchero in alcol e anidride carbonica, ma anche quello di dare vita a tutta una serie di sottoprodotti della fermentazione che andranno a comporre quelli che vengono definiti gli aromi secondari (o, appunto, fermentativi) che compongono la base olfattiva di ogni vino.

Il processo è fatto per intero in condizioni anaerobiche, ossia senza ossigeno: nelle fasi iniziali della fermentazione del mosto, i lieviti compiono una respirazione aerobica, cioè usano l'ossigeno presente nel mosto, trasformando quindi lo zucchero in acqua e anidride carbonica. Quando nel mosto non c'è più ossigeno, inizia la vera e propria fermentazione

alcolica durante la quale il lievito produce energia mediante l'ossidazione dello zucchero, trasformandolo in alcol etilico, anidride carbonica e altri prodotti secondari.

L'equazione generale della fermentazione alcolica è quella indicata all'inizio del XIX secolo da Gay-Lussac:



La prima parte di questo processo, comprendente l'insieme delle reazioni che portano dagli zuccheri a 6 atomi di carbonio (glucosio e fruttosio) sino ad acido piruvico, viene definita glicolisi, ed è comune sia alla via aerobica (respirazione) che alla via anaerobica (fermentazione). La fase finale, che comprende la trasformazione dell'acido piruvico in etanolo, è invece unicamente anaerobica e tipica dei lieviti. Il chetoacido piruvico subisce una decarbossilazione con formazione di aldeide acetica la quale è ridotta ad alcol etilico (Usseggio-Tomasset, 2000).

La comprensione di un processo così complesso come quello della fermentazione, nonché dei microrganismi in gioco, è stato di fondamentale importanza per intervenire su un processo apparentemente spontaneo e assicurare sempre di più la produzione di vini di qualità. Conoscere intimamente questi meccanismi è una condizione indispensabile per ottenere vini di qualità.

I lieviti sono i protagonisti della fermentazione alcolica. Sono loro infatti ad utilizzare gli zuccheri e gli altri costituenti del mosto dell'uva contribuendo modo significativo alla composizione chimica e alle caratteristiche sensoriali del vino. La quantità di substrato utilizzato e di prodotto generato, dipendono dalla specie di lievito presente e dal suo livello di crescita (Giudici et al. 1990). Due sono i tipi di fermentazione attualmente in uso per la produzione di vino: la fermentazione naturale o "spontanea", e quella inoculata.

1.1.1 La fermentazione spontanea e i lieviti indigeni

La fermentazione spontanea del vino è un processo complesso che può essere effettuato senza l'aggiunta di lieviti selezionati nel mosto in quanto, il mosto stesso è un ricco substrato di nutrienti, non sterile che permette la crescita e la fermentazione di vari lieviti. Il lievito principalmente coinvolto in questo processo di trasformazione appartenente al genere *Saccharomyces*; tuttavia, anche altri lieviti possono essere isolati durante il processo, e possono influenzare la composizione analitica e aromatica del vino (Andorrà et al., 2010; Wang et al., 2015). In effetti, una serie di analisi microbiologiche sulla flora del lievito associata alla fermentazione naturale del succo d'uva ha rivelato che, nella maggior parte delle aree enologiche, ha luogo una fermentazione sequenziale: inizialmente i lieviti che sono più abbondanti sono quelli "apiculati" (*Hanseniaspora / Kloeckera*); essi hanno una tolleranza all'alcol estremamente bassa e tendono a produrre più acidità volatile, dando luogo a profumi non sempre desiderati. Gli apiculati sono così chiamati perché la loro moltiplicazione avviene sempre per formazione di gemme alle estremità delle cellule.

Gli anelli cicatriziali, che rimangono dopo il distacco delle gemme, provocano l'appuntimento ed il progressivo allungamento degli apici delle cellule le quali assumono la caratteristica forma detta appunto "apiculata".

Dopo circa 3-4 giorni, raggiunti i 4% di alcol circa, questi lieviti sono sostituiti da *S. cerevisiae* che, al contrario, hanno un buon potere alcoligeno e portano a termine il processo fermentativo fino ad esaurimento degli zuccheri (Martini, 1993; Pretorius, 2000). Anche se durante le varie fasi della fermentazione è possibile isolare altri generi di lievito, come *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* e *Metschnikowia* (Hear and Fleet, 1985; Pardo et al., 1989), gli apiculati prima e *S. cerevisiae* poi sono i principali sostenitori della fermentazione.

Quindi questo tipo di vinificazione, definita spontanea o naturale, non prevede l'impiego di lieviti selezionati (starter commerciali) e quelli che portano a termine la fermentazione alcolica sono il prodotto di una selezione naturale dei così detti "lieviti indigeni".

Infatti, l'aroma che contraddistingue un vino deriva dalla varietà di uva usata e dalla trasformazione, comprendente la fermentazione alcolica, quello malo-lattica e l'invecchiamento. L'uva apporta tracce di molti componenti volatili (soprattutto terpeni) derivanti dalla natura botanica della materia prima, i quali danno al vino il suo carattere varietale. Inoltre, sempre l'uva, apporta acidi non volatili (tartarico e malico, che influenzano le proprietà sensoriali) e tannini, fenoli, flavonoidi (che conferiscono amaro e astringenza).

Le fermentazioni spontanee sono diventate molto competitive in quanto danno un carattere unico al vino ma, purtroppo, sono anche molto delicate in quanto è influenzata da diversi fattori:

- 1) la temperatura non deve superare i 37 °C per non bloccare l'azione dei lieviti;
- 2) la concentrazione troppo elevata del mosto può rendere difficile l'inizio della fermentazione;
- 3) la quantità di alcol etilico prodotto può ridurre o bloccare l'attività dei lieviti;
- 4) l'acidità eccessiva del mosto può limitare l'attività dei lieviti, ma se è troppo bassa può permettere l'azione negativa dei batteri lattici;
- 5) lo sviluppo e l'attività dei lieviti dipendono dalla presenza di fattori di crescita dati da carbonio sotto forma soprattutto di zuccheri, mentre la richiesta di azoto viene soddisfatta soprattutto dai sali di ammonio;
- 6) l'aerazione iniziale del mosto può essere utile perché i lieviti necessitano di una certa quantità di ossigeno per svilupparsi;
- 7) la presenza di sostanze anticrittogamiche e di anidride solforosa in eccesso può inibire la fermentazione (Ribereau et al., 1998).

1.1.2 La fermentazione inoculata e i lieviti selezionati

Una fermentazione viene definita inoculata, quando si utilizzano lieviti commerciali per iniziare e portare a termine la fermentazione alcolica. Tale fermentazione si può anche definire “guidata” in quanto possiamo controllarla, rendendola rapida e affidabile, come richiede l’industria vinaria su larga scala ed essere sicuri riguardo la qualità del prodotto finale.

La prima manipolazione che viene effettuata è l’aggiunta di anidride solforosa che ha un’azione antisettica, in special modo a discapito dei lieviti apiculati presenti all’inizio della fermentazione. In questo modo, si evita la produzione da parte di questi lieviti di odori sgradevoli nel vino dati dalla fermentazione acetica.

Da qui possiamo aggiungere dai 15 ai 20 miliardi di cellule vive dei lieviti selezionati, generalmente del genere *Saccharomyces*, dalle proprietà fisiologiche, biochimiche, enologiche ottimizzate in rapporto alle esigenze tecnologiche dei processi di fermentazione in purezza. Le fermentazioni inoculate con colture starter offrono i vantaggi di un processo più rapido e prevedibile, portando alla produzione di vini con una maggiore costanza qualitativa. L’interesse per questa tecnica da parte dell’industria del vino è aumentato per via dalla disponibilità commerciale di preparati secchi di ceppi di lievito selezionati, che possono essere reidratati ed inoculati nel mosto in modo semplice (Degre, 1993; Manzano et al., 2006).

Come possiamo ben immaginare, nelle cantine in cui vi è una produzione su larga scala, è normalmente preferito l’utilizzo di lieviti commerciali (Pretorius, 2000); sono poche infatti le cantine che si assumono il potenziale rischio di una fermentazione spontanea per ottenere un prodotto di cui è difficile predire l’esito finale.

Questa tipologia di lieviti, quindi, ha rivoluzionato il mondo enologico infatti il loro uso:

- ✓ assicura un pronto avvio della fermentazione perché la qualità e la quantità di lievito aggiunto in pre-fermentazione è accuratamente scelta;

- ✓ permette, un maggior controllo del processo fermentativo da parte dell'operatore che sceglie come condurre la fermentazione, senza che questa sia in balia dei lieviti naturali risiedenti nell'uva;
- ✓ riduce i problemi di arresto o rallentamento del processo che sono tipici delle fermentazioni spontanee;
- ✓ velocizza il processo fermentativo in modo ponderato;
- ✓ realizza validi rendimenti di trasformazione degli zuccheri in alcol, riducendo la possibilità che altri microrganismi si insedino nel vino danneggiandolo (per esempio batteri acetici);
- ✓ riduce o elimina caratteristiche organolettiche anomale;
- ✓ contribuisce alla standardizzazione di produzione di un determinato vino permettendogli di essere riconoscibile dal consumatore anno dopo anno;
- ✓ in genere riduce il problema dell'acidità volatile del vino, sia per l'eliminazione dell'intervento iniziale dei lieviti apiculati, sia per la scelta di ceppi selezionati in rapporto alla capacità di formare pochi prodotti secondari;
- ✓ maggiore stabilità del vino all'ossidazione, migliore chiarificazione e controllo dell'acidità fissa.

I primi lieviti sono stati selezionati con lo scopo di esaltare le caratteristiche tecnologiche (vigore fermentativo, alcol-tolleranza), in modo da ottenere prodotti senza difetti (Perez-Coello et al., 1999). Oggi, i lieviti di ultima generazione vengono selezionati sulla base di caratteristiche che possano migliorare la qualità dei vini attraverso l'espressione di precursori già presenti nei mosti e la produzione di metaboliti secondari (alcoli superiori, esteri, chetoni, aldeidi).

L'uso costante dei lieviti selezionati può presentare anche degli svantaggi, primo fra tutti la standardizzazione dell'agente microbico, in quanto i lieviti realmente utilizzati in tutto sono essenzialmente gli stessi. Questo potrebbe portare ad una riduzione della

biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina. La prospettiva peggiore però sembra la perdita di biodiversità in vigneto, infatti dopo la vendemmia in vigneto si ritrova circa il 73% dei lieviti commerciali che ci sono in cantina, questi vengono per il 94% disseminati dalle macchine per la raccolta dell'uva in un raggio che va da 10 a 200m dalla cantina (Valero et al., 2005).

Inoltre, gli starter reperibili in commercio, pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, proprio perché provengono da realtà vitivinicole estranee, non sono sempre capaci di sviluppare completamente i sapori e gli aromi tipici di un vino (Pretorius, 2000).

Per ovviare a questi problemi, sia i microbiologi che i vinificatori, ritengono sia opportuno introdurre l'uso di starter eco-tipici selezionati seguendo le caratteristiche di tipicità del prodotto locale.

1.2 Lieviti in ambito vinario

I lieviti sono funghi unicellulari le cui dimensioni si aggirano sui 5-30 μm di lunghezza e 1-5 μm di larghezza. Secondo l'attuale tassonomia i lieviti si collocano nel Regno dei Funghi all'interno del phylum *Mycota* e in base alla modalità di riproduzione sessuale si suddividono all'interno delle classi degli Ascomiceti e dei Basidiomiceti. In generale sono pochi i lieviti riscontrati sugli acini immaturi, 10^1 - 10^3 UFC/g, ma con la maturazione e fino alla vendemmia, quando gli zuccheri diffondono sulla superficie, la popolazione raggiunge le 10^4 - 10^6 UFC/g. Sui grappoli immaturi predominano i generi *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium* che sono presenti in generale nell'ambiente vigneto (suolo, foglie, corteccia). Nei grappoli maturi troviamo soprattutto lieviti apiculati a metabolismo ossidativo quali *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Il principale agente della fermentazione, *S. cerevisiae*, non è presente oppure viene rilevato a

bassissime concentrazioni sul grappolo ma cresce proporzionalmente alla concentrazione di etanolo prodotto (Fleet et al., 1984; Heard e Fleet, 1985; Querol et al., 1994). I lieviti possono essere suddivisi in sette tipi a seconda della forma, ma, per quanto attiene l'enologia, risultano interessanti solo tre categorie:

- a) ellittici, aventi forma di ellisse; per esempio *S. cerevisiae*;
- b) apiculati, aventi forma di limone; per esempio *Kloeckera apiculata*;
- c) cocchi, aventi forma tondeggianti; per esempio *Torulopsis stellata* (Sicheri, 1986).

Il mosto d'uva è un mezzo nutritivo che contiene in forma utilizzabile tutti gli elementi necessari allo sviluppo di molte specie di lieviti che quindi in esso hanno la possibilità di moltiplicarsi, infatti contiene:

- ✓ carbonio, che è utilizzato preferibilmente sotto forma di zuccheri: la maggior parte dei lieviti utilizza preferibilmente il glucosio rispetto al fruttosio;
- ✓ azoto, la cui forma più facilmente assimilabile è quella ammoniacale, seguita dalla forma amminoacidica e proteica;
- ✓ sali minerali, fra i quali sono particolarmente importanti il fosforo, il potassio, lo zolfo e il calcio;
- ✓ ossigeno, è indispensabile per la riproduzione; la respirazione e la moltiplicazione dei lieviti sono condizionati proprio dalla presenza di ossigeno; in caso di carenza si arresta la crescita e la respirazione è sostituita dalla fermentazione; tuttavia all'inizio del processo fermentativo un'aerazione del mosto provoca un'attivazione della fermentazione stessa;
- ✓ elevata concentrazione di acidi organici (ambiente acido), i lieviti fermentano meglio a pH 4 che a pH 3; tuttavia è meglio che il mosto abbia un pH basso per ostacolare lo sviluppo dei batteri (Sicheri, 1986);

L'attività metabolica dei lieviti, oltre che dalla composizione del mosto, è influenzata dalla temperatura che ne condiziona sia la velocità di fermentazione sia la capacità fermentativa. La temperatura che permette la massima velocità di

fermentazione è di 30°C circa, al di sopra della quale però, la fermentazione rallenta fino ad essere inibita (35°C circa). Alle basse temperature (comunque superiori ai 10-14°C) la fermentazione esaurisce più facilmente tutto lo zucchero e permette di ottenere vini più fini. La temperatura ottimale di vinificazione per i vini rossi è di 22-30°C, mentre per quelli bianchi è di 17-20°C (Sicheri, 1986).

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae è il lievito più importante dal punto di vista enologico; esso presenta una forte variabilità per un grande numero di caratteri e questo fatto lo rende molto interessante sia dal punto di vista biochimico che genetico. È il lievito che produce la maggiore quantità di etanolo, a parità di zucchero fermentato, e la minore quantità complessiva di prodotti secondari e, per questo motivo, è in grado di dare origine alle fermentazioni alcoliche più pulite. Durante i primi decenni del XX secolo, *S. cerevisiae* è stato confermato come un microrganismo sicuro in quanto, la Food and Drug Administration americana lo ha inserito nelle sostanze denominate GRAS (Generally Recognized as Safe). *S. cerevisiae* è presente in quantità estremamente basse sull'uva e raramente viene isolato da bacche intatte e da terreni da vigneto (Martini et al., 1996; Pretorius, 2000). Al contrario, è abbondante su succo d'uva, mosto e superfici delle attrezzature da cantina a formare una componente importante di una flora del lievito definita "residenziale" o "di cantina". Inoltre, è economico, facile da coltivare ed è anche possibile conservarlo in sospensione per lunghi periodi.

Ricerche ecologiche approfondite, usando approcci molecolari, sono state effettuate per esplorare la diversità genetica del lievito. Diversi strumenti molecolari sono stati utilizzati a tale scopo, anche per comprendere la dinamica della popolazione di *S. cerevisiae*. Di recente, anche l'impatto dell'attività dell'essere umano sulla diversità

dei lieviti è stata valutata a livello di geni e genomi, evidenziando diversi eventi di addomesticamento (Fay e Benavides, 2005). A questo proposito, gli isolati di *S. cerevisiae* da tutto il mondo hanno mostrato una bassa differenziazione rispetto alle popolazioni di *Saccharomyces paradoxus* che ha rivelato variazioni ben delineate lungo i confini geografici (Liti et al., 2009). L'analisi dei microsatelliti è stata utilizzata per differenziare la struttura genetica dei ceppi di *S. cerevisiae* in diversi vini e vigneti (Legras et al., 2007; Schuller e Casal, 2007). Di recente Franco-Duarte et al. (2014) hanno utilizzato i microsatelliti polimorfici per caratterizzare geneticamente un ampio gruppo di ceppi di *S. cerevisiae* da diverse aree geografiche, mettendo in relazione i dati con importanti tratti enologici.

Nella vinificazione l'uso di ceppi *S. cerevisiae* commerciali sta diventando una pratica comune, grazie ad alcuni vantaggi sulle prestazioni del processo e sulla qualità del prodotto. Per garantire le caratteristiche desiderabili dei ceppi di lievito selezionati alcuni criteri sono obbligatori, come la tolleranza all'etanolo, la velocità di fermentazione dello zucchero, la velocità della fermentazione, la formazione di alte concentrazioni di zuccheri, la bassa produzione di idrogeno solforato e la bassa acidità volatile, la resistenza alla tossina killer e un buon profilo enzimatico. Tutte queste caratteristiche portano alla formazione di vini con un sapore prevedibile e adeguato, se sufficientemente gestita anche la parte tecnologica del processo. Tuttavia, l'uso di i ceppi commerciali di *S. cerevisiae* possono ridurre la biodiversità dei ceppi di lievito che eseguono la fermentazione spontanea e, di conseguenza, ridurre la complessità del prodotto risultante (Frezier e Dubourdieu, 1992). Di recente, molti studi si sono concentrati sulla selezione di ceppi autoctoni locali da utilizzare come starters che contribuiscono al miglioramento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finale (Le Jeune et al., 2006). Tuttavia, nei negli ultimi anni, le cantine si trovano ad affrontare nuove sfide a causa delle attuali richieste del mercato e degli effetti dei cambiamenti climatici sulla qualità del vino. Dei nuovi ceppi starter formati da specie non

convenzionali di *Saccharomyces* (come *S. uvarum* o *S. kudriavzevii*) o loro ibridi (*S. cerevisiae* × *S. uvarum* e *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*) possono contribuire a risolvere alcune di queste sfide (Pérez-Torrado et al., 2017) infatti hanno una buona capacità fermentativa a basse temperature, producendo così vini con minori quantità di alcol e glicerolo. Tuttavia, *S. cerevisiae* ha un'alta capacità competitiva rispetto ai non-*Saccharomyces*: la sua strategia principale per prevalere sulle altre specie microbiche presenti nel succo d'uva, è la vigorosa capacità fermentativa sia in la presenza (effetto Crabtree) che in assenza di ossigeno. In questo modo *S. cerevisiae* consuma più rapidamente le risorse di zucchero e produce velocemente etanolo che diventa tossico per i loro concorrenti.

1.2.2 Lieviti non-*Saccharomyces*

Nonostante il loro basso potere alcoligeno, il potenziale di fermentazione limitato, la scarsa resistenza alla solforosa e la produzione in eccesso di composti secondari, negli ultimi anni l'interesse si sta concentrando anche sulle specie di lievito non-*Saccharomyces* e sul loro possibile uso durante la fermentazione alcolica anche se la produzione di acido acetico, acetato di etile, acetaldeide e acetoino ad alte concentrazioni generalmente impedisce l'uso di questi ceppi come culture di partenza. Le ragioni di questo interesse sono dovute alle critiche che sempre più spesso sono mosse alle fermentazioni guidate attraverso massicci inoculi iniziali di starter di *S. cerevisiae*. Tali critiche riguardo il rischio di condurre ad un appiattimento delle caratteristiche sensoriali dei prodotti finiti, soprattutto per quanto riguarda l'aspetto sensoriale olfattivo. Oltre a tali considerazioni, i lieviti non-*Saccharomyces* sono risultati interessanti per la loro applicazione nell'industria enologica anche per le loro attività enzimatiche. Numerose ricerche condotte negli ultimi anni hanno messo in evidenza che alcuni lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario sono in grado di

secernere enzimi, quali proteasi, esterasi (Rosi et al. 1994) e beta-glucosidasi (Rosi et al. 1994) che influiscono positivamente sull'aspetto qualitativo del vino (Fernandez et al. 2000; Strauss et al. 2001; Ferriera et al. 2001). Le capacità enzimatiche sono rivolte alla trasformazione di determinati composti derivati dall'uva. In questo caso, a volte, i lieviti non *Saccharomyces* vantano peculiarità nelle attività enzimatiche estremamente interessanti e non possedute, o possedute in minima parte, da *S. cerevisiae*. Esempi delle attività enzimatiche più studiate e gli effetti dal punto di vista enologico sono: le β -glucosidasi -formazione di aromi terpenici, Pectinasi -aumento dell'estrazione e riduzione dei tempi di chiarifica, β -xilosidasi - rilascio aromi e degradazione xilani, Proteasi - riduzione delle precipitazioni proteiche, C-S liasi - produzione di aromi tiolici o ancora ossigenasi specifiche per la produzione di no risoprenoidi dal β -carotene.

Inoltre, recentemente è stato proposto l'utilizzo del metabolismo respiratorio dei lieviti non-*Saccharomyces* come strumento per abbassare i livelli di alcool nel vino (Gonzalez et al.,2013). Alcune di queste specie non-convenzionali appartengono ai generi *Hanseniaspora*, *Torulaspota* o *Metschnikowia*; costituiscono la parte microbica principale nelle uve mature e prevalgono durante le fasi iniziali della fermentazione del vino (Flett, 2003; Tamanf e Fleet 2009).

Durante la fermentazione spontanea del succo d'uva, c'è una sequenziale successione di lieviti. Inizialmente, nel mosto fresco, troviamo specie di *Hanseniaspora* (*Kloeckera anamorph counterpart*), *Starmerella*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Lachancea*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*. Nel mosto d'uva, *H. uvarum* e *H. guilliermondii* sono stati trovati ad alta densità cellulare, fino a 10⁶-10⁸ cellule/mL, durante i primi 4-6 giorni di fermentazione, fino alla produzione di un livello di etanolo di circa il 4% -7% v/v (Zott et al., 2008). I lieviti apiculati sono diventati di crescente interesse, soprattutto come la loro proliferazione in concorrenza con *S. cerevisiae* può influire sulla qualità sensoriale di vino, a causa della maggiore produzione di esteri (Viana et al., 2009).

Diversi autori hanno suggerito che la presenza di lieviti apiculati durante la fermentazione hanno contribuito positivamente ad un miglioramento degli aromi vino a causa dell'alta produzione di composti aromatici (Romano e Suzzi, 1996; Ciani e Maccarelli, 1998). Queste proprietà enologiche derivano dalla presenza nei ceppi di *H. uvarum* di beta-d-glucosidasi (Palmeri e Spagna, 2007; Rodríguez et al., 2007) e da attività beta-d-xilosidasi. Entrambe queste glicosidasi sono importanti per rilascio enzimatico di composti aromatici nella vinificazione.

Tra i lieviti non *Saccharomyces*, *T. delbrueckii* (anamorph *Candida colliculosa*) sta attirando una notevole attenzione nell'industria vinicola. *T. delbrueckii* è un tipico rappresentante della flora naturale sulla superficie dell'uva e, proprio come *S. cerevisiae*, si trova in gran parte regioni produttrici di vino (Jolly et al., 2006). *T. delbrueckii*, precedentemente noto come *Saccharomyces rosei* o *Saccharomyces delbrueckii* è un lievito ascomiceto che è stato riclassificato molte volte che ha portato alla descrizione di numerosi taxa che ora sono conosciuti come sinonimi (Kurtzman et al., 2011). Attualmente, ci sono sei specie assegnate al genere *Torulaspota*, *T. delbrueckii*, *Torulaspota globosa*, *Torulaspota franciscaae*, *Torulaspota microellipsoides*, *Torulaspota maleeae* e *Torulaspota pretoriensis* (Kurtzman et al., 2011). Tuttavia, i ceppi di *T. delbrueckii* mostrano variazioni nella loro capacità di fermentare e assimilare i composti di carbonio, contribuendo così a la descrizione incerta di questa specie (Limtong et al., 2008).

W. anomalus, precedente classificata come *Pichia anomala*, è una specie appartenente al genere *Wickerhamomyces* molto diffusa in natura: presente nel suolo, nelle piante, nei materiali e come agente patogeno opportunistico di esseri umani e animali. Presumibilmente, l'habitat primario di questa specie sono le piante infatti, Sláviková et al. (2009) riportano *W. anomalus* come uno dei più frequenti lieviti isolati da foglie e aghi di 10 diverse specie di alberi che crescono nella catena montuosa dei Piccoli Carpazi della Slovacchia. *W. anomalus* è noto per la sua capacità di crescere in

condizioni ambientali stressanti, quali pH estremi e condizioni anaerobiche inoltre svolge un'azione di contrasto a microrganismi indesiderati che possono prendere il sopravvento nella fermentazione. Comitini et al. (2004) per la prima volta hanno studiato l'effetto delle tossine killer prodotte da *W. anomalus* e attive sui lieviti da deterioramento appartenenti al genere *Dekkera* / *Brettanomyces*. L'effetto fungicida esercitato dalla tossina killer di *W. anomalus* contro *Dekkera bruxellensis* è stabile per almeno 10 giorni nel vino, suggerendo una potenziale applicazione come agenti antimicrobici durante l'invecchiamento e la conservazione del vino.

S. bacillaris (sinonimo *Candida zemplinina*) (Duarte et al., 2012) mostra un forte carattere fruttifilo; ha la capacità di produrre basse quantità di etanolo e acido acetico ed elevate quantità di glicerolo. Diversi studi di ecologia hanno riportato la presenza di questa specie durante le fermentazioni spontanee di mosto in diversi paesi (Rantsiou et al., 2012; Bokulich et al., 2013, 2014; Milanović et al., 2013), suggerendo il frequente coinvolgimento di questa specie nel processo di fermentazione. Infatti, *S. bacillaris* è presente nei primi giorni della fermentazione spontanea del mosto d'uva e rimane attivo molto più a lungo della maggior parte degli altri lieviti non *Saccharomyces*. La sua presenza durante la fermentazione è pensata per contribuire ad un aroma più complesso e migliore del vino a causa della maggiore produzione di composti aromatici specifici (Soden et al., 2000) e glicerolo (Ciani et al., 2000) e interazioni positive con *S. cerevisiae* nella produzione e nella degradazione dei metaboliti (Ciani e Ferraro, 1998). Poiché il suo tasso di crescita è significativamente più basso di quello di *S. cerevisiae* e le sue cellule sono sensibili all'etanolo, *S. bacillaris* viene di solito ricoperto da *Saccharomyces* più tolleranti all'aumento di etanolo. Un'altra specie di lievito tipicamente presente sulla superficie delle bacche di uva e che ricevono attenzione come agente di biocontrollo, è *M. pulcherrima* (Janisiewicz et al., 2001). Tra i vari frutti, la superficie della bacca dell'uva rappresenta un habitat ottimale e ricco di nutrienti per *M. pulcherrima*, che è considerato lievito di vino comune sulle bacche di uva troppo

mature. Inoltre, *M. pulcherrima* è generalmente presente durante le prime fasi di fermentazione del succo d'uva (Prakitchaiwattana et al., 2004; Oro et al., 2014). La valutazione dell'attitudine enologica ha mostrato un basso tasso di fermentazione, ma ha anche mostrato alcune caratteristiche positive come la presenza di polisaccaridi, la produzione di glicerolo e l'attività glicosidica (Comitini et al., 2011). Questo lievito non *Saccharomyces* non è normalmente associato alla produzione di acidità volatile, ma possono formarsi alte concentrazioni di esteri (Bisson e Kunkee, 1991) che, così come altri metaboliti, potrebbero dare al vino caratteristiche particolari (Jolly et al., 2017). Molti studi ecologici sono stati condotti sul controllo biologico di *M. pulcherrima* contro diversi agenti patogeni fungini post-raccolta sulle mele, come *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Monilia* e *Alternaria spp.* (El-Ghaouth et al., 1998; Saravanakumar et al., 2008). Apparentemente questa specie di lievito ha un'attività killer ad ampio spettro e colpisce la muffa blu (*Penicillium sp.*).

Un altro lievito non *Saccharomyces* che si trova solitamente in un habitat ad alto contenuto di zucchero è *Schizosaccharomyces pombe*. Tali lieviti sono caratterizzati da fermentazione malo-alcolica e sono capaci di metabolizzare completamente l'acido malico presente nel mosto d'uva nel vino. Viene usato per migliorare alcuni dei parametri sensoriali del vino, in particolare quelli relativi alla stabilità del colore dovuta alla correlazione tra la quantità di acido piruvico rilasciata nel mezzo e la formazione della vitisina A (una piranoantocianina), polifenolo naturale, presente nell'uva.

1.3 Fermentazioni miste

In passato, il contributo dei lieviti non *Saccharomyces* nella vinificazione è sempre stato considerato negativo a causa della loro bassa capacità di produrre alcol per condurre la fermentazione e della produzione di composti indesiderati rispetto a *S. cerevisiae*. Negli ultimi decenni, tuttavia, c'è stata una rivalutazione del ruolo del lievito non *Saccharomyces*

e numerose indagini sono stata realizzate per comprendere meglio l'impatto dei non-*Saccharomyces* sulla chimica e sulle proprietà sensoriali del vino (Ciani e Maccarelli, 1998; Pretorius, 2000; Swiegers and Pretorius, 2005). A riguardo, numerosi studi hanno riscontrato un'ampia variabilità intraspecifica dei caratteri enologici, peculiari e positivi e, soprattutto, un diverso comportamento nella co-cultura dovuto alle interazioni con *S. cerevisiae*. Tutti questi aspetti hanno evidenziato un ruolo significativo di questi lieviti non convenzionali nel determinare il profilo analitico e sensoriale nella complessità aromatica del vino. Sono stati eseguiti numerosi studi sulla co-fermentazione dei mosti ad opera di *S. cerevisiae* e altre specie di lieviti che possono influenzare l'equilibrio organolettico finale del vino.

Diversi obiettivi possono essere perseguiti con l'uso di controllato colture miste con lieviti non convenzionali:

1. valorizzazione del sapore e dell'aroma

Nella vinificazione, diverse indagini concordano sull'impatto di *T. delbrueckii* sulla composizione aromatica e sensoriale dei vini sia nella fermentazione simultanea che in quella sequenziale. Anzi, queste indagini hanno trovato un aumento di estere acetato, (Cordero-Bueso et al., 2013), tioli (3-solfanilesan-1-olo e 3-solfanilesil acetato) (Zott et al., 2011; Renault et al., 2016), terpeni (α terpineolo e linalolo) (Cus e Jenko, 2013), 2 fenil-etanolo (Comitini et al., 2011). Inoltre, i risultati delle valutazioni sensoriali dei vini finali hanno rivelato un impatto sugli attributi sensoriali come "intensità dell'aroma", la complessità, la persistenza, e l'aroma definito "fruttato", a seconda del vitigno (Azzolini et al., 2015). Anche *H. uvarum* o *H. vineae* sono stati proposti in fermentazione mista per migliorare il profilo aromatico dei vini. Anzi, queste specie hanno determinato e aumentato nella produzione la quantità di terpeni ed esteri di acetato con un aumento di caratteri aromatici positivi come il "floreale" e il "fruttato" (Hu et al., 2016; Tristezza et al., 2016). Inoltre, prove di fermentazione mista con *H. uvarum* e *S. cerevisiae* come colture iniziali hanno aumentato il contenuto di isoamil-acetato, mentre l'uso di

Hanseniaspora osmophila ha aumentato la produzione di acetato di 2-feniletile (Moreira et al., 2010; Medina et al., 2013).

Secondo un rapporto di Kurita (2008), usando inoculazioni miste *W. anomalus* (precedentemente *Pichia anomala*) ha portato a un miglioramento positivo di isoamil acetato. Cañas et al. (2014) hanno anche studiato l'effetto delle fermentazioni miste con *W. Anomalus*: i risultati ottenuti hanno mostrato che i vini elaborati per inoculazione sequenziale presentavano livelli più elevati di acetati ed esteri etilici, composti che forniscono una nota fruttata, livelli più alti di alcoli lineari, che sono responsabili delle note erbacee e delle basse concentrazioni di acidi organici, che contribuiscono ad aumentare la qualità aromatica, rispetto ai vini prodotti da una cultura pura di *S. cerevisiae*.

Dashko et al. (2015) usando *Kazachstania gamospora* e *Zygosaccharomyces kombuchaensis* in fermentazioni sequenziali di succo d'uva Ribolla gialla, hanno trovato un aumento della "persistenza del sapore", dell'"intensità del sapore" e diversi attributi fruttati. *Z. bailii*, in fermentazione simultanea, influenza positivamente il profilo aromatico nel vino chardonnay migliorando la produzione di esteri etilici (Garavaglia et al., 2015) mentre *Zygotorulasporea florentia* ha aumentato le note fruttate e floreali nel succo d'uva Sangiovese (Lencioni et al., 2016). Infine, *Pichia kluyveri* è stato proposto nella fermentazione mista del vino con *S. cerevisiae*, questo ha aumentato le concentrazioni di tioli nel Sauvignon Blanc, e le caratteristiche olfattive di pesca-albicocca (Benito et al., 2015).

2. caratteristiche distintive

L'uso di lieviti non convenzionali nella fermentazione mista controllata è stato consigliato e applicato anche per trarre vantaggio dalle loro caratteristiche fermentative specifiche. Ad esempio, *S. pombe* e / o *Schizosaccharomyces japonicus* è stato proposto per molto tempo come agente biologico deacidificante (Magyar e Panyik, 1989; Ciani, 1995) e potrebbero essere utilizzati in modo redditizio poiché

presentano caratteristiche benefiche per la vinificazione. Inoltre, i lavori più recenti hanno dimostrato che queste specie di lieviti in fermentazione mista determinano e aumentano della produzione di pigmenti e della quantità di polisaccaridi (Domizio et al., 2017; Escott et al., 2018). La capacità di deacidificazione del succo d'uva e del vino è stata trovata anche in *Pichia kudriavzevii*, un altro lievito non convenzionale del vino isolato dalla Patagonia (Moreno et al., 2014). D'altra parte, la caratteristica di produrre acidi organici durante la fermentazione può essere una caratteristica desiderata in alcuni ambienti di vinificazione e condizioni di processo. A questo proposito, *L. thermotolerans*, in fermentazione simultanea e sequenziale, ha mostrato la capacità di produrre acido lattico che determina un aumento dell'acidità totale del vino, caratteristica desiderata nei succhi d'uva carenti di acidità, che generalmente provengono dai vini con climi caldi (Kapsopoulou et al., 2007; Gobbi et al., 2013).

Un altro tratto positivo desiderato e perseguito con la fermentazione mista di lieviti non convenzionali è la riduzione dell'acidità volatile. Una bassa acidità volatile (principalmente acido acetico) è uno dei caratteri fondamentali per la selezione di ceppi di lievito per uso enologico. In effetti, l'acidità volatile gioca a ruolo significativo nell'aroma del vino infatti, concentrazioni eccessive di acido acetico, sono altamente dannose per la qualità del vino. La quantità di acidità volatile prodotta da *S. cerevisiae* è generalmente bassa (fino a 0,50 g/L), ma può essere più alta durante la fermentazione che avviene in terreni ricchi di zuccheri. Infatti, *S. cerevisiae* produce acido acetico come risposta allo stress osmotico dovuto all'incremento dei geni che codificano per l'aldeide deidrogenasi (Blomberg e Adler, 1992). Alcune specie non *Saccharomyces* non rispondono allo stesso modo allo stress osmotico e per questi motivi ai ricercatori è stato proposto di ridurre l'acidità volatile in vini, in particolare in quelli con un alto contenuto iniziale di zucchero. *T. delbrueckii* e *C. stellata* (ora riclassificata come *Starmerella bombicola*) in mostra una bassissima produzione di acidità volatile (Ciani e Maccarelli, 1998). A questo proposito, *T. delbrueckii*, in fermentazione mista con *S.*

cerevisiae, ha mostrato una consistente riduzione dell'acidità volatile in fermentazioni ad alto contenuto di zucchero (Bely et al., 2008). Allo stesso modo, *C. stellata* in fermentazioni miste e sequenziale con *S. cerevisiae* ha mostrato una riduzione dell'acidità volatile (Ciani e Ferraro, 1998).

Il glicerolo, polialcole contenente nella struttura molecolare più di un gruppo idrossilico (-OH), è un prodotto desiderato della fermentazione in quanto, avendo come caratteristiche principali densità e viscosità, conferisce al vino una nota di morbidezza al palato, molto gradita.

La quantità di glicerolo formata durante la fermentazione dalle specie di lievito *S. cerevisiae* è compresa tra il 7% e il 10% rispetto a quella dell'etanolo. Tra i lieviti di vino non convenzionali, le specie che producono quantità elevate di glicerolo vengono utilizzati nella fermentazione mista per migliorare il contenuto di glicerolo nei vini carenti. A questo proposito, le cellule immobilizzate di *C. stellata* hanno mostrato un aumento del contenuto di glicerolo di circa il 100% nella fermentazione mista (Ciani e Ferraro, 1998). Inoltre, il lievito di *S. bacillaris* (precedentemente *C. stellata*), in fermentazione mista con la coltura iniziale di *S. cerevisiae*, è stata ampiamente studiata e dimostrando un aumento del glicerolo contenuto in vini misti, in relazione con la sensazione in bocca e la complessità di sapore di vino.

La produzione di polisaccaridi è un'altra rilevante e importante caratteristica che potrebbe essere migliorata con l'uso di lieviti non convenzionali nella vinificazione. I polisaccaridi sono elementi che hanno un effetto determinante sia sull'uva che nel vino: sull'uva agiscono dal punto di vista strutturale e quindi sulla resistenza e sulla permeabilità della parete cellulare. Questa caratteristica agisce in modo indiretto sulla qualità del vino visto che una maggior permeabilità condiziona in modo significativo l'estraibilità di aromi e di colori dalle bucce (per i rossi), oltre che di tutti i componenti importanti presenti sulle pareti. Diversi studi hanno dimostrato che i lieviti non convenzionali de vino sono generalmente caratterizzati dalla capacità di rilasciare

un'alta quantità di polisaccaridi (Comitini et al., 2011; Domizio et al., 2011; Gobbi et al., 2013); in effetti, *S. cerevisiae* rilascia quantità basse di polisaccaridi, generalmente compresi tra 50 e 150 mg/L (Giovani et al., 2010). La possibilità di aumentare il contenuto delle mannoproteine naturalmente, con l'uso di questi lieviti, potrebbe rappresentare una preziosa possibilità di migliorare la qualità complessiva dei vini. A questo proposito, *M. pulcherrima*, *Saccharomyces ludwigii*, *L. thermotolerans*, *S. pombe*, *S. japonicus* hanno mostrato un'elevata produzione di polisaccaridi e potrebbero essere utilizzati in modo proficuo nella fermentazione mista (Domizio et al., 2017).

3. Riduzione dell'etanolo

L'aumento dei livelli di alcol nel vino è una delle principali sfide che al giorno d'oggi colpisce l'industria vinicola. Infatti, negli ultimi decenni, c'è stato un progressivo aumento del contenuto di etanolo nei vini a causa dei cambiamenti climatici globali e dei nuovi stili di vino che sono associati ad una maggiore maturità dell'uva. Di conseguenza, c'è un crescente interesse per ridurre l'etanolo nel vino. In questo contesto, l'approccio microbiologico appare fondamentale e promettente per ridurre le concentrazioni di etanolo poiché sfrutta le differenze nel metabolismo energetico tra le specie di lievito del vino. In particolare, c'è un crescente interesse, anche in questo caso, ad indagare sull'utilizzo dei lieviti non convenzionali: mostrano un'ampia variabilità nella resa dell'etanolo che potrebbe essere un potenziale strumento per la riduzione della gradazione alcolica nel vino. Lavori recenti hanno indagato sulla variabilità interspecie e/o intraspecie tra i lieviti di vino non convenzionale nella resa di etanolo (Magyar e Tóth, 2011; Contreras et al., 2014; Gobbi et al., 2013; Contreras et al., 2015a, b). Bassa resa in etanolo è stata trovata in alcuni ceppi di *C. zemplinina* (Magyar e Tóth, 2011) e nei ceppi che appartengono ai generi *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces* (Gobbi et al., 2013).

La resa dell'etanolo è un tratto legato alla specie ma, analogamente ad altri parametri di fermentazione, è stata evidente anche una pronunciata variabilità intraspecie (Ciani e Maccarelli, 1998; Comitini et al., 2011; Domizio et al., 2011). Una bassa resa di etanolo è stata trovata in ceppi di *M. pulcherrima*, *Schizosaccharomyces malidevorans* e *C. stellata* (Contreras et al., 2014). Il metabolismo respiratorio-fermentativo nei lieviti potrebbe essere usato come strategia per ridurre la concentrazione di etanolo nel vino. Inoltre, è stata mostrata una bassa resa in etanolo tra i lieviti vinari di tipo non *Saccharomyces*, e il consumo di zucchero per via respiratoria (Crabtree negativo). Entrambi questi approcci hanno indicato il promettente uso dei lieviti non convenzionale per limitare la produzione di etanolo. Poiché la maggior parte dei lieviti non convenzionali non è in grado di completare fermentazione alcolica, deve essere aggiunto *S. cerevisiae* con approccio simultaneo o sequenziale. A questo proposito diversi lavori recenti si sono soffermati sulla combinazione di lieviti non convenzionali selezionati come *M. pulcherrima*, *T. bacillars*, *T. bombicola*, *Z. rouxii*, *T. delbrueckii*, e *P. kudriavzevii*. Queste specie di lievito sono in grado di deviare il flusso di carbonio verso metaboliti multipli anziché verso l'etanolo, con conseguente elevata capacità fermentativa dei ceppi di *S. cerevisiae* (Englezos et al., 2015; Canonico et al., 2016a, b; Varela, 2016). I diversi meccanismi regolatori respiro-fermentativi sono stati valutati in alcuni lieviti non convenzionali rispetto a *S. cerevisiae* per ridurre il contenuto di etanolo mediante aerazione parziale e controllata del succo d'uva in fermentazione simultanea e sequenziale (Contreras et al., 2015a, b; Quirós et al., 2014; Rodrigues et al., 2016). I risultati in termini di riduzione dell'etanolo sono promettenti e vanno da 0,3% a 2,2% v/v a seconda della deformazione e delle condizioni di fermentazione. Tuttavia, in condizioni di aerazione di fermentazione simultanea è stato mostrato un consistente aumento dell'acidità volatile dal momento che *S. cerevisiae*, in questa condizione, ha la tendenza a produrre grandi quantità di acido acetico (Morales et al., 2015). D'altra parte, si è notato che questi lieviti non convenzionali producono

pochissima acidità volatile anche in condizioni ossigenate (Quirós et al., 2014; Rodrigues et al., 2016). Per queste ragioni, utilizzando la fermentazione sequenziale prima con il lievito non convenzionale in moderata condizione di aerazione seguita dall'inoculo di *S. cerevisiae* in condizioni di anaerobiosi rigorosa, potrebbe essere una strategia adatta da evitare aumento del contenuto di acido acetico e contemporaneamente riduzione nel contenuto di etanolo nel vino.

4. Attività antimicrobica e l'uso di lieviti killer

Un altro possibile aiuto che può venire dai lieviti non *Saccharomyces* nella vinificazione riguarda il controllo dei microrganismi indesiderati. Durante le varie fasi della fermentazione è necessario un controllo puntuale e tempestivo dei potenziali microrganismi deterioranti. Anzi, nei processi di vinificazione e fermentazione, un gran numero di lieviti può partecipare alle varie fasi produttive determinando, a volte, caratteristiche organolettiche indesiderate del prodotto finale. Inoltre, al giorno d'oggi, c'è un crescente interesse nell'uso di antimicrobici naturali per controllare il deterioramento, riducendo così gli additivi chimici. In questo contesto, i lieviti killer e le loro tossine secrete sembrano rappresentare una soluzione interessante come agenti antimicrobici, per la sostituzione parziale o completa dell'uso di agenti sintetici. In effetti, uno dei temi di attualità nella vinificazione è la riduzione dell'uso di SO₂ e la sua sostituzione parziale o completa con antimicrobici naturali, che sarebbero più compatibili con le richieste dei consumatori.

Le tossine killer sono proteine o glicoproteine prodotte naturalmente dai lieviti che uccidono le cellule sensibili. Le modalità di azione della maggior parte delle tossine killer sono state ben studiate anche se le modalità per uccidere le cellule sensibili, sono ancora sconosciute (Liu et al., 2015). Gli studi sul fenomeno killer nei lieviti hanno fornito preziose informazioni su una serie di aspetti applicativi fondamentali, in particolare nella vinificazione. In relazione all'aspetto ecologico, nel corso degli anni, i ceppi killer sono stati isolati da varie fonti enologiche, tra cui le bacche dell'uva, i mosti

d'uva e i vini. Allo stato attuale, il controllo dei lieviti selvaggi si ottiene nella fase pre-fermentativa, generalmente con l'aggiunta di SO₂ al mosto appena spremuto. In questa fase, i lieviti apicolati e in particolare *H. uvarum* sono ampiamente presenti e necessitano di essere controllati. A questo proposito, un interessante fenomeno killer è rappresentato dall'uso di *Tetrapisispora phaffii* in quanto, la sua tossina killer è in grado di controllare la proliferazione di lieviti apicolati durante la fase di pre-fermentazione (Comitini e Ciani, 2010).

Durante la fermentazione e principalmente nelle fasi di invecchiamento, un altro lievito indesiderato è *B. bruxellensis*, responsabile di odori sgraditi del vino e considerato l'attuale preoccupazione principale per i viticoltori ma non è stato ancora sviluppato un metodo efficace per controllarne la crescita. Di recente, Mehlomakulu et al. (2017) si è focalizzato sull'identificazione e caratterizzazione di tossine killer da *Candida pyralidae* che mostrano un potenziale effetto antimicrobico contro *B. bruxellensis* nel vino. Questi, durante la vinificazione, erano attivi e stabili e l'attività di queste tossine killer non è stata influenzata dalla concentrazione dello zucchero né dall'etanolo che si trovano tipicamente nel succo d'uva e nel vino. Anche Belda et al. (2017) hanno studiato e caratterizzato due tossine killer da *Pichia membranifaciens* (PMKT1 e PMKT2) che sono in grado di inibire *B. bruxellensis* mentre *S. cerevisiae* era completamente resistente. Anche Kwkt e Pikt, due tossine killer prodotte rispettivamente da *Kluyveromyces wickerhamii* e *W. anomalus* hanno mostrato un'attività antimicrobica contro *Brettanomyces / Dekkera* per evitare il deterioramento del vino (Oro et al., 2016). Infine, un'altra modalità interessante nel controllo della microflora batterica indesiderabile durante la fermentazione è stata rivelata da Nissen et al. (2003). Questi autori hanno mostrato che la morte prematura di *L. thermotolerans* e *T. delbrueckii* nelle fermentazioni a coltura mista con *S. cerevisiae* non è stata indotta dall'etanolo o da qualsiasi altro composto tossico, ma piuttosto da un meccanismo mediato dal contatto cellula a cellula. Studi successivi (Renault et al., 2013) hanno

supportato tale tesi, cioè che la morte di *T. delbreckii* è mediata da un meccanismo di contatto cellula-cellula. D'altra parte, Albergaria e Arneborg (2016) hanno ben descritto come *S. cerevisiae* stabilisce interazioni antagoniste contro diverse specie microbiche legate al vino (sia lieviti che batteri), mediate dalla secrezione di peptidi antimicrobici che svolgono un ruolo importante nel suo dominio all'interno degli ecosistemi ricchi di zuccheri.

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni l'interesse da parte del mondo enologico verso l'impiego dei lieviti autoctoni è fortemente cresciuto. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'impiego di ceppi indigeni può portare alla formazione di vini con caratteristiche sensoriali peculiari, legate al prodotto ed al territorio di origine e di elevata qualità.

È ben noto che nella fermentazione dei mosti d'uva, la rapidità con cui il processo fermentativo viene avviato, la regolarità del suo andamento e il suo completamento sono fortemente influenzati dal tipo di lievito presente (Castelli, 1954; Zambonelli, 1998; Delfini, 1995). Inoltre, è altrettanto ben noto che le attività metaboliche del lievito, come la produzione di alcuni composti o la trasformazione di specifiche componenti del mosto o del vino, possono contribuire in maniera importante alla definizione dell'aroma del prodotto finale (Pretorius, 2000).

È ormai opinione diffusa tra i tecnici del settore enologico che l'attività dei lieviti indigeni può influenzare le caratteristiche di qualità e tipicità del vino prodotto, al punto che molti di essi non intendono rinunciare alla fermentazione spontanea per avere un prodotto con caratteristiche distintive. Dall'altra parte, l'utilizzo di una tecnologia che preveda l'impiego corretto e mirato di lieviti autoctoni consente di ridurre od eliminare tutti quegli interventi che prevedano l'uso di coadiuvanti ed additivi chimici.

In questa tesi si è cercato di dimostrare, attraverso l'uso di ceppi di lievito indigeni di *S. cerevisiae*, isolati da un vigneto situato nell'entroterra marchigiano, nella zona della produzione del Piceno DOC, come possano influenzare la composizione analitica e volatile del vino, se confrontati con starters commerciali.

Inoltre, si è anche cercato di valutare la capacità fermentativa di tali lieviti, confrontandola con ceppi starter commerciali, già ampiamente utilizzati, per la produzione di vini Piceno DOC. Sicuramente, si può anticipare che, in via generale, l'uso di ceppi di lievito indigeni con caratteristiche enologiche strettamente legate al territorio in cui si trova il vigneto, è

auspicabile per il loro migliore adattamento alle condizioni ambientali inoltre, può contribuire al mantenimento delle proprietà sensoriali "tipiche" dei vini di ogni specifica regione.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi di lievito

Dieci diversi ceppi starter commerciali di *S. cerevisiae* sono stati usati per confrontare le differenze genomiche a livello di sforzo di due *S. cerevisiae* autoctoni (Pe1 e G4). I lieviti secchi commerciali che sono stati usati sono: Lalvin EC1118, Lalvin ICV OKAY, NEM, Enoferm BDX, Uvaferm CM, BC, CEG e VRB YSEO (Lallemand Inc., Tolosa, Francia); VIN13 (Anchor Wine Yeast, Città del Capo, Sudafrica); e Zymaflore F15 (Laffort, Bordeaux Cedex, Francia). Tutti questi lieviti secchi sono stati reidratati seguendo le istruzioni e, le colture pure isolate sono state utilizzate per la valutazione genetica e fisiologica dei saggi. Per le prove di fermentazione sono state utilizzate tre colture di partenza, VIN13, OKAY e EC1118 come ceppi di controllo.

I lieviti autoctoni selezionati di *S. cerevisiae* (Pe1 e G4) provengono da uve Pecorino e Verdicchio dell'area DOC di Offida, nel centro Italia. Questi lieviti erano precedentemente stati identificati dalla sequenza D1 e D2 26S-DNA. Tutti i ceppi di lievito sono stati mantenuti a 4°C per una conservazione a breve termine sull'estratto di lievito-peptone-destarso (YPD) mezzo di agar (Oxoid, Basingstoke, Regno Unito) e per la conservazione a lungo termine nel brodo YPD integrato con 80% (p/v) di glicerolo a -80°C.

3.2 Identificazione e caratterizzazione degli isolati di *S. cerevisiae*

Colture pure di lievito di tutte i *S. cerevisiae* commerciali e due culture indigene selezionate sono state pre-coltivate su agar YPD a 25°C per 3-4 giorni. Le cellule sono state quindi trasferite in provette con tappo a vite con 5 µL di acqua per le applicazioni di biologia molecolare (prive di nucleasi e proteasi) e il DNA è stato estratto a 95°C per 10 minuti in Biorad Thermal Cycler. Le amplificazioni PCR sono state condotte come descritto da Legras e Karst usando primer delta 2 (50-GTGGATTTTTTATTCCAAC-3) e primer delta 12

(50-TCAACAATGGAATCCCAAC-30). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con un Biorad Thermal Cycler, utilizzando i seguenti programmi: 4 minuti a 95°C, seguito da 35 cicli di 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 46°C e 90 secondi a 72°C, e la fase finale di estensione a 72°C per 10 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% (p/v) sottoposti a 100 V per 1 ora in un tampone 0.5x TBE (Tris base, Acido borico e EDTA).

3.3 Saggio del potere fermentativo

Per determinare il potere fermentativo di OKAY, VIN13, EC1118, Pe1 e G4, il succo d'uva proveniente dall'annata 2016 è stato adeguato al 30% di zucchero con saccarosio (Carlo Erba reagents S.r.l., Comaredo, Milano). Le prove sono state condotte in triplice su 70 mL di succo d'uva di Verdicchio pastorizzato a 25°C in condizioni statiche. Il processo di pastorizzazione è stato effettuato a 100°C per 10 min. Tutti i ceppi sono stati pre-coltivati in YPD modificato (0,5% p/v di estratto di lievito, 2% p/v di glucosio, 0,1% p/p di peptone) per 1 giorno a 25°C su un agitatore a scuotimento orbitale (rotazione, 150 rpm). Le cellule sono state usate per inoculare il succo d'uva alla concentrazione iniziale di circa 1×10^6 cellule/mL per ogni lievito.

3.4 Prove di microfermentazione

Per valutare le attitudini fermentative dei ceppi indigeni di *S. cerevisiae*, due serie di prove di fermentazione sono state condotte a diverse temperature (22°C e 16°C) sul succo d'uva del Verdicchio proveniente dall'annata 2015. Il succo d'uva di Verdicchio utilizzato aveva inizialmente la seguente composizione analitica:

- pH 3,26;
- contenuto iniziale di zucchero 217 g/L;
- acidità totale 4,53 g/L;

- azoto contenuto YAN (111 mg/L).

Le prove di fermentazione sono state condotte in beute contenenti 350 ml di succo d'uva di Verdicchio. Le boccette sono state chiuse con una valvola Müller contenente acido solforico, per consentire solo alla CO₂ di fuoriuscire dal sistema, e poste, sempre in triplice, in termostati a 22°C o 16°C in condizioni statiche. Tutti i ceppi sono stati pre-coltivati in YPD modificato (0,5% p/v di estratto di lievito, 2% p/v di glucosio, e 0,1% p/v peptone) per 1 giorno a 25°C in un agitatore a scuotimento orbitale (rotazione, 150 rpm). Le cellule sono state usate per inoculare il succo d'uva alla concentrazione iniziale di circa 1x10⁶ cellule/mL per ogni lievito. Come ceppi di controllo, sono stati utilizzati VIN13, OKAY e EC1118. Le cinetiche di fermentazione sono state monitorate misurando la perdita di peso delle boccette a causa della perdita per evaporazione di CO₂, che è stata seguita fino alla fine della fermentazione (p.e., peso costante per 2 giorni consecutivi).

3.5 Procedure analitiche

3.5.1 Determinazione del glicerolo

Per determinare le concentrazioni di glicerolo sono stati utilizzati specifici kit di enzimi della ditta Megazyme International Ireland (Wicklow, Irlanda).

Il kit contiene:

- ✓ Bottiglia 1: Buffer (20 mL, pH 7.4) più sodio azide (0.02% w/v) come conservante
- ✓ Bottiglia 2: NADH più ATP and PEP;
- ✓ Bottiglia 3: 1.5 mL di sospensione di piruvato chinasi e L-lattato deidrogenasi;
- ✓ Bottiglia 4: soluzione di glicerolchinasi (1.5 mL);
- ✓ Bottiglia 5: soluzione standard di glicerolo (5 mL, 0.20 mg/mL) in 0.02% (w/v) di sodio azide.

Principio: il glicerolo viene fosforilato dall'ATP con la glicerolo chinasi (GK) per produrre glicerolo-3-fosfato e ADP:



L'ADP formato dalla reazione precedente è riconvertita in ATP in presenza di fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la piruvato chinasi (PK), con la 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 della seconda bottiglia è stato disciolto in 7,5 ml di acqua deionizzata (miscela di reazione). Nell'usare le bottiglie 3 e 4 agitare bene prima in caso che l'enzima si possa essere depositato sul tappo di gomma.

	BIANCO	CAMPIONE
H ₂ O distillata	2 ml	1.90 ml
Campione	---	0.10 ml
Buffer	0.20 ml	0.20 ml
Soluzione 2 (NADH-ATP-PEP)	0.10 ml	0.10 ml
Sospensione 3 (PK/L-LDH)	0.02 ml	0.02 ml

Miscelare delicatamente avendo cura di mettere un pò di parafilm sul tappo, leggere le assorbanze delle soluzioni dopo circa 4 minuti.

Iniziare la reazione inserendo:

Contenuto bottiglia 4 (GK)	0.02 ml	0.02 ml
----------------------------	---------	---------

Miscelare come sopra e leggere le assorbanze delle soluzioni alla fine della reazione (circa 5 minuti). Se la reazione non si è ancora fermata, continuare a leggere le assorbanze a intervalli di 2 minuti fino a quando non rimangono invariate per 2 minuti.

Calcoli:

1. $\Delta A = A \text{ iniziale} - A \text{ finale}$
2. Concentrazione glicerolo (g/l) = $(\Delta A \text{ campione} - \Delta A \text{ bianco}) \times 0,3421$
3. Controllo (g/l) = $(\Delta A \text{ controllo} - \Delta A \text{ bianco}) \times 0,3421$

3.5.2 Determinazione dell'ammonio

Per la determinazione dello ione ammonio ho utilizzato un kit enzimatico della ditta Roche. La confezione del kit conteneva:

- ✓ un flacone con all'interno 50 tavolette di NADH (circa 0,4 mg di NADH per ogni tavoletta);
- ✓ un flacone con 60 ml di buffer e α -chetogluatarato (pH 8.0);
- ✓ un flacone contenente una soluzione di glutammato deidrogenasi (1,2 ml) ;
- ✓ un flacone con una soluzione di controllo.

La determinazione della concentrazione dello ione ammonio si basa sull'amminazione riduttiva dell' α -chetogluatarato, ad opera della glutammato deidrogenasi (GLDH) e della forma ridotta della nicotinamide adenin dinucleotide (NADH) secondo l'equazione:



Modalità di esecuzione: per ogni campione da analizzare abbiamo sciolto una tavoletta di NADPH in 1 ml di buffer (miscela di reazione).

Nel frattempo, sono state preparate una serie di cuvette: bianco, campione 1, campione 2, ecc... nelle quali sono state aggiunte le seguenti quantità:

	BIANCO	CAMPIONE	CONTROLLO
Miscela di reazione	1 ml	1 ml	1 ml
Campione	---	100 μ l	---
H ₂ O	2 ml	1.9 ml	1.9 ml
Soluzione di controllo	---	---	100 μ l

Le cuvette sono state poi ricoperte con parafilm ed agitate, dopodiché sono state fatte riposare per 5 minuti ad una temperatura di circa 20-25 °C ed è stata letta l'assorbanza a 340 nm.

Successivamente ad ogni cuvetta sono stati aggiunti 20 μ l di soluzione contenente la glutammato deidrogenasi; dopo averle agitate, capovolgendole dolcemente, sono stati attesi circa 20 minuti affinché la reazione fosse completata ed è stata letta ed annotata l'assorbanza finale a 340 nm.

Calcoli:

1. $\Delta A = A_{iniziale} - A_{finale}$
2. Concentrazione ammonio (g/l) = $(\Delta A_{campione} - \Delta A_{bianco}) \times 0,0816$
3. Controllo (g/l) = $(\Delta A_{controllo} - \Delta A_{bianco}) \times 0,0816$

3.5.3 Determinazione dell'etanolo

La preparazione del campione prevede la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 ml) con filtro cut-off 0.2 μ m, 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 (3.4.3 e 3.4.4). 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

3.5.4 Determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili

Per la determinazione degli aminoacidi prontamente assimilabili (azoto α -aminico) sono stati prelevati da ogni campione 50 μl di mosto e posti in una cuvetta di metil acrilato (1 cm di lunghezza e 4,5 ml di capacità), a cui successivamente sono stati aggiunti 3 ml di soluzione NOPA. Le cuvette sono state ricoperte con parafilm e agitate. Il bianco è stato preparato aggiungendo 50 μl di acqua deionizzata con l'aggiunta di 3 ml di soluzione NOPAW. Dopo 10 minuti, si è effettuata la lettura nell'UV-Vis a 335 nm a temperatura ambiente (22-25 °C). L'assorbanza netta è stata calcolata sottraendo il bianco al campione. La concentrazione degli aminoacidi è stata calcolata sulla base di una retta di taratura secondo la metodica descritta da Dukes & Butzke (1998).

Soluzione NOPA: 0,336 g di OPA (orto-ftaldialdeide), sono stati sciolti in etanolo e portati a volume a 50 ml. A questa soluzione alcolica, è stata addizionata una soluzione acquosa contenente:

- ✓ 1,919 g di NaOH al 98 %
- ✓ 4,234 g di Acido Borico al 99 %
- ✓ 0,408 g di Nac (N-acetil-L-cisteina)

e portata a volume in pallone tarato da 500 ml con acqua deionizzata; la soluzione aveva un pH approssimativo di 9.5. La soluzione NOPA è stabile a 4 °C per almeno 3 settimane.

Soluzione NOPAW: Stessa soluzione senza OPA.

3.5.5 Analisi acidità totale

L'acidità totale viene espressa in g/L di acido tartarico (M.E. = 75). Viene misurata mediante titolazione con soluzione standard di una base e rilevazione del punto finale mediante pH-metro (Figura 1). Si preleva 25 ml da ogni campione, si mette in un becker e si immerge l'elettrodo nel vino, la cui temperatura deve essere il più possibile vicino a 20 °C e si titola con NaOH. Si fa cadere l'idrossido di sodio goccia a goccia da una buretta, facendo ben attenzione che le gocce non si fermino nelle pareti del becker o che la soluzione non schizzi sempre sulle pareti del becker fino a raggiungere un pH stabile intorno a 7. A questo punto si osserva la buretta, controllando la quantità di NaOH messa, facendo attenzione al menisco. Poi applicando la formula seguente, si calcola il valore dell'acidità totale di ogni campione analizzato:

Ac. totale (acido tartarico g/l) = ml NaOH x 0,75, dove:

ml NaOH = ml di titolante

0,75 = fattore di correzione



Figura 1: pH-metro per l'analisi dell'acidità totale

3.5.6 Analisi acidità volatile

La determinazione dell'acidità volatile (espressa in g/l di acido acetico) è stata effettuata mediante distillazione in corrente di vapore con l'acidimetro Juffman (Figura 2). Tale apparecchio, che funziona elettricamente e che opera su 5 ml di vino, è composto dalle seguenti parti:

- ✓ 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, scaldata da una piastra elettrica, provvista di un tappo a due fori; attraverso un foro passa il tubo di sicurezza, che serve anche per riempire la beuta, nell'altro foro è inserita una valvola;
- ✓ valvola per indirizzare il flusso di vapore o all'esterno (prima che inizi l'analisi) o dentro il palloncino da distillazione in corrente di vapore (durante l'analisi);

- ✓ palloncino da distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori;
- ✓ mantello scaldante o piastra elettrica per scaldare il palloncino da distillazione in corrente di vapore;
- ✓ refrigerante;
- ✓ beuta di raccolta del distillato.



Figura 2. acidimetro di Juffman

Si mette l'acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo per metà o poco più del suo volume e si innesta la corrente elettrica alla piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Poi si attiva il refrigerante e sotto si mette il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di vapore esce all'esterno dal tubo di sicurezza, si mette nel palloncino da distillazione in corrente di vapore 5 ml di vino prelevati in modo esatto con una pipetta precedentemente avvinata. Successivamente si chiude con l'apposito tappo il palloncino e si accende il mantello riscaldante per scaldare il vino. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa il vino in ebollizione. Si distilla 40 ml di distillato, facendo attenzione che il livello del vino all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, si abbassa il mantello scaldante o

addirittura si spegne momentaneamente. Terminata la distillazione, si spegne il mantello scaldante il palloncino e si riporta la valvola nella posizione di partenza, in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; poi si aspira il vino esausto e le acque di lavaggio del palloncino nel recipiente di raccolta degli scarti. Alla fine, si fa la determinazione dell'acidità volatile attraverso una titolazione acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0,02 N) in una buretta e 3 gocce di fenolftaleina come indicatore aggiunto nel becker del campione in modo tale da effettuare il viraggio del campione in un colore rosa vivo.

3.5.7 Estrazione ed analisi dei composti volatili

Il metodo si basa su una estrazione delle sostanze volatili dal vino con una miscela etere/esano. La preparazione del campione prevede, per gli esteri e gli acidi volatili: 50 ml di vino in un matraccio da 70 ml a cui si aggiungono 2 ml di standard di estrazione (3-ottanolo, 40 mg/l) e 0.3 ml di H₃PO₄ al 30 %. Si procede, poi, all'estrazione dei composti volatili aggiungendo con una pipetta 4 ml di una miscela etere:esano (1:1 in vol). Si pone il matraccio su un agitatore per 5 minuti a 400 rpm (Figura 3).



Figura 3. Matracchi in agitatore durante l'estrazione dei composti volatili

Si aspetta il tempo necessario (circa 10-15 minuti) affinché le due fasi si separino (Figura 4) e poi si recupera la fase organica in una vial da 10 ml provvista di tappo di teflon.



Figura 4. Separazione tra fase acquosa e fase organica

Si ripete l'estrazione per altre due volte con 2 ml di miscela etere:esano (1:1) con la stessa procedura. Si aggiunge ogni volta la fase organica nella stessa vial, dove si aggiunge con una spatola solfato di sodio. Dopo l'estrazione, per separare la fase organica da quella acquosa, si mette la vial da 10 ml in congelatore per una notte; il giorno dopo, quando solo la fase acquosa sarà congelata, si versa la fase organica in una nuova vial da 2,5 ml. L'estratto è così pronto per essere analizzato mediante gascromatografia (GC). Con questa tecnica, in cui la fase fissa è una colonna contenente il materiale attivo e la fase mobile è un gas (generalmente elio), la separazione avviene sulla base delle diverse caratteristiche di volatilità dei composti; ogni composto, infatti, fornisce un segnale (picco) che permette la sua identificazione sulla base del tempo impiegato per arrivare al rilevatore. La GC è utilizzata per la separazione di sostanze volatili o volatilizzabili come idrocarburi a basso peso molecolare, aromi, acidi organici.

L'estrazione è avvenuta tramite l'utilizzo di solventi (descritti precedentemente); per calibrare il sistema analitico, però, è stata utilizzata una curva di taratura ottenuta mediante l'iniezione di soluzioni standard a differente concentrazione per ogni composto volatile da analizzare. Per la rilevazione è stato utilizzato un

gascromatografo serie GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) con detector a ionizzazione di fiamma.

Relativamente alla determinazione gascromatografica degli esteri e acidi volatili, le condizioni operative sono state le seguenti:

- ✓ Temperatura dell'iniettore/rivelatore: 250°C;
- ✓ Colonna capillare Supelcowax 10 (30m, 0,25 mm id);
- ✓ Iniettore: splitless 60 sec; iniettato: 1 µl;
- ✓ Temperatura del forno: T iniziale 50°C per 5 minuti, poi un gradiente di 3 °C/min e isoterma di 220°C per 20 minuti;
- ✓ Gas vettore: Azoto.

3.6 Analisi statistica

I dati sperimentali relativi ai vini sono stati elaborati dal metodo on-way ANOVA, una tecnica statistica che consente di studiare due o più gruppi di dati confrontandone sia le variabilità interne sia quelle tra i gruppi stessi. I significati sono stati analizzati utilizzando STATISTICA 7 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Le differenze significative sono state determinate utilizzando i tests di Duncan e i dati sono stati considerati significativi se i valori p associati erano $<0,05$.

L'analisi delle componenti principali (abbreviato in PCA) è una tecnica utilizzata nel campo della statistica multivariata. Consiste nella riduzione di un numero più o meno elevato di variabili (rappresentanti altrettante caratteristiche del fenomeno analizzato) in alcune variabili latenti, che da sole sono considerate comunque informative.

I suoi obiettivi sono principalmente:

- 1) la riduzione dei dati originari;
- 2) la reinterpretazione di tali osservazioni;
- 3) conservare i dati realmente necessari.

Ciò avviene tramite una trasformazione lineare delle variabili, che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano nel quale vengono ordinate in ordine decrescente di varianza: pertanto, la variabile con maggiore varianza viene proiettata sul primo asse, la seconda sul secondo asse e così via. La riduzione della complessità avviene limitandosi ad analizzare le principali (per varianza) tra le nuove variabili. Diversamente da altre trasformazioni (lineari) di variabili praticate nell'ambito della statistica, in questa tecnica sono gli stessi dati che determinano i vettori di trasformazione. In questo caso tale tecnica è stata utilizzata per discriminare i composti volati dalle altre sostanze presenti. Il PCA è stato realizzato utilizzando il software Unscrambler 7.5 (CAMO ASA, Oslo, Norvegia).

CAPITO 4: RISULTATI

4.1 Biotipizzazione delle culture selezionate

I risultati del biotipo effettuato utilizzando primer inter- δ sono riportati nella Figura 5.

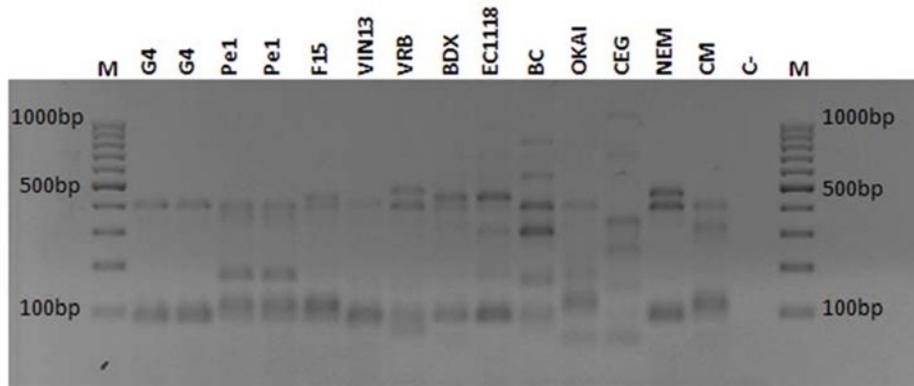


Figura5. Caratterizzazione molecolare di *S. cerevisiae* commerciali e indigeni. I primer inter- δ PCR sono stati usati per amplificare i corrispondenti geni dei ceppi. Il gel rappresentativo mostra i profili di questi ceppi selezionati; i ceppi indigeni sono riportati in duplicato. Lane M: Gene ruler 100 bp (Fermentans), come indicato a sinistra e a destra del gel. Lane C-: indicato come controllo negativo.

Il confronto con i profili di amplificazione ottenuti dopo l'analisi PC dei dieci ceppi commerciali *S. cerevisiae* utilizzati in cantina durante le fermentazioni del Piceno D.O.C.G., hanno indicato che i ceppi indigeni Pe1 e G4 hanno diversi profili e che possono essere facilmente distinguibili dagli altri ceppi.

4.2 Valutazione del potere fermentativo e della velocità di fermentazione

Nelle condizioni testate, VIN13 ed EC1118 hanno mostrato le migliori prestazioni raggiungendo un potere fermentativo (FP) superiore al 14,0% v/v di etanolo. Sono stati seguiti da Pe1 con una velocità di fermentazione (FV) del 13,8% v/v, OKAY (13,0% v/v) e G4 (12,2% v/v) con quantità di zuccheri residui variabili. Per quanto riguarda alla

valutazione di FV, le migliori prestazioni sono state raggiunte da Pe1 (4,5 g nei primi tre giorni di fermentazione) seguito da VIN13 (4,0 g) e dagli altri ceppi che hanno mostrato FV inferiore. Inoltre, la Figura 6 mostra la cinetica di fermentazione inferiore della varietà G4 in confronto con gli altri ceppi testati, mentre Pe1 ha presentato un comportamento intermedio tra i ceppi commerciali di *S. cerevisiae*.

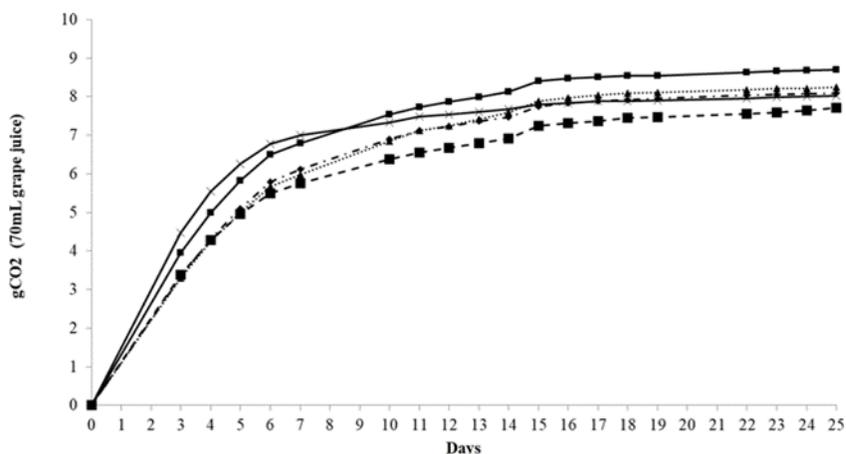


Figura 6. Fermentation power (FP) of wines: OKAY (-♦-); VIN13 (-◻-); EC1118 (—◻—); Pe1 (•••▲•••); and G4 (—×—).

4.3 Prove di micro-fermentazioni eseguite a 16°C e a 22°C

I risultati della cinetica di fermentazione delle microfermentazioni effettuate a 16°C e 22°C sono riportati in Figura 7. I dati delle prove di fermentazione condotte a 22°C hanno mostrato risultati comparabili cinetica di fermentazione tra tutti i ceppi di *S. cerevisiae* testati, evidenziando differenze tra i ceppi indigeni e commerciali. Solo Pe1, dopo 16 giorni di fermentazione, si è dimostrato più elevato cinetica di fermentazione rispetto agli altri ceppi.

Le fermentazioni effettuate a 16°C hanno mostrato una cinetica di fermentazione più lenta rispetto a gli stessi percorsi effettuati a 22°C senza differenze rilevanti tra i ceppi testati

(31 giorni invece 22 giorni a 22°C). Tuttavia, OKAY ha mostrato una cinetica di fermentazione più lenta rispetto alle altre varietà. Pertanto, in entrambe le condizioni di fermentazione, i due ceppi indigeni hanno esibito una cinetica comparabile a quella mostrata dai ceppi di avviamento commerciali di *S. cerevisiae*.

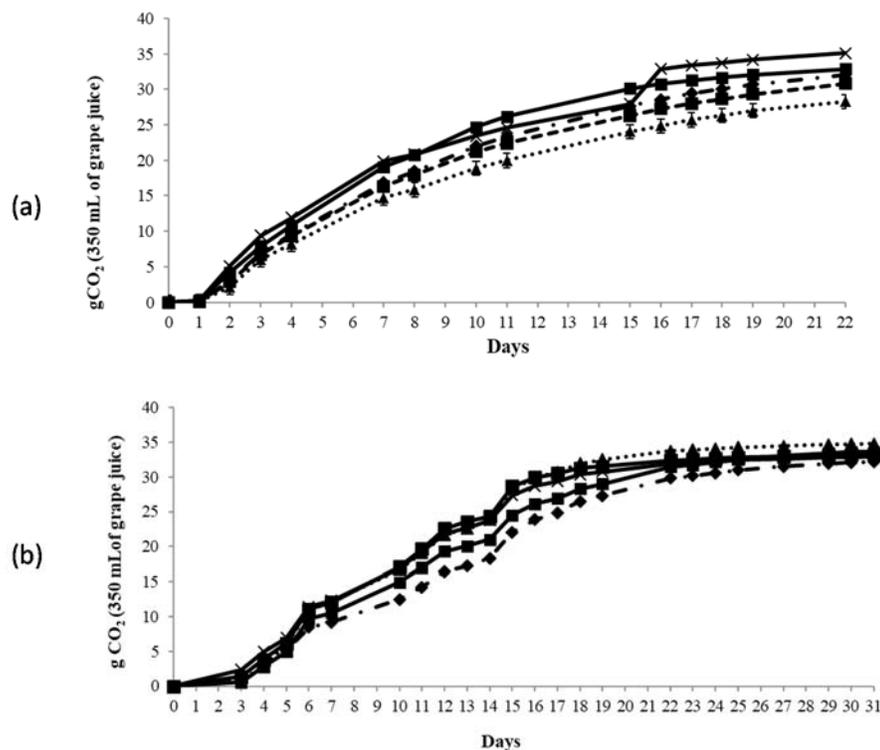


Figure 7. Fermentation kinetics of wines at two different temperature: (a) 22 °C; and (b) 16 °C (OKAY (---◇---); VIN13 (—■—); EC1118 (·····▲·····); Pe1 (—×—); and G4 (—●—)).

4.4 Principali caratteristiche analitiche

Per valutare le principali caratteristiche analitiche, sono state effettuate due serie di prove di microfermentazione a 16 e 22°C con succo d'uva naturale di Verdicchio. Tre varietà commerciali, OKAY, EC1118 e VIN13, ampiamente utilizzate nella fermentazione dei vini Piceno DOCG, sono stati scelti come controlli. I risultati ottenuti indicano che i principali composti analitici non mostravano generalmente differenze rilevanti tra i ceppi. Solo il ceppo G4 ha mostrato un leggero aumento di acidità volatile (0,64 g/L a 22°C) mentre

entrambi i lieviti indigeni hanno mostrato un aumento significativo della produzione di glicerolo a 16°C.

È stata, inoltre, osservata una diminuzione della produzione totale di SO₂ per tutti i ceppi a 22°C.

4.5 Principali composti volatili

La valutazione dei principali composti volatili prodotti dai ceppi di *S. cerevisiae* ha rivelato differenze significative tra le colture di lievito anche fortemente influenzate dalla temperatura di fermentazione. La varietà commerciale OKAY a 22°C ha mostrato una produzione significativamente più elevata di esteri come etil-butirrato, isoamil-acetato, fenil-etil acetato e alcoli superiori come n-propanolo e β-fenil etanolo. A 22°C, le prove di fermentazione di Pe1 e G4 sono state caratterizzate da elevate quantità di isoamil acetato e in generale di esteri etilici (etil esanoato e ottanoato di etile). Gli altri ceppi hanno mostrato una produzione intermedia di esteri. Il ceppo EC1118 era caratterizzato da un'alta produzione di acetaldeide, isobutanolo, amil e alcoli isoamilici ad entrambe le temperature di fermentazione (22°C e 16°C). Inoltre, a 16°C, EC1118 ha mostrato un miglioramento rilevante e generalizzato degli esteri. Nelle microfermentazioni effettuate a 16°C, sono state riscontrate alcune differenze negli esteri e negli alcoli superiori. Con l'eccezione di OKAY, i ceppi hanno mostrato un generalizzato aumento degli esteri a temperature più basse. Tuttavia, nei ceppi indigeni Pe1 e G4, c'era una riduzione dell'isoamil acetato e un significativo potenziamento del fenil etil acetato. Di particolare rilevanza è stata l'elevata produzione di acetaldeide a entrambe le temperature testate da EC1118 che potrebbero influire negativamente sul profilo analitico dei vini bianchi. I dati sui composti volatili sono stati sottoposti all'analisi delle componenti principali (PCA) (Figura 8). La distribuzione delle deformazioni nella grafica del biplot ha evidenziato due effetti principali:

1. PC2 ha raggruppato i ceppi in funzione della temperatura di fermentazione che separa le prove a 16°C (quadranti superiori) dalle prove a 22°C (quadranti inferiori). Solo Pe1 è stato posizionato vicino al centro.

2. PC1 ha differenziato i ceppi in funzione dei composti volatili testati.

A 22°C, varietà autoctone sono state separate dagli altri ceppi principalmente per la produzione di isoamil acetato. A 16°C, tutti i ceppi sono stati separati per esanoato di etile ad eccezione del ceppo Pe1

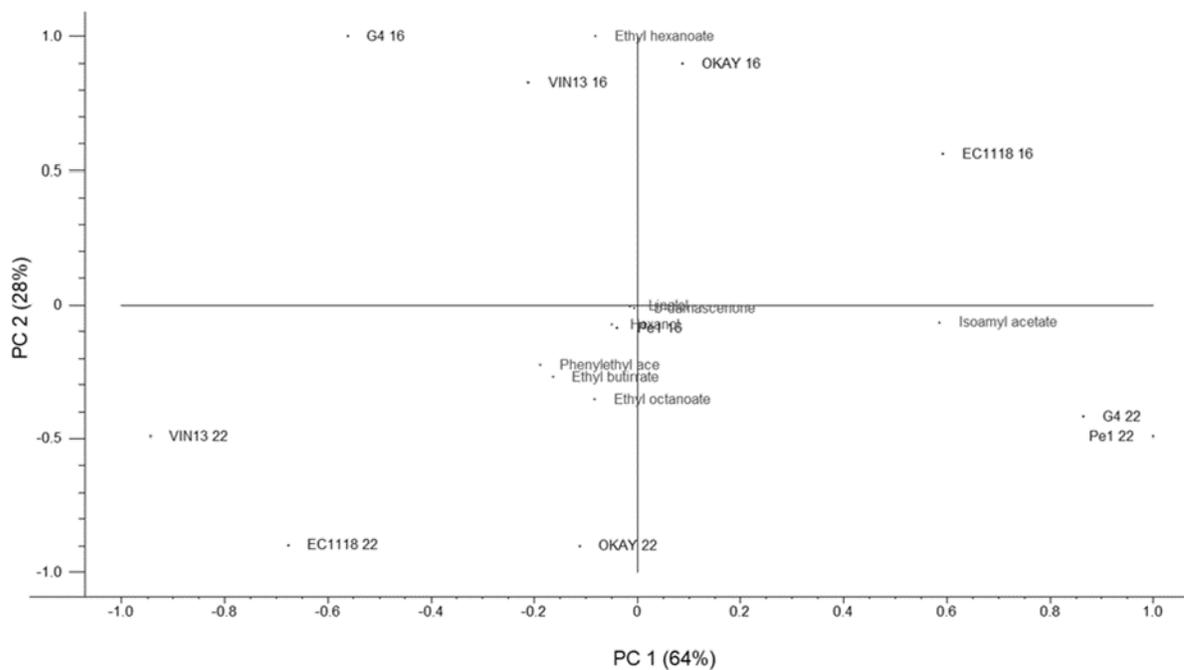


Figure 8. Analisi dei componenti principali basata sui dati per i composti volatili nei vini prodotti da diversi ceppi di *S. cerevisiae*. I numeri 16 e 22 associati a ciascun ceppo si riferiscono alla temperatura di fermentazione (16°C e 22°C).

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

In questo lavoro sperimentale, sono stati scelti due ceppi di lievito appartenenti alla *specie S. cerevisiae* autoctoni, Pe1 e G4, che non differivano significativamente dai ceppi commerciali relativamente alle principali caratteristiche analitiche dal confronto con. Tuttavia, essendo questi strettamente correlati col territorio in quanto precedentemente isolati nei vigneti originali, si è voluto indagare per tipizzare i ceppi e caratterizzarli anche da un punto di vista fisiologico. A tale proposito, i risultati ottenuti hanno mostrato una specifica impronta aromatica conferita dai ceppi autoctoni ai vini finiti, se confrontati con quelli ottenuti da starters commerciali convenzionali.

Nello specifico, è stato dimostrato che la temperatura di fermentazione gioca un ruolo importante sul vino finale. In effetti, un aumento di alcuni composti volatili, come isoamil acetato, etil esanoato ed etil ottanoato, è stato mostrato dai due ceppi indigeni in microfermentazioni effettuate a 22°C. Analogamente, è stata riscontrata, in confronto con prove di fermentazione a 16°C, una riduzione della produzione totale di SO₂ a 22°C senza differenze significative tra i due ceppi indigeni e i ceppi starter. In conclusione, il presente lavoro sottolinea il potenziale uso di *S. cerevisiae* autoctono selezionato per la fermentazione dei vini Piceno DOC. In particolare, questi ceppi selezionati (Pe1 e G4) potrebbero essere utilizzati come modalità atta ad esaltare la complessità aromatica dei vini Piceno DOC.

CAPITULO 6: BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Pérez, J.M.; Campo, E.; San-Juan, F.; Coque, J.J.R.; Ferreira, V.; Hernández-Orte, P. Sensory and chemical characterization of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chem.* 2012, 133, 284–292. [CrossRef] [PubMed]
- Amerine, M.A. e Kunkee R.E. (1968) *Microbiology of winemaking*.
- *Annu Rev Microbiol.*, 22: 323-358.
- Antonelli, A., Castellari L., Zambonelli C., Carnicini A. (1999) Yeast Influence on volatile composition of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1139-1141.
- Bauer F.F, Pretorius I.S (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.
- Bokulich, N.A.; Lewis, Z.T.; Boundy-Mills, K.; Mills, D.A. A new perspective on microbial landscapes within food production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016, 37, 182–189. [CrossRef] [PubMed]
- Bokulich, N.A.; Thorngate, J.H.; Richardson, P.M.; Mills, D.A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 139–148. [CrossRef] [PubMed]
- Cabrera M. J, Moreno J, Ortga J.M, Medina M (1988) Fermentation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 283-289.
- Callejon, R.M.; Clavijo, A.; Ortigueira, P.; Troncoso, A.M.; Paneque, P.; Morales, M.L. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chim. Acta* 2010, 660, 68–75. [CrossRef] [PubMed]

- Canonico, L.; Comitini, F.; Ciani, M. Influence of vintage and selected starter on *Torulaspora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* sequential fermentation. Eur. Food Res. Technol. 2015, 241, 827–833. [CrossRef]
- Capece, A.; Granchi, L.; Guerrini, S.; Mangani, S.; Romaniello, R.; Vincenzini, M.; Romano, P. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions. Front. Microbiol. 2016, 7, 1018. [CrossRef] [PubMed]
- Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. Microbiol. Res. 2015, 181, 75–83. [CrossRef] [PubMed] Fermentation 2018, 4, 37 10 of 11
- Castelli T (1954) Les agents de la fermentation vinaire. Arch. Mikrobiol 23: 323-342.
- Ciani M & Comitini F (2006) Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behavior of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. World J Microbiol Biotechnol 22: 619–623.
- Ciani M & Comitini F (2011) Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. Ann Microbiol 61:25-32.
- Ciani M & Picciotti G (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Biotechnology Letters, Vol. 17, 11, 1247-1250.
- Ciani M & Rosini G (1993) Vinificazioni industriali in 'purezza microbiologica': Partecipazione della coltura starter al processo fermentativo. Industrie delle bevande 22: 202–206.
- Ciani M (1997) Role, enological properties and potential biotechnological use of non- *Saccharomyces* wine yeasts., in "Recent Res. Devel. In Microbiology" Eds. S.G. Pandalai, 1:317-331. Research Signpost, Trivandrum, India.

- Ciani M, Beco L, Comitini F (2006) Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol*, 108: 239– 245.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *Federation of European Microbiological Societies*. 10:123-133.
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. 2011 Aug; 28 (5):873-82.
- Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. 2011, 28, 873– 888. [CrossRef] [PubMed]
- Consorziovinipiceni. Available online: <http://www.conorziovinipiceni.com> (accessed on 8 February 2018).
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke P.A, Chambers P.J, Curtin C, Varela C (2014) Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80:1670–1678.
- Cordero-Bueso, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Gil-Díaz, M.; García, M.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation* 2016, 2, 7. [CrossRef]
- Degre R (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), pp. 421–448. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

- Dukes BC & Butzke CE (1998) Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am J Enol Vitic*, 49, 125-134.
- Dukes, B.C.; Butzke, C.E. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/Nacetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 1998, 49, 125–134.
- EEC. Council Regulation 2870/00 laying down Community reference methods for the analysis of spirit drinks. *Off. J. Eur. Comm.* 2000, L333, 20–46.
- Erten H & Campbell I (2001) The production of low-alcohol wines by aerobic yeasts. *J Inst Brew* 107:207-215.
- Fauster A (2001) Les polysaccharides, leur contribution à la qualité du vin. *Rev.Fr. Oenol.*187.
- Fleet G.H & Heard G.M (1993) Yeast-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic: Reading; 27-54.
- Fleet G.H (2003) Yeast interactions and wines flavor. *Int J.Food Microbiol*, 86:11-22.
- Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res* 8: 979–995.
- Gayevskiy, V.; Goddard, M.R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J.* 2012, 6, 1281. [CrossRef] [PubMed]
- Giudici P, Romano P, Zambonelli C (1990) A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.*, 36:6-7.
- Gonzalez R, Quiròs M, Morales P (2013) Yeast respiration of sugar by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci. Technol.* 29:243-257.

- Herraiz T, Regiero G, Herraiz M, Martin-Alvarez P.J, Cabezudo M (1990) The influence of yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am.J.Enol.Vitic.* 41, 313-318.
- Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 2014, 14, 215–237. [CrossRef] [PubMed]
- Knight, S.; Goddard, M.R. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. *ISME J.* 2015, 9, 361–370. [CrossRef] [PubMed]
- Knight, S.; Klaere, S.; Fedrizzi, B.; Goddard, M.R. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci. Rep.* 2015, 5, 14233. [CrossRef] [PubMed]
- Legras, J.L.; Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS microbiol. Lett.* 2003, 221, 249–255. [CrossRef]
- Lopandic, K.; Gangl, H.; Wallner, E.; Tscheik, G.; Leitner, G.; Querol, A.; Borth, N.; Breitenbach, M.; Prillinger, H.; Tiefenbrunner, W. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* 2007, 7, 953–965. [CrossRef] [PubMed]
- Milanović, V.; Comitini, F.; Ciani, M. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 161, 240–246. [CrossRef] [PubMed]
- Molina, A.M.; Swiegers, J.H.; Varela, C.; Pretorius, I.S.; Agosin, E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile

- aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 77, 675–687. [CrossRef] [PubMed]
- Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 411. [CrossRef] [PubMed]
 - Schüller, D.; Casal, M. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007, 91, 137–150. [CrossRef] [PubMed]
 - Schüller, D.; Casal, M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biot.* 2005, 68, 292–304. [CrossRef] [PubMed]
 - Suzzi, G.; Arfelli, G.; Schirone, M.; Corsetti, A.; Perpetuini, G.; Tofalo, R. Effect of grape indigenous *Saccharomyces*
 - Taylor, J.W.; Turner, E.; Townsend, J.P.; Dettman, J.R.; Jacobson, D. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: Examples from the Kingdom Fungi. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2006, 361, 1947–1963. [CrossRef] [PubMed]
 - Taylor, M.W.; Tsai, P.; Anfang, N.; Ross, H.A.; Goddard, M.R. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol.* 2014, 16, 2848–2858. [CrossRef] [PubMed] *Fermentation* 2018, 4, 37
11 of 11
 - Tofalo, R.; Perpetuini, G.; Fasoli, G.; Schirone, M.; Corsetti, A.; Suzzi, G. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8 S-ITS restriction patterns. *Food Microbiol.* 2014, 39, 7–12. [CrossRef] [PubMed]

- Torija, M.J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamo, J.M.; Mas, A.; Roze, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 85, 127–136. [CrossRef]
- Torrens, J.; Urpí, P.; Riu-Aumatell, M.; Vichi, S.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 124, 48–57. [CrossRef] [PubMed]
- Valero, A.; Marín, S.; Rarnos, A.J.; Sanchis, V. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, 41, 196–201. [CrossRef] [PubMed]
- Vigentini, I.; Barrera Cardenas, S.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C.A.; Picozzi, C.; Foschino, R. Use of native yeast strains for in-bottle fermentation to face the uniformity in sparkling wine production. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1225. [CrossRef] [PubMed]
- Vigentini, I.; De Lorenzis, G.; Fabrizio, V.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C.A.; Foschino, R. The vintage effect overcomes the terroir effect: A three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology* 2015, 161, 362–373. [CrossRef] [PubMed]