



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in**

**Biologia Molecolare e Applicata**

***Monitoraggio di fermentazioni miste condotte in laboratorio e in cantina***

*Monitoring of mixed fermentation in laboratory and in winery*

Relatore:

Tesi di laurea magistrale di:

Chiar.mo Prof. Maurizio Ciani

Martina Bove

Correlatrice :

Dott.ssa Laura Canonico

**Sessione autunnale**

**Anno Accademico 2021/2022**

*Al mio girasole,*

*che la tua luce possa sempre indicarmi la strada...*

# INDICE

## CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Processo di vinificazione                                  | 1  |
| 1.2. Biochimica della fermentazione alcolica                    | 2  |
| 1.3. Fermentazione spontanea                                    | 5  |
| 1.4. Fermentazione controllata                                  | 7  |
| 1.5. Fermentazione mista  | 9  |
| 1.6. Monitoraggio di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in cantina | 11 |
| 1.7. Aspetto microbiologico della fermentazione                 | 14 |
| 1.7.1 Specie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                    | 16 |
| 1.7.2. Specie <i>Torulaspota delbrueckii</i>                    | 19 |
| 1.7.3. Specie <i>Metschnikowia pulcherrima</i>                  | 21 |
| 1.8. Prodotti secondari di fermentazione                        | 22 |

## CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO 26

## CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI 28

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Allestimento delle prove sperimentali              | 28 |
| 3.1.1. Allestimento microvinificazioni in coltura mista |    |
| 3.2. Terreni di coltura                                 | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3. Analisi microbiologiche  | 35 |
| 3.4. Analisi dei composti volatili  | 36 |
| 3.5. Identificazione e caratterizzazione molecolare                                   | 39 |
| <b>CAPITOLO 4: RISULTATI</b>  | 41 |
| 4.1. Evoluzione della cinetica fermentativa   | 41 |
| 4.2. Evoluzione della popolazione microbica   |    |
| 4.3. Analisi della produzione di composti volatili                                    | 46 |
| 4.3.1. Evoluzione dei principali composti volatili al secondo giorno di fermentazione | 46 |
| 4.3.2. Evoluzione dei principali composti volatili a fine fermentazione               | 56 |
| 4.4. Identificazione molecolare dei lieviti isolati in cantina                        | 68 |
| <b>CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b>  | 74 |
| <b>CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA</b>   | 81 |
| <b>Ringraziamenti</b>   |    |





## **CAPITOLO 1: INTRODUZIONE**

### ***1.1. Processo di vinificazione***

La vinificazione è il processo che permette la trasformazione del mosto in vino e comprende tutte le fasi di lavorazione successive alla vendemmia fino all'ottenimento del vino da immettere nel mercato. Ciascuna di queste fasi è caratterizzata da diverse scelte tecniche che permettono di ottenere il prodotto finale nei limiti imposti dalla tipologia di vino desiderato.

La prima fase è la vendemmia, ovvero la raccolta del frutto che richiede che l'uva sia perfettamente matura ed abbia raggiunto la desiderata concentrazione di zuccheri e composti secondari, quali acidi e aromi; seguirà poi il trasporto in cantina, un momento particolarmente delicato, in quanto è necessario che avvenga nel più breve tempo possibile, al fine di evitare che la fermentazione inizi in modo non controllato a seguito della fuoriuscita dei succhi (Sicheri, 1998). Una volta che l'uva è stata trasportata in cantina avverrà la pigiatura: ovvero la rottura degli acini in seguito a compressione dei grappoli, questo ha come risultato il deflusso del mosto. A differenza del passato, dove questa operazione veniva effettuata semplicemente tramite pigiatura dell'uva con i piedi, ad oggi questo compito spetta ad apposite macchine chiamate 'pigiatrici', alcune delle quali possono, contemporaneamente, attuare il processo

successivo ovvero la diraspatura: questo è un passaggio fondamentale e di cui sono stati evidenziati i numerosi vantaggi. La presenza di raspi permette infatti una fermentazione più veloce, non solo perché aumenta l'aerazione e la regolazione termica dei mosti ma anche perché i raspi assorbono gli antociani, responsabili del colore finale del vino e, in più permettono il rilascio di polifenoli e composti secondari che modificano le qualità organolettiche del prodotto finale (Ribereau-Gayon et al, 2006)

### ***1.2. Biochimica della Fermentazione alcolica***

Il semplice processo biochimico di conversione del mosto d' uva in vino fu descritto da Louis Pasteur nel 1872 come un processo attraverso il quale i lieviti fermentano spontaneamente gli zuccheri dell' uva a etanolo, anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) ed altri metaboliti. La biochimica di questa reazione, in generale, prevede in prima istanza che il lievito scinda, tramite l'enzima invertasi, gli zuccheri complessi come il saccarosio. Successivamente, a partire dagli zuccheri semplici, come il fruttosio, si avrà la formazione di etanolo. In particolare, nel citoplasma si verificherà la glicolisi a partire dal glucosio che, tramite de fosforilazione per mezzo di due molecole di ATP, verrà scisso in 2 molecole di acido piruvico. A questo punto, l'anaerobiosi impedirà il naturale processo di respirazione, favorendo il processo fermentativo, ovvero, l'acido piruvico, privato di una molecola di anidride carbonica formerà come intermedio



l'aldeide acetica, particolarmente tossica e reattiva. Quest'ultima verrà ridotta liberando  $\text{NAD}^+$ , formando come sottoprodotto l'etanolo (Moschetti et al, 2013)

La formula generale è stata descritta dal chimico-fisico francese Joseph Louis Gay-Lussac:



Gli studi successivi hanno evidenziato che, in realtà, si tratta di un processo molto più complesso, che dipende da diversi fattori (Bleve et al, 2018). La composizione del mosto è uno di questi, in particolare, il contenuto zuccherino dipende dal livello di maturazione delle uve; per esempio, vini Chardonnay e Pinot bianco sono classificati come varietà ad alto contenuto di fruttosio ed essendo glucosio e fruttosio zuccheri fermentabili, il contenuto di zucchero sarà strettamente correlato alla quantità di alcol. Quindi, ne deriva che, controllando la quantità di zucchero nel mosto, si può controllare la quantità di alcol nel vino risultante (Dharmadhikari, 1994). Un altro fattore da tenere in considerazione riguarda le condizioni ambientali nelle quali i lieviti operano. È infatti necessario evitare temperature estreme, in quanto i lieviti risultano molto sensibili agli sbalzi termici: una temperatura troppo bassa all'inizio del processo può portare a una popolazione di lievito carente. Se invece la temperatura è troppo alta (più di  $30^\circ\text{C}$ ) la fermentazione è a forte rischio di arresto (Zamora,

2009). In ultima analisi, è bene fare un focus sul contributo dei lieviti sul sapore del vino, altro fattore da tenere in considerazione per avere una più ampia visione del funzionamento del processo fermentativo. Questo è dovuto principalmente al metabolismo delle cellule di lievito che possiedono un pathway enzimatico molto vasto. Questi microrganismi secernono naturalmente diversi enzimi (esterasi, glicosidasi, lipasi, B glucosidasi, proteasi, cellulasi ecc.) nello spazio periplasmatico e nel mezzo. Qui, interagendo con i composti dell'uva e del mosto, producono i principali composti aromatici attivi quali esteri, acidi grassi, esteri di acidi grassi e alcoli superiori, responsabili delle particolarità varietali del vino (Larnbrechts et al, 2000). Per esempio, è stato studiato il ruolo svolto dagli esteri etilici degli acidi grassi e dagli acetati degli alcoli superiori sull'aroma dei vini giovani. Nei vini bianchi il loro ruolo principale era quello di creare l'aroma dei frutti d'albero legato ad esteri etilici e delle note di frutta tropicale legate alla produzione di acetati di alcoli superiori. Nei vini rossi, questi composti non determinano l'intensità degli aromi di frutta e svolgono solo un ruolo modulante sulla qualità aromatica (Ferreira et al, 1995). In conclusione, quindi, si può affermare che, il controllo del metabolismo associato ai lieviti coinvolti nel processo fermentativo, può avere un effetto significativo e favorevole sullo sviluppo

dell'aroma e può quindi essere uno strumento utile nella gestione della fermentazione (Larnbrechts et al, 2000).

### ***1.3. Fermentazione spontanea***

Questo tipo di fermentazione è a carico dei cosiddetti lieviti indigeni, naturalmente presenti nell'uva, nel mosto e si ha un loro susseguirsi durante il processo fermentativo; in primis, i principali lieviti presenti nei mosti sono di forma apiculata, come *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera*) che domina le primissime fasi della fermentazione, mentre in un secondo momento prendono il sopravvento cellule di forma ovale, ellittica o allungata portando a termine la fermentazione (Chen et al, 2022). Il problema principale della fermentazione spontanea è legato proprio al suo aspetto microbiologico. Infatti, l'utilizzo dei microrganismi naturalmente presenti nell'ambiente ha portato a fermentazioni lente, incontrollate e con arresti di fermentazione. La spiegazione risiede nel fatto che, sebbene questi lieviti siano vigorosi, tendono ad avere poca tolleranza per l'etanolo, molte volte non sopravvivendo a 3 al 4% (vol/vol) (Graham, 2008). I lieviti indigeni sono considerati 'spoilage' perché spesso isolati da vini con anomalie analitiche e sensoriali. Di fatti, è stato dimostrato che fermentazioni in coltura pura di lieviti indigeni portano spesso alla produzione

di diversi metaboliti negativi e caratteristiche fermentative che generalmente ne escludono l'uso come colture starter. I principali prodotti secondari di fermentazione sono acido acetico, acetaldeide, acetoino e acetato di etile, responsabili di profili sensoriali sgradevoli o i fenoli vinilici ed etilici che sono legati allo sviluppo di specie contaminanti come *Brettanomyces/Dekkera*.(Ciani et al, 2009). Per questo motivo, nella moderna industria vinicola, si preferisce utilizzare ceppi selezionati di *S. cerevisiae* , per utilizzarli come colture starter al fine di ottenere un prodotto prevedibile qualitativamente e facilmente riproducibile, specialmente per le grandi produzioni. Tuttavia, molti viticoltori preferiscono ancora la produzione tramite fermentazione spontanea in quanto i lieviti coinvolti svolgono un ruolo importante nella formazione dell'aroma del vino. Per esempio, proprio *H. uvarum* che domina le prime fasi del processo, produce esteri di acetato, conferendo al vino il tipico aroma floreale. Inoltre, questi microrganismi hanno un grado di adattabilità ambientale che permette di rispettare il 'terroir' dei vini regionali (Chen, 2022). Per questo motivo, le fermentazioni spontanee sono ancora effettuate nella maggior parte delle cantine europee e l'80% dei vini, nel mondo, sono prodotti con questo metodo (Heard, 1999). I produttori di vino infatti, non apprezzano il fatto che i ceppi di vino commerciali, pur essendo numerosi producano vini di qualità media e con profili aromatici semplici e

ordinari, non esaltino i tratti aromatici tipici di specifiche aree geografiche. (Rainieri et al, 2000). In definitiva, una profonda conoscenza della struttura e delle proprietà delle comunità microbiche, in particolare dei microrganismi funzionali responsabili della formazione degli aromi, sarebbe utile per stabilire una relazione diretta tra i microrganismi e la qualità del vino, migliorando così la controllabilità della vinificazione.

#### ***1.4 Fermentazione controllata***

È definito uno dei più importanti progressi tecnologici nella vinificazione e prevede l'inoculo del mosto con colture selezionate di *S. cerevisiae*. L'obiettivo di questo tipo di tecnica è quello di consentire una migliore gestione della fermentazione alcolica, tramite il controllo microbiologico. Si ritiene infatti che, un ceppo selezionato e inoculato di *S. cerevisiae* riesca a dominare il processo di fermentazione, andando a sopprimere tutti i lieviti 'indigeni' non-*Saccharomyces*, ritenuti responsabili prima dell'arresto della fermentazione e poi della produzione di composti indesiderati. (Comitini et al, 2011). La selezione dei lieviti per la vinificazione consiste nell'individuare quelle colture in grado di fermentare efficacemente il succo d'uva e produrre vini di buona qualità e, generalmente, viene effettuata all'interno del genere *Saccharomyces*. Le colture di lievito sono solitamente isolate dal succo d'uva o

dal vino, in quanto i ceppi che crescono in questi substrati sono ben adattati all'ambiente enologico e possono quindi fermentare il succo d'uva in modo molto efficiente. Una volta che i ceppi sono stati isolati, questi vengono caratterizzati dal punto di vista delle caratteristiche enologiche che andranno a influenzare l'efficienza del processo fermentativo; si parla di caratteristiche tecnologiche quali tolleranza all'etanolo, vigore di fermentazione, resistenza a SO<sub>2</sub>, crescita ad alte e basse temperature e caratteristiche qualitative legate alla produzione di composti secondari. I caratteri enologici possono essere valutati effettuando fermentazioni su piccola scala in mezzi sintetici ed eventualmente in mosto d'uva.

I caratteri tecnologici possono essere valutati monitorando l'andamento della fermentazione; i tratti quantitativi possono essere valutati determinando la concentrazione dei composti presenti nel vino post-fermentativo. È quindi possibile effettuare fermentazioni su larga scala combinando le caratteristiche dei diversi lieviti per ottenere uno starter desiderato da cui partire per un buon controllo del processo fermentativo(Rainieri et al, 2000).

L'utilizzo di *S. cerevisiae* come starter è la pratica più diffusa in enologia. Tuttavia, l'inoculo dei mosti utilizzando questi lieviti selezionati non assicura il loro predominio a fine fermentazione. Infatti, sebbene possiedano un'elevata capacità di dominare il processo fermentativo, i ceppi commerciali non

inibiscono completamente i ceppi selvatici. La cultura iniziale dovrebbe competere non solo con i lieviti indigeni, ma anche con ceppi autoctoni di *S. cerevisiae*, che teoricamente si adattano meglio alle condizioni del mosto competendo con i lieviti commerciali per tutti i fattori biotici e abiotici presenti (Ciani et al, 2016).

### ***1.5 Fermentazione mista***

Nel processo di vinificazione la tipologia di aroma è dettata prevalentemente dai lieviti coinvolti. Oltre al *S. cerevisiae*, sono però i lieviti indigeni a donare peculiarità al profilo aromatico, nonostante non abbiano un buon potere fermentativo. Per questo motivo, l'attuale tendenza nel settore del vino è lo sviluppo di nuove tecnologie e l'uso di colture miste o sequenziali di lieviti non-*Saccharomyces* insieme a *S. cerevisiae* che possono contribuire a mettere in risalto le potenzialità di ogni ceppo (Clemente-Jimene et al, 2004).

Seppure i meccanismi relativi alle fermentazioni miste non siano ancora del tutto chiari, quello che desta più curiosità riguarda le interazioni tra i diversi lieviti e, soprattutto, le conseguenze di queste interazioni sul prodotto finale, da diversi punti di vista.

Per esempio, uno degli approcci più studiati è quello che prevede l'inoculo sequenziale di *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae* per ottenere una

disacidificazione biologica del mosto e/o del vino e quindi una riduzione del contenuto di acido malico. In questo processo, *S. cerevisiae* effettua la fermentazione utilizzando quasi tutto lo zucchero a disposizione, mentre le cellule immobilizzate di *S. pombe* metabolizzano l'acido malico. In queste condizioni, gli effetti indesiderati di *S. pombe* sulla qualità del vino sono stati limitati o eliminati. Sono state anche proposte fermentazioni miste per esaltare specifici composti volatili: è stato proposto l'uso di una cultura mista di *Debaryomyces vanriji* e *S. cerevisiae* per aumentare i composti volatili (in particolare il geraniolo) nel vino Moscato. Oltre ad aprire la strada verso nuove tecnologie di fermentazione, l'utilizzo di fermentazioni multistarter ha acceso i riflettori sulla comprensione delle interazioni metaboliche e fisiologiche tra i lieviti stessi: diverse prove hanno infatti dimostrato che quando alcuni lieviti si sviluppano insieme in condizioni di fermentazione, non coesistono passivamente, ma interagiscono e producono composti imprevedibili che possono influenzare la composizione chimica e aromatica dei vini (Ciani et al, 2009).

A riprova di questo, per esempio, sono state messe a confronto fermentazioni pure e miste di *H. uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *S. cerevisiae* e questo ha confermato il miglioramento della produzione di esteri e la riduzione



dell'acetato di etile nelle fermentazioni miste, rispetto alle colture pure (Moreira et al, 2008).

Questo è sicuramente un ambito di studio in continuo sviluppo e aggiornamento che permetterà, una volta compreso appieno, di rivoluzionare l'idea e gli approcci di vinificazione oggi in uso, permettendo così una miglioria generale dei prodotti finali.

### ***1.6 Monitoraggio della microflora in cantina: metodologie e problematiche***

La pratica di inoculare i mosti con lieviti selezionati e quindi ottenere fermentazioni in 'purezza microbiologica' ha sicuramente numerosi vantaggi, riguardanti soprattutto il fatto che il prodotto finale è prevedibile e quindi facilmente riproducibile; d'altro canto, l'utilizzo di colture starter dà luogo a quello che viene definito 'effetto appiattimento' che quindi porta ad avere dei vini con scarsa variabilità e, di conseguenza, particolarità limitata. Proprio per questo motivo, ultimamente si sta cercando di sfruttare la microflora autoctona presente sulle uve ma soprattutto nell'ambiente cantina per produrre vini più caratteristici. Anche questo ha degli svantaggi, primo tra tutti la scarsa riproducibilità del prodotto ma anche l'accumularsi di veri e propri inconvenienti a livello organolettico e chimico che possono influenzare il

corretto svolgimento del processo fermentativo, come per esempio la produzione di metaboliti tossici. Da questo nasce la necessità di monitorare la microflora presente. Prima di procedere con la spiegazione di cosa si intende per monitoraggio in questo senso, è necessaria una premessa sulla definizione di ceppo 'autoctono' si riferisce a quei lieviti che ritroviamo nella specifica nicchia ecologica, la cantina non ai 'serbatoi di biodiversità' quali il mosto, il terreno, la vigna o le uve. Un altro concetto da sottolineare è quello della 'dominanza', infatti un ceppo autoctono, perché possa dare delle caratteristiche ad un vino deve essere in grado non solo di partecipare alla fermentazione ma deve essere il ceppo più adatto alle condizioni della nicchia ecologica e che quindi ha buone capacità di diventare dominante a fine fermentazione. È ovvio che il processo fermentativo è un processo che si divide in diverse fasi, ciascuna delle quali caratterizzata dalla presenza di una o più specie di lievito; quindi, il monitoraggio e quindi le analisi microbiologiche devono avere delle tempistiche accurate, al fine di scegliere il momento adatto (inizio, metà, fine fermentazione) (Tablino, 2011).

Il protagonista del processo fermentativo è sicuramente il *S. cerevisiae* ed è proprio su quest'ultimo che la pratica enologica si è basata per la produzione della maggior parte degli starter commerciali. quello da cui si è partiti per la produzione della maggior parte degli starter commerciali. Tuttavia, i ceppi

commerciali non inibiscono completamente i ceppi selvatici in funzione delle diverse condizioni ambientali, di substrato e microbiologiche (Ciani et al, 2016).

La competizione però non è solo con i lieviti non-*Saccharomyces* ma anche con ceppi di *Saccharomyces* autoctoni che, grazie alle loro caratteristiche intrinseche, si adattano meglio all'ambiente. È quindi importante conoscere i meccanismi alla base delle interazioni tra questi ceppi. Alcuni studi hanno evidenziato che ceppi di *Saccharomyces spp.* possono interagire tra loro metabolicamente. Per esempio, un composto prodotto da uno di questi ceppi potrebbe essere assorbito e utilizzato da altri lieviti presenti. Come conseguenza di questo potrebbe verificarsi la condivisione dei metaboliti. Il grado di competizione tra ceppi è determinato da fattori abiotici come la temperatura, il pH, la quantità di azoto etc. e fattori biotici come, appunto, la competizione tra microrganismi per spazio e nutrienti.

In particolare, studi volti a studiare l'influenza della temperatura sulla fermentazione hanno portato ad affermare che effettivamente molti ceppi risultavano sensibili alla temperatura. Alcuni ceppi di *Saccharomyces spp.* erano predominanti alle basse temperature, mentre altri predominavano a quelle elevate. La normale curva di crescita è stata osservata a 25 e 30°C, mentre a 35°C è stata riscontrata un'elevata mortalità dei lieviti, che potrebbe aver

indotto fermentazioni bloccate per effetto dell'elevato contenuto di zucchero (Ciani et al, 2016). Per quanto riguarda invece i fattori biotici, quello che ha destato parecchio interesse riguarda il contatto cellula-cellula. Gli autori, in questo caso, hanno indagato la competizione interspecifica in co-fermentazione e in fermentazione separata da una membrana ed hanno appurato che l'arresto della crescita era dovuto al contatto cellula-cellula o al contatto con il microambiente; in conclusione, le metodologie di monitoraggio sono diverse e tutte importanti e tutte condividono il fine ultimo che è quello di avere un prodotto finito sicuro e di qualità. Tra queste non è esclusa la ricerca di lieviti diversi da *S. cerevisiae* da utilizzare come starter fermentativi tramite tecnologie che permettano la creazione di ibridi inter e intraspecifici a livello genetico che miscelino caratteri quantitativi e qualitativi delle diverse specie (Giudici et al, 2011).

### ***1.7 Aspetto microbiologico della fermentazione***

Benchè *S. cerevisiae* sia il lievito predominante, esistono molte altre specie non-*Saccharomyces* indigene che partecipano al processo fermentativo e che, con gli anni, hanno acquisito un grande interesse commerciale per le loro

caratteristiche e le attività enzimatiche. In particolare, è stato appurato che questi lieviti sono in grado di secernere enzimi, quali proteasi, esterasi e beta-glucosidasi che influiscono positivamente sul processo fermentativo (Rosi et al,1994). Inoltre, è stato proposto l'utilizzo del metabolismo respiratorio dei lieviti non-*Saccharomyces* come strumento per abbassare i livelli di alcool nella bevanda fermentata. Alcune di queste specie sono di seguito elencate:

- *Hanseniaspora/Kloeckera*
- *Hanseniaspora vlnae*
- *Lachaenacea thermotolerans*
- *Metchnikowia pulcherrima*
- *Metchnikowia fruticola*
- *Pichia kluyverii*
- *Schizosaccharomyces pombe*
- *Candida stellata*
- *Torulasporea delbrueckii*
- *Pichia anomala*
- *Starmerella Bacillaris*
- *Meyerozyma guillermondii*

Andremo di seguito ad analizzare le tre specie di maggiore interesse in ambito vinario: *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima*.

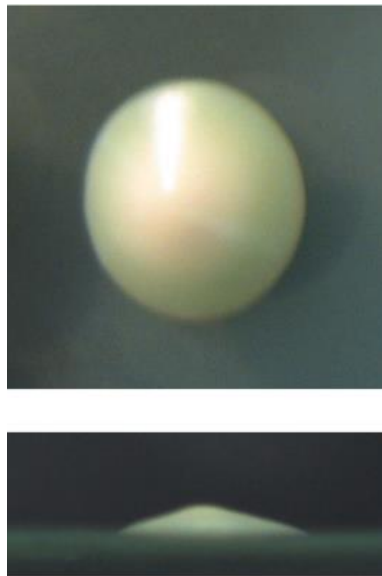
### ***1.7.1. Saccharomyces cerevisiae***



*Fig.1a; cellule di S. cerevisiae al microscopio ottico*

Può essere definito il lievito più importante dal punto di vista enologico, quello che per le sue caratteristiche di vigore fermentativo, di potere alcoligeno, di resistenza agli antisettici, di adattabilità alle più varie condizioni, interviene e

può essere utilizzato in tutte le fasi della vinificazione. Si presenta, al microscopio ottico, in cellule globose, ellittiche o cilindriche (Fig.1a). Le colonie dei lieviti di questa specie si presentano con una colorazione dal crema al verde, la superficie liscia, opaca e una caratteristica umbonatura che ne permette facilmente il riconoscimento (Fig 1b).



*Fig 1b, colonia di S. cerevisiae in terreno WL*

Nella vinificazione mostra le seguenti proprietà:

- Elevato potere alcoligeno

- Elevato potere acidificante: aumento dell'acidità totale da 0,4 a 1,4 g/L
- Produzione di glicerolo molto elevata: fino a 15 g/L (+30 – 40%)
- Bassissima produzione di acidità volatile
- Bassissima produzione di SO<sub>2</sub>
- Tolleranza all'alcol: fino a 15,5% v/v
- Fabbisogno in azoto: molto elevato (necessario un appropriato protocollo nutrizionale)
- Fase stazionaria: prolungata ma costante
- Temperatura ottimale di fermentazione: 24 – 28°C

nella vinificazione in rosso;

16/18°C

nella

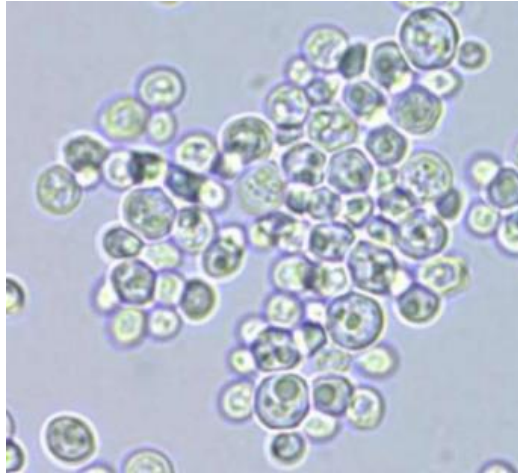
vinificazione

in

bianco o in rosato.



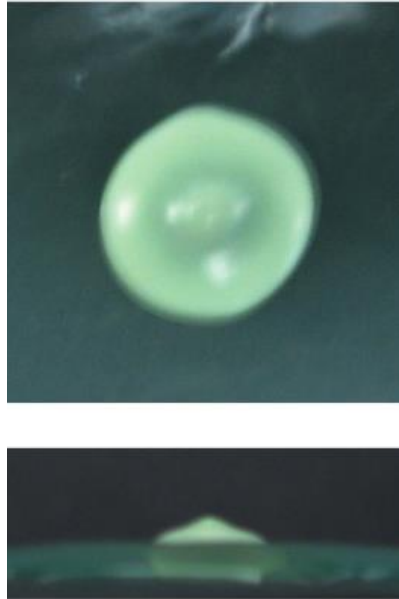
### ***1.7.2. Torulaspora delbrueckii***



*Fig.2a, cellule di T. delbrueckii al microscopio ottico*

Le cellule hanno forma globosa o ellittica (Fig. 2a).

Le colonie di questo lievito sono caratterizzate da una colorazione crema-verde, umbonata, superficie liscia, opaca e consistenza cremosa (Fig.2b).



*Fig. 2b, colonia di T.delbrueckii interrenoWL*

E' dotata, inoltre di ottime caratteristiche enologiche:

- Potere alcoligeno: 9,5 % vol.
- Resistenza SO<sub>2</sub>: bassa
- Produzione H<sub>2</sub>S:bassa
- Produzione acidità volatile: bassissima
- Produzione acetaldeide: assente
- Velocità di fermentazione: media

Rappresenta uno degli agenti naturali della fermentazione vinaria, che riesce a competere con *S. cerevisiae* nel processo.

### 1.7.3. *Metschnikowia pulcherrima*

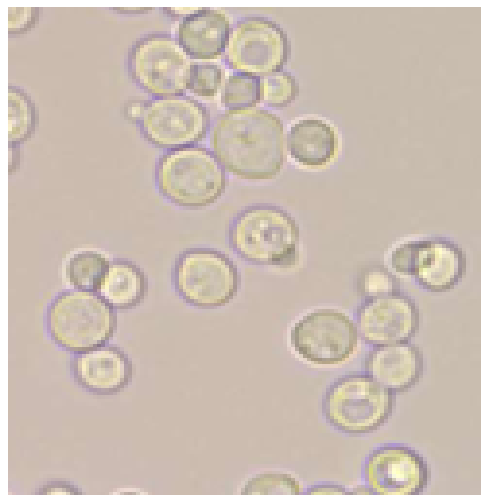


Fig. 3a, cellule di *M. pulcherrima* al microscopio ottico

Presenta cellule globose o ellissoidali (Fig. 3a).

Le colonie di *M. pulcherrima* (Fig. 3b) sono di colore crema e sono caratteristiche di una pigmentazione brunastra generata dalla produzione di un pigmento di color rosso, la *pulcherrimina*, che in genere diffonde nel terreno di coltura. In questo caso non c'è umbonatura ma l'elevatura è convessa. La superficie può presentarsi sia liscia che rugosa e la consistenza è farinosa.



*Fig. 3b colonie di M. pulcherrima*

Questa specie si ritrova sulle uve, specialmente in climi freddo-umidi.

In vinificazione presenta basso potere alcoligeno (3-4° alcolici), capacità di crescere in presenza di elevate concentrazioni zuccherine (50-60% p/v), bassa resistenza alla SO<sub>2</sub>.

### ***1.8. Prodotti secondari della fermentazione***

L'aroma del vino è caratterizzato dalla sua composizione volatile, creata principalmente durante le fasi di fermentazione e fortemente dipendente dalle specie e dai ceppi di lievito coinvolti. Di seguito verranno descritti i principali composti prodotti durante il processo.

### ➤ *Acidi grassi*

Tra gli acidi grassi alifatici l'acido acetico è il più abbondante, tra gli altri si possono annoverare l'acido esanoico, ottanoico e decanoico. Nel gruppo degli acidi grassi insaturi l'acido 9-decenoico è rilevante dal punto di vista aromatico quando trasformato in estere etilico. I lieviti sono i principali produttori di acidi grassi. *S. cerevisiae* è in grado di sintetizzare principalmente acidi esanoico e ottanoico in quantità elevate, ma anche acido pentanoico, decanoico e 3-metilbutanoico. Altre specie non-*Saccharomyces* producono acido acetico. Tuttavia, i non-*Saccharomyces* non presentano una biosintesi ben definita di questi composti, tant'è che vengono preferite fermentazioni miste o sequenziali per regolarne il contenuto in quanto è stato testato che l'eccessiva produzione possa fornire aromi con note di unto, rancido e di formaggio (Carpena et al, 2021).

### ➤ *Alcoli superiori*

Sono il risultato del catabolismo degli amminoacidi mediante un processo noto come reazione di Ehrlich. Influiscono direttamente o indirettamente sulla sintesi dei composti aromatici. I principali alcoli superiori prodotti sono 1-propanolo,

isobutanolo e alcol isoamilico, 2-feniletanolo, tirosolo o triptofolo Altri alcoli superiori sono presenti in quantità inferiori, come 2-metilbutanolo-1, 3-o metil-1-butanolo-1. Concentrazioni moderate di questi composti possono fornire note aromatiche di fiori, miele e frutta. Tuttavia, la maggiore concentrazione di alcol può diventare un parametro negativo che porta alla produzione di aromi pungenti e sgradevoli (Carpena et al, 2021).

### ➤ *Esteri*

Possono essere classificati in esteri di acidi grassi etilici o esteri di acetato. Nella prima categoria, l'etil esanoato, l'etil ottanoato e l'etil decanoato sono i più abbondanti. I principali esteri dell'acetato sono acetato di isobutile, acetato di amile, acetato di esile, acetato di etile, acetato di isoamile e 2-feniletile acetato. I principali esteri etilici degli acidi grassi includono etil butanoato, caproato, caprilato, caprato e laurato. La loro formazione dipende dalla selezione delle specie di lievito e altri parametri di fermentazione come le basse temperature. In generale, gli esteri hanno effetti positivi sull'aroma dei vini conferendo un aroma fruttato, di banana o mela e miele ma anche toni floreali. Tuttavia, come nel caso di alcoli superiori, quantità eccessive di esteri possono apportare effetti negativi sulla qualità del vino. Un'elevata concentrazione di esteri può

nascondere gli aromi varietali e semplificare l'aroma o rovinare il vino se superano determinate concentrazioni (Carpena et al, 2021).

### ➤ **Fenoli**

I composti terpenici maggiormente prodotti dalla fermentazione sono: *Linalolo*, *Citronellolo*, *trans-Geraniolo* ed *alfa-Terpineolo*. In generale contribuiscono a definire le caratteristiche organolettiche dei vini come colore, aroma e astringenza (Carpena et al, 2021).

Donano al vino un aroma gradevole, floreale, fruttato e moscato. Le loro concentrazioni nell'uva e nel vino dipendono da vari fattori, tra cui cultivar, regione e tecniche di vinificazione. Alcuni possono avere un effetto negativo sulla qualità del vino come per esempio quelli sintetizzati dai lieviti *Streptomyces* sulle botti che possono pregiudicare la qualità sensoriale del vino dando il tipico sentore di sughero (Baron et al, 2017). I fenoli non volatili che contribuiscono con aromi sgradevoli come farmacia, fumo, bosco, cuoio o pepe, possono essere trasformati chimicamente in volatili piacevoli, come quelli legati alla vanillina, alla metil vanillina o all'alcol omovainilico.

## CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO

La fermentazione è una via catabolica attuata da diversi microrganismi, tra cui i lieviti, finalizzata allo sfruttamento dei substrati carboniosi quali zuccheri, come fonte energetica. Da tempo, l'uomo utilizza i lieviti per produrre diversi prodotti, tra cui il vino. Il lievito sicuramente più conosciuto in questo senso è *S. cerevisiae*, definito per questo lievito convenzionale. Tuttavia, numerose evidenze scientifiche stanno attribuendo sempre più valore a lieviti non convenzionali, i cosiddetti non-*Saccharomyces*, come *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima*. Questi hanno attirato l'attenzione dei produttori di vino perché responsabili, grazie al loro metabolismo fermentativo e alle loro attività enzimatiche, della sintesi di una vasta gamma di composti aromatici che ampliano il bouquet sensoriale della bevanda contrastandone la ridotta complessità dovuta sola presenza del classico *S. cerevisiae*. Con il presente lavoro di tesi si è voluto affinare le conoscenze sulle interazioni tra colture di lieviti in colture miste non-*Saccharomyces/S. cerevisiae* al fine di caratterizzare e migliorare il processo di vinificazione sequenziale sia dal punto di vista microbiologico che analitico

Un altro obiettivo che si pone il presente lavoro di tesi è quello di andare a indagare le problematiche microbiologiche di processi fermentativi



multistarter condotti in cantina, habitat naturale di tali microrganismi, dove il controllo microbiologico è diverso dalle prove condotte in laboratorio e la fermentazione avviene in condizioni prevalentemente di sterilità o di maggiore controllo di processo. Si è cercato di confrontare le due diverse condizioni di processo al fine di individuare la eventuale presenza di contaminazioni microbiologiche presenti naturalmente in cantina. Il controllo microbiologico è stato condotto tramite identificazione molecolare, dei ceppi di *S. cerevisiae* da campioni di fermentazioni industriali condotte in cantina.

## **CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI**

### ***3.1. Allestimento delle prove sperimentali***

Sono state allestite tre prove (A,B,C) che prevedevano la fermentazione sequenziale, in succo d'uva commerciale rosso standard (*Quargentain*), con ceppi commerciali di lieviti secchi *non-Saccharomyces* e *S.cerevisiae* . La prova è stata allestita al fine di portare a termine una fermentazione in un ambiente controllato e prevalentemente sterile, quale il laboratorio. I lieviti utilizzati ,in particolare sono:

- 2 ceppi *non-Saccharomyces*: *T. delbrueckii* (TD) e *M. pulcherrima* (MP)
- 1 ceppo di *S. cerevisiae* (SC)

### ***3.2. Allestimento microvinificazioni in coltura mista***

Sotto cappa a flusso laminare, è stato unito in un unico contenitore 3,5 L del succo d'uva commerciale a cui è stato aggiunta una quantità di 60g/L di zucchero d'uva (*Naturalia*) pari a 210 g in totale. Il composto è stato poi mescolato per permettere la corretta solubilizzazione.

Una quantità pari a 350 mL del substrato ottenuto è stato riposta in beute da 500mL così da procedere con l'inoculo dei lieviti, dopo opportuna reidratazione che è avvenuta come segue:

- 1 g di ogni ceppo LSA (lievito secco attivo) è stato aggiunto a 100mL di soluzione di saccarosio al 5% in acqua a temperatura di 36°C in sterilità;
- il composto è stato lasciato omogeneizzare con un agitatore magnetico per 10 minuti e, in agitazione, sono stati prelevati 2mL per l'inoculo in ciascuna delle beute contenenti il substrato.

Le beute sono state inoculate con i 2mL di sospensione di ciascun ceppo. In particolare

- 2mL sospensione di TD in ognuna delle 3 beute per prova A (Fig. 4a)
- 2mL sospensione MP in ognuna delle 3 beute per prova B(Fig. 4b)
- 2mL sospensione SC in ognuna delle 3 beute per prova C(Fig. 4c)

Le beute così inoculate sono state chiuse tramite Valvole di Muller contenenti Acido Solforico al 10% , per mantenere la sterilità ed evitare l'evaporazione e poste in incubazione (Fig. 4d) a temperatura controllata di 22°C in condizioni statiche fino alla fine della fermentazione, prevista in 18 giorni.



*Fig. 4a PROVA A*



*Fig. 4b PROVA B*



*Fig. 4c PROVA C*



*Fig.4d beute in incubatrice a 22°C*

Prima di iniziare le prove è stato effettuato l'isolamento sia dello zucchero *Naturalia*, sia del Substrato dopo l'aggiunta dello zucchero, per scongiurare qualsiasi contaminazione.

Successivamente si è passato all'isolamento delle 9 beute ai diversi tempi T

- T0: isolamento delle 9 beute subito dopo l'inoculo dei ceppi;  
dopo 48h
- T2a: isolamento delle 6 beute con TD e MP (prima dell'inoculo di SC)
- T2b: isolamento delle 6 beute con TD e MP (dopo inoculo di SC)
- T2s: isolamento delle 3 beute contenenti solo SC
- Poi gli isolamenti sono stati effettuati ai tempi T4(4 giorni), T7(7 giorni), T10(10 giorni), T15(15 giorni), TF (18 giorni, fine fermentazione)

Per tutta la durata della prova sono state eseguite le pesate delle beute per il controllo dell'andamento del processo fermentativo. È stato misurato quindi il calo ponderale relativo a momenti specifici della fermentazione del succo d'uva per opera dei lieviti presenti. Ai diversi tempi sono state poi eseguite le conte vitali su piastra per testare la cinetica fermentativa.

### ***3.2. Terreni di coltura***

I terreni di coltura di seguito descritti sono stati utilizzati per effettuare le conte vitali e l'isolamento delle diverse specie di lievito.

➤ **WL (Wallerstain Laboratory) NUTRIENT AGAR 80g/L**

è un terreno solido per l'analisi quali-quantitativa della popolazione microbiologica, in particolare **lieviti**, durante le fasi di produzione di prodotti alcolici fermentati come vino e birra e risulta in una polvere così composta: *estratto di lievito (4 g/l), triptone (5 g/l), destrosio (50g/l), potassio fosfato diidrogeno (0,55 g/l), cloruro di potassio (0,425 g/l), cloruro di calcio (0,125 g/l), solfato di magnesio (0,125 g/l), cloruro di ferro (0,0025 g/l), solfato di manganese (0,0025 g/l), verde di bromocresolo (0,022 g/l) ed agar (15 g/l)*. Circa 80g della polvere appena descritta viene disciolta poi in 1L di acqua distillata e il tutto viene portato ad ebollizione. Successivamente si può procedere con la distribuzione in piastre Petri sterili. (Fig 5)

➤ **LYSINE AGAR (XLD)**

Il Lysine-Agar è un terreno differenziale utilizzato per la determinazione e la conta dei lieviti selvaggi in bevande fermentate. (Fig. 5a)

La composizione del terreno favorisce la crescita dei lieviti selvaggi, che sono in grado di utilizzare la lisina come unica fonte di azoto, non permettendo quindi la crescita di *S. cerevisiae*. Il pH basso, inibisce la crescita dei batteri.

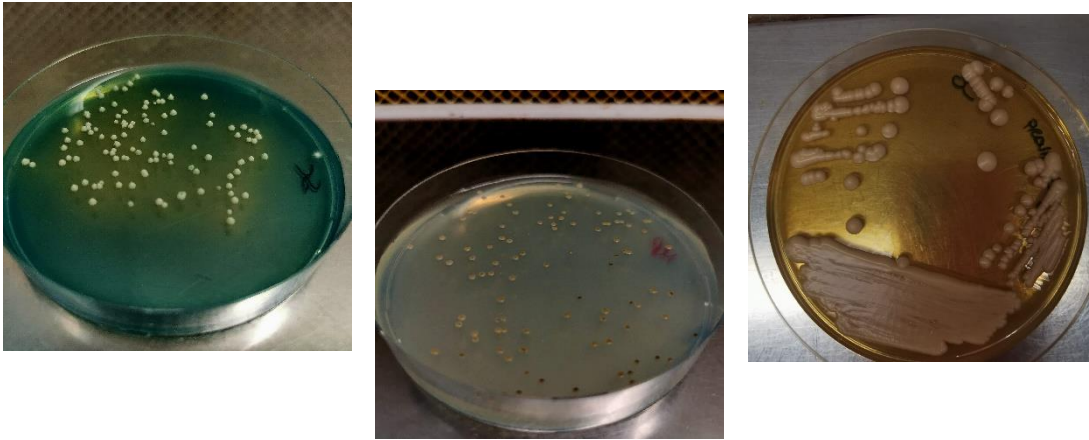
È composto da: *Lysine Medium* (66 g/L), *potassio lattato* (5 g/L), *acido lattico* (0,1 g/L). Per la preparazione si sospende la polvere in 1L di acqua distillata contenente 1mL di potassio lattato al 50% e si porta ad ebollizione sotto agitazione con ancora magnetica, in modo da garantire la completa solubilizzazione, si lascia raffreddare e si aggiunge acido lattico al 10% precedentemente filtrato per regolare il pH a  $4.8 \pm 0,2$ ; a questo punto si può sterilizzare il terreno e procedere con la distribuzione in piastre Petri.

➤ **YPD AGAR (Yeast Peptone Dextrose)**

È un terreno usato per una crescita rapida e ottimale del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Si tratta di un terreno ricco contenente fonti di amminoacidi, vitamine e carbonio che permettono quindi la rapida crescita dei lieviti e la corretta conservazione nel tempo dei ceppi.

E' così composto: *estratto di lievito* (10g/L) *peptone* (20g/L) *D-glucosio* (20g/L) *estratto di malto* (30g/L). Per la preparazione, una volta pesati tutti gli ingredienti in polvere, si porta a volume la miscela in 1L di acqua distillata, si procede con la sterilizzazione in autoclave e successivamente con la distribuzione in piastre Petri. (Fig 5)

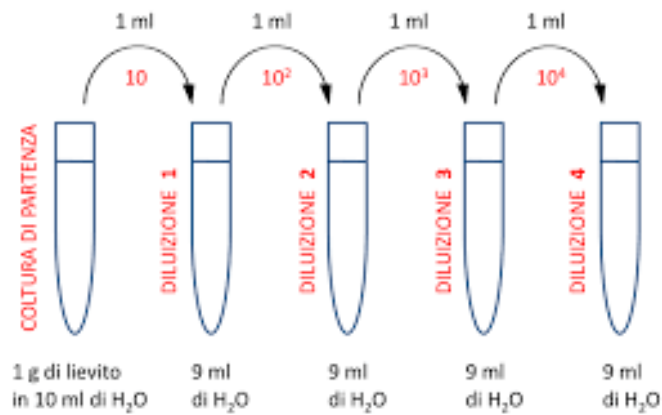




*Fig. 5 da sinistra a destra, S. cerevisiae in terreno WL NUTRIENT AGAR, M. pulcherrima in terreno AGAR LISINA, S. cerevisiae in terreno YPD AGAR*

### ***3.3. Analisi microbiologiche***

Le conte vitali sono state eseguite sfruttando il metodo delle diluizioni seriali. Una diluizione, è un processo che riduce la concentrazione di una sostanza in una soluzione. Si definisce "seriale" quando il procedimento si ripete più volte per aumentare rapidamente il fattore di diluizione. È per questo molto utilizzato in laboratorio per la conta dei microrganismi su piastra.



Quindi si è provveduto a prelevare 1mL di soluzione da ognuna delle 9 beute che abbiamo poi inoculato nella prima provetta contenente 9mL di H<sub>2</sub>O sterile, andando avanti con le diluizioni, fino ad ottenere quella desiderata. Una volta ottenuta, tramite spatolamento con ansa sterile la soluzione è stata posta nel terreno adeguato per permetterne la crescita, rilevata dopo circa 48 h.

### ***3.4. Analisi dei composti volatili***

La valutazione della componente volatile è stata determinata mediante la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). La tecnica può essere eseguita in due modalità: ad immersione diretta SPME (DI-SPME) o in spazio

di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita in HS-SPME utilizzando la fibra a tripla fase divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/polidimetilsilossano(PDMS) (Fig. 6).



*Fig.6 fibra a tripla fase  
divinilbenzene(DVB)/carboxen(CAR)/  
polidimetilsilossano(PDMS)*

Una piccola aliquota di campione (5 ml) viene degassato per mezzo di un agitatore meccanico, successivamente il campione viene posto in una vial con tappo di teflon,

dove viene aggiunto 1,5 g di NaCl e posta in termostato a 50°C per 10 minuti. Dopo questa sosta si aggiunge lo standard interno, che per la rilevazione della componente volatile è il 3-ottanolo, viene poi inserita la siringa attraverso il tappo e spinta la fibra. L'intero sistema viene posto in termostato a 50°C per 30 minuti. Con la fibra pronta si è passati all'analisi mediante gas-cromatografia (GC). L'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo sempre con la fibra retratta; è stato premuto lo stantuffo, esponendo la fibra nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna; il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è stato di circa 5 minuti, per far in modo che tutti gli analiti avessero il tempo di essere desorbiti. Infine la fibra è stata retratta in ago e l'ago rimosso.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

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

### ***3.5. Identificazione e caratterizzazione molecolare***

Al fine di effettuare il confronto tra una fermentazione avvenuta in ambiente controllato quale il laboratorio ed una avvenuta in modo convenzionale nell'ambiente cantina, si è pensato di procedere con un'identificazione a livello molecolare dei lieviti campionati a diversi stadi del processo fermentativo proprio nell'ambiente cantina. L'obiettivo è stato andare a identificare e monitorare la presenza o meno del *S. cerevisiae*. Il metodo utilizzato è coltura-dipendente, poiché richiede l'estrazione al calore del DNA da una coltura pura. Si effettua poi l'amplificazione tramite PCR (Polymerase Chain Reaction) della regione interdelta del gene 26S rRNA sfruttando i primers specifici (Delta 12- Delta 21).

L'amplificazione del DNA estratto è stata effettuata su volumi di 25µl contenenti:

- 2 µl del DNA estratto precedentemente
- 16.3 µl di H<sub>2</sub>O molecolare
- 2.5 µl di Buffer 10x
- 2 µl di dNTP
- 1 µl del primer Delta 12 (5P-TCAACAATGGAATCCCAAC-3P) (Fig. 5a)

- 1  $\mu$ l del primer Delta 21(5P-CACTTAACACCGTATATGA-3P)  
(Fig.5a)
- 0.2  $\mu$ l di enzima Taq polimerasi

```

5' TGTGGAATA AAAACCAACT ATCGTCTATC AACTAGTAGT CATACTATCA
ATATATTATC ATATACGGTG TTAGATAGTG ACATAAGTTA TTATAGAAGC
TGTCACCGAA GTTAGAGGAA GCTGAAATGC AAGGATCGAT AATGTAATAG
GATAATGAAA CATATGAAAT GGAATGAGGA ATAATCGTAA TATTGGTACA
TAGAAATATA GATTCATTA TGGGGATTCC TATAATCATCG AGGAGAACTT
CTAGTACATT CTGTATACCT AATATTATAG CCTTATCAA CGATGGAATC
CCAACAATTA TTTCAAAATT CACCCATTTT TCA 3'

```

*Fig.5a posizioni genomiche dei primers Delta 12, Delta 21*

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con termociclatore seguendo la procedura prevista:

- Per 9 cicli: 95°C x 3 min, 94°C x 25 sec, 45°C x 30 sec, 72°C x 1 min e 30 sec
- Per 21 cicli: 94°C per 25 sec, 50°C x 30 sec, 72°C x 1 min e 30 sec

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio su tampone TBE 0.5X che ha permesso di visualizzare i diversi profili molecolari e di confrontarli con quelli già in letteratura.

## CAPITOLO 4. RISULTATI

### *4.1. Evoluzione della cinetica fermentativa*

La cinetica fermentativa è stata misurata in termini di produzione di CO<sub>2</sub> e quindi tramite la misurazione giornaliera della perdita di peso ponderale delle beute in fermentazione mista fino al termine della fermentazione. I risultati sono espressi in concentrazione di CO<sub>2</sub> in g/L e mostrati nel grafico sottostante (Grafico 1). La fermentazione condotta con *S. cerevisiae* coltura pura, mostra una cinetica fermentativa nettamente maggiore rispetto alle altre due fermentazioni sequenziali. *T. delbrueckii/S. cerevisiae* mostra un andamento fermentativo nei primi quattro giorni superiore a quello di *M. pulcherrima /S. cerevisiae*, la quale però dal settimo giorno ha esibito una cinetica sovrapponibile alla sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae*. Nonostante differenze nella velocità di fermentazione, tutte e tre le prove hanno svolto lo stesso contenuto finale di CO<sub>2</sub>.

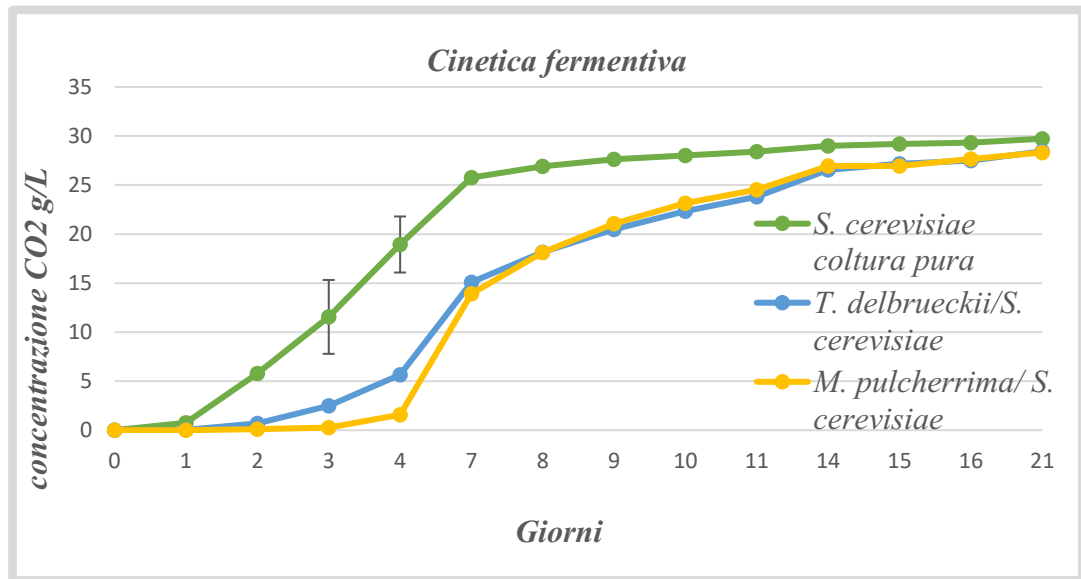


Grafico 1. Evoluzione della cinetica fermentativa

#### 4.2. Evoluzione della popolazione microbica

Le conte vitali su piastra sono state effettuate a vari tempi di fermentazione (dal giorno 0 al giorno 10) andando a misurare le unità formanti colonia CFU/ml in scala logaritmica così da poter monitorare l'evoluzione della popolazione microbica durante il processo fermentativo. Nel grafico 2 viene riportato l'andamento fermentativo della fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae*. *M. pulcherrima* mostra un incremento della concentrazione cellulare intorno al secondo giorno di fermentazione, per poi decrescere fino a fine fermentazione. *S. cerevisiae*, inoculato al terzo giorno di fermentazione ha mostrato un contenuto cellulare praticamente costante lungo tutto il processo fermentativo. *S. cerevisiae* coltura



pura, ha mostrato un incremento della concentrazione cellulare al secondo giorno ( $10^8$  cell/ml), per poi decrescere ( $10^7$  cell/ml) e rimanere costante per tutto il processo fermentativo.

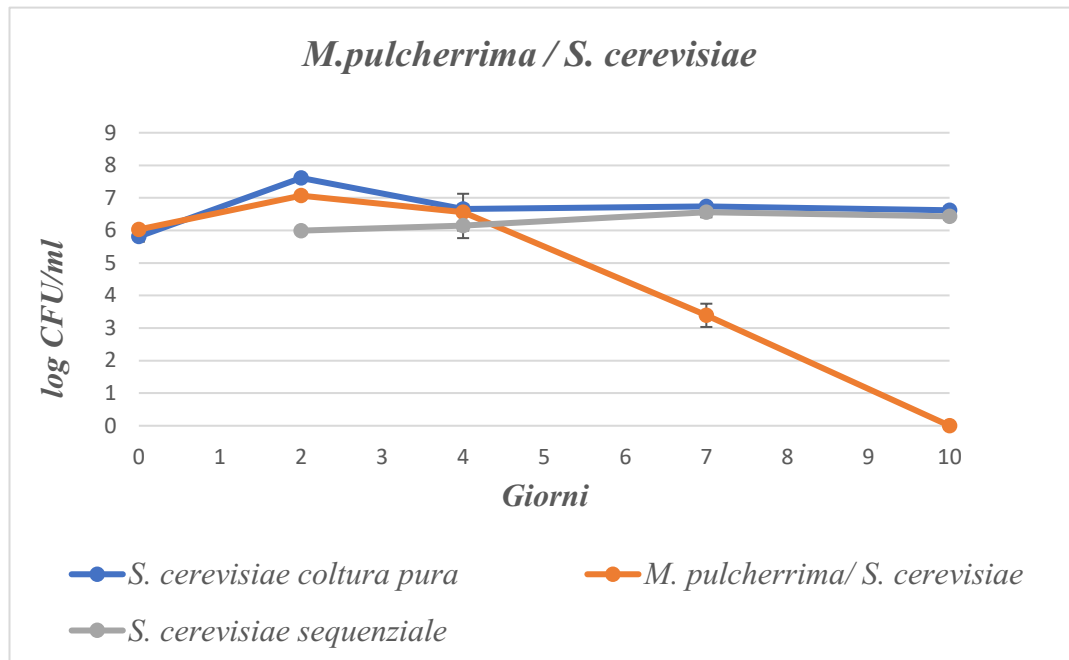


Grafico 2. Evoluzione popolazione microbica della fermentazione sequenziale *M. pulcherrima / S. cerevisiae*

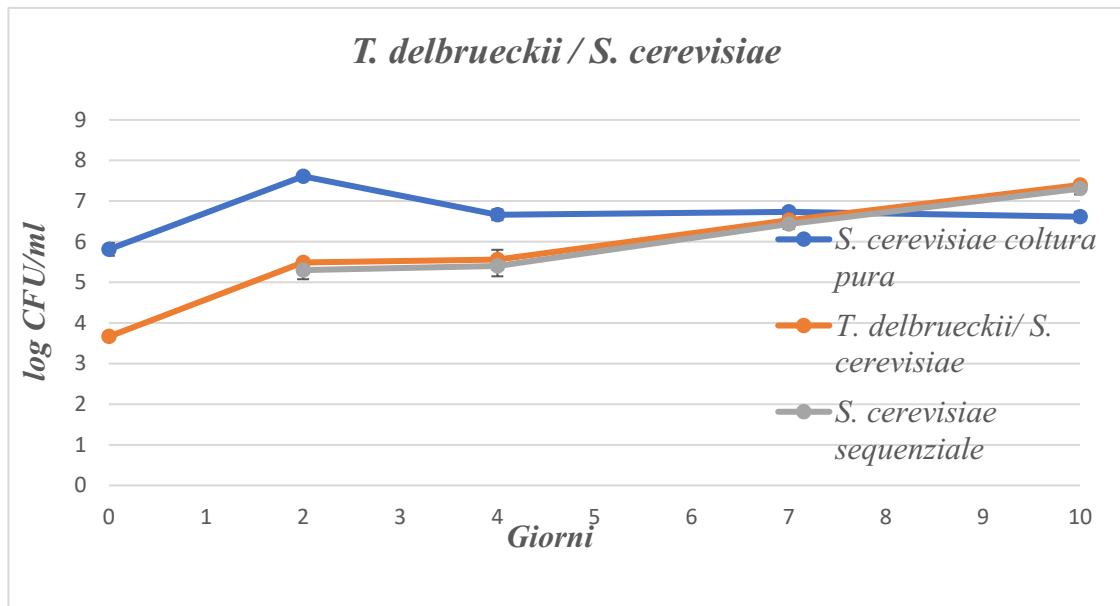


Grafico 3. Evoluzione popolazione microbica della fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae*

Nel grafico 3, viene mostrato l'andamento fermentativo dell'inoculo sequenziale del mosto con *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*. In questo caso, si può notare come, a differenza di *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* segua pressappoco lo stesso andamento fermentativo di *S. cerevisiae*, inoltre rimane ad una concentrazione cellulare di circa  $10^8$  cell/ml fino a fine fermentazione. I dati sono stati sempre confrontati con un inoculo di *S. cerevisiae* in coltura pura.

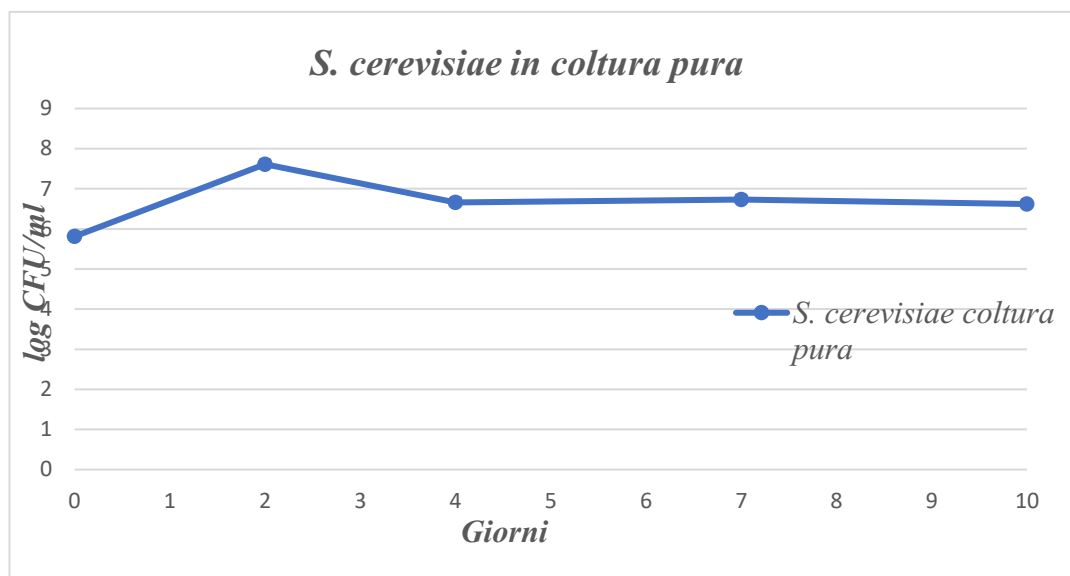


Grafico 4. Evoluzione popolazione microbica di *S. cerevisiae* in coltura pura

Nel grafico 4 viene mostrato invece l'andamento di *S. cerevisiae* in coltura pura. Si può notare come la crescita del lievito aumenti a inizio fermentazione, al tempo T2 per poi ridursi e rimanere perlopiù costante in tutti gli intervalli di tempo studiati.

### ***4.3. Analisi della produzione di composti volatili***

L'analisi della produzione dei composti volatili nel vino è divenuto un passo irrinunciabile e indispensabile per la produzione. Il fine è quello di determinare il grado di qualità atteso, verificare l'assenza di alterazioni nel prodotto, delineare le caratteristiche organolettiche e individuare eventuali problematiche relative all'aspetto sensoriale della bevanda.

#### ***4.3.1 Evoluzione dei principali composti volatili al secondo giorno di fermentazione***

È stata valutata la produzione dei composti aromatici nelle tre prove al secondo giorno di fermentazione, ovvero prima dell'inoculo di *S. cerevisiae* e nella coltura pura di *S. cerevisiae*. Per comodità i dati sono stati organizzati in quattro tabelle che suddividono i composti in classi: esteri, alcoli, terpeni ed acidi.

*Tabella 5. Contenuto di esteri al giorno due di fermentazione in mg/L.*

*I dati sono relativi alla media  $\pm$  deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).*

| <b>ESTERI (mg/L)</b>                              | <b><i>M. pulcherrima</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|---|---|---|-----------------------------|
| <b><i>Etil Acetato</i></b>                        | 27,73±1,92 <sup>a</sup>                                 | 14,26±0,347 <sup>b</sup>                                | 20,85±5,54 <sup>b</sup>     |
| <b><i>Isobutil acetato</i></b>                    | 0,082±0,0685 <sup>b</sup>                               | 0,088±0,008 <sup>b</sup>                                | 0,55±0,035 <sup>a</sup>     |
| <b><i>Acido esanoico, estere<br/>etilico</i></b>  | 0,125±0,016 <sup>a</sup>                                | 0,097±0,003 <sup>b</sup>                                | 0,051±0,02 <sup>b</sup>     |
| <b><i>Acido acetico, estere<br/>etilico</i></b>   | 0,042±0,003 <sup>b</sup>                                | 0,11±0,006 <sup>a</sup>                                 | 0,008±0,006 <sup>c</sup>    |
| <b><i>3-Es-1-ol- acetato (Z)</i></b>              | 0,016±0,08 <sup>b</sup>                                 | 0,03±0,137 <sup>a</sup>                                 | 0,009±0,004 <sup>c</sup>    |
| <b><i>Acido ottanoico, estere<br/>etilico</i></b> | 0,030±0,00 <sup>c</sup>                                 | 3,85±0,016 <sup>b</sup>                                 | 5,22±2,17 <sup>a</sup>      |
| <b><i>Acido caproico, estere<br/>etilico</i></b>  | 0,08±0,02 <sup>c</sup>                                  | 0,19±0,003 <sup>a</sup>                                 | 0,14±0,009 <sup>b</sup>     |
| <b><i>Acido benzoico, estere<br/>metilico</i></b> | 0,39±0,033 <sup>a</sup>                                 | 0,22±0,006 <sup>b</sup>                                 | 0,30±0,018 <sup>b</sup>     |
| <b><i>Butirrolattone</i></b>                      | 0,016±0,00 <sup>a</sup>                                 | 0,016±0,003 <sup>a</sup>                                | 0,016±0,00 <sup>a</sup>     |

|  |                         |                        |                        |
|--|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Acido propanoico, feniletilestere</i>       | 0,00±0,00 <sup>b</sup>  | 0,09±0,00 <sup>a</sup> | 0,00±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Etil decanoato</i>                          | 0,001±0,02 <sup>c</sup> | 0,35±0,00 <sup>a</sup> | 0,25±0,09 <sup>b</sup> |
| <i>Acido isovalerico, estere etilico</i>       | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 0,00±0,01 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Acido laurico, estere etilico</i>           | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 0,02±0,01 <sup>b</sup> | 0,53±0,04 <sup>a</sup> |
| <i>Acido propanoico, estere 2-feniletilico</i> | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 0,09±0,00 <sup>b</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Acido caprico, estere etilico</i>           | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 0,35±0,08 <sup>b</sup> | 3,85±1,00 <sup>a</sup> |

Nella tabella 5 vengono riportati i principali esteri ottenuti al secondo giorno di fermentazione. Relativamente a questa classe di composti, la fermentazione sequenziale *M. pulcherima*/*S. cerevisiae* ha mostrato un incremento significativo rispetto alle altre due fermentazioni dei seguenti composti: *Etil Acetato*, *Acido esanoico estere etilico* ed *Acido benzoico estere metilico*.

La fermentazione sequenziale *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, ha mostrato un aumento significativo di *3-Es-1-ol- acetato (Z)*, *Acido caproico estere etilico*, *Acido propanoico feniletilestere* ed *Etil decanoato*.

*S. cerevisiae* in coltura pura ha evidenziato invece una produzione significativa di *Isobutil acetato*, *Acido ottanoico estere etilico*, *Acido laurico estere etilico* ed *Acido caprico estere etilico*.

Inoltre viene evidenziato che le tre fermentazioni non hanno mostrato differenze significative per quanto riguarda la produzione di *Butirrolattone*.

Tabella 6. *Contenuto di alcoli al giorno due di fermentazione in mg/L*

*I dati sono relativi alla media ± deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).*

| <i>ALCOLI (mg/L)</i>         | <i>M. pulcherrima /<br/>S. cerevisiae</i> | <i>T. delbrueckii /<br/>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i>     |
|------------------------------|---|---|--------------------------|
| <i>Alcol metile</i>          | 1,69±0,17 <sup>b</sup>                    | 1,82±0,049 <sup>b</sup>                   | 2,5±0,254 <sup>a</sup>   |
| <i>1-Propanolo</i>           | 0,49±0,068 <sup>b</sup>                   | 1,58±0,091 <sup>a</sup>                   | 0,061±0,245 <sup>c</sup> |
| <i>1-Propanolo, 2 Metile</i> | 4,14±0,3 <sup>b</sup>                     | 1,77±0,18 <sup>c</sup>                    | 5,27±0,65 <sup>a</sup>   |

|   |                          |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>1-Butanolo</i>                         | 0,092±0,027 <sup>c</sup> | 0,121±0,086 <sup>b</sup> | 0,230±0,009 <sup>a</sup> |
| <i>1-Butanolo, 3 Metile</i>               | 8,95±0,02 <sup>b</sup>   | 15,05±0,02 <sup>b</sup>  | 28,03±51,05 <sup>a</sup> |
| <i>1-Esanolo</i>                          | 5,16±0,68 <sup>b</sup>   | 7,23±0,01 <sup>a</sup>   | 3,46±0,00 <sup>c</sup>   |
| <i>2-Ottanol, 2 Metile</i>                | 0,17±0,02 <sup>a</sup>   | 0,18±0,00 <sup>a</sup>   | 0,05±0,00 <sup>b</sup>   |
| <i>5-Epten, 2-one, 6 Metile</i>           | 0,03±0,00 <sup>a</sup>   | 0,04±0,13 <sup>b</sup>   | 0,00±0,00 <sup>c</sup>   |
| <i>2-Esanolo</i>                          | 0,62±0,118 <sup>a</sup>  | 0,43±0,009 <sup>b</sup>  | 0,35±0,006 <sup>c</sup>  |
| <i>3-Esen, 1-ol (Z)</i>                   | 0,02±0,08 <sup>b</sup>   | 0,03±0,13 <sup>a</sup>   | 0,00±0,00 <sup>c</sup>   |
| <i>Benzene, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-</i> | 0,08±0,00 <sup>b</sup>   | 0,33±0,00 <sup>a</sup>   | 0,06±0,021 <sup>b</sup>  |
| <i>1-Octen-3-ol</i>                       | 0,47±0,04 <sup>a</sup>   | 0,18±0,01 <sup>c</sup>   | 0,23±0,02 <sup>b</sup>   |
| <i>1-Eptanolo</i>                         | 0,06±0,00 <sup>b</sup>   | 0,19±0,014 <sup>a</sup>  | 0,08±0,00 <sup>b</sup>   |
| <i>1-Ottanolo</i>                         | 0,02±0,00 <sup>b</sup>   | 0,06±0,00 <sup>a</sup>   | 0,06±0,00 <sup>a</sup>   |



|  |                        |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Otrienolo</i>                       | 0,10±0,00 <sup>c</sup> | 0,16±0,22 <sup>b</sup> | 0,21±0,00 <sup>a</sup> |
| <i>1-Nonanolo</i>                      | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,01±0,07 <sup>b</sup> | 0,07±0,01 <sup>a</sup> |
| <i>2-Furanmetanolo</i>                 | 0,17±0,02 <sup>a</sup> | 0,08±0,07 <sup>b</sup> | 0,08±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Dodecanale</i>                      | 0,05±0,03 <sup>b</sup> | 0,07±0,00 <sup>a</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>1-Decanolo</i>                      | 0,04±0,00 <sup>a</sup> | 0,01±0,00 <sup>b</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Citronello</i>                      | 0,04±0,00 <sup>b</sup> | 0,06±0,00 <sup>a</sup> | 0,01±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Trans-Geraniolo</i>                 | 0,33±0,03 <sup>b</sup> | 0,36±0,00 <sup>a</sup> | 0,03±0,01 <sup>c</sup> |
| <i>p-Propilbenzaldeide</i>             | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,01±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Alcol benzile</i>                   | 0,07±0,00 <sup>b</sup> | 0,08±0,02 <sup>a</sup> | 0,07±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Alcol feniletile</i>                | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 1,05±0,12 <sup>a</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>1-Dodecanolo</i>                    | 0,04±0,00 <sup>b</sup> | 0,06±0,00 <sup>b</sup> | 0,07±0,00 <sup>a</sup> |
| <i>1-Propanolo, 3-<br/>(metiltiol)</i> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 0,17±0,00 <sup>a</sup> | 0,03±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>6-Metil, 5-Epten-2ol-</i>           | 0,04±0,00 <sup>a</sup> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 0,03±0,00 <sup>b</sup> |

Nella Tabella 6 vengono riportati i principali alcoli prodotti al secondo giorno di fermentazione. Possiamo notare che nella fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* si è registrato un aumento significativo dei seguenti composti: 5-Epten, 2-one, 6 Metile, 2-Esanolo, 1-Octen-3-ol, 2-

*Furanmetanolo, 1-Decanolo e 6-Metil, 5-Epten-2-ol.* Nella fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae* si registra invece un incremento significativo per quanto riguarda *1-Propanolo, 1-Esanolo, 3-Esen, 1-ol (Z), Benzene, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-, 1-Eptanolo, Dodecanale, Citronellolo, Trans-Geraniolo, Alcol benzile, Alcol feniletile e 1-Propanolo, 3-(metiltiol).* Nella fermentazione singola, *S. cerevisiae* in coltura pura si è distinto per la produzione significativa dei seguenti composti: *Alcol metile, 1-Propanolo 2 Metile, 1-Butanolo, 1-Butanolo 3-Metile, Otrienolo, 1-Nonanolo e 1-Dodecanolo.* Inoltre si può notare che sia la fermentazione *M. pulcherrima/S. cerevisiae* che quella *T. delbrueckii/S. cerevisiae* si sono distinte per la produzione significativa di *2-Ottanolo, 2-Metile.* *S. cerevisiae* in coltura pura, come in fermentazione sequenziale con *M. pulcherrima*, ha mostrato una produzione significativa di *1-Ottanolo.*

*Tabella 7. Contenuto di terpeni al giorno due di fermentazione in mg/L*

*I dati sono relativi alla media ± deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).*

| <b>TERPENI(mg/L)</b>                                | <b><i>M. pulcherrima</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|---|---|---|-----------------------------|
| <b>3-Penten-2-one,<br/>4-methyl-</b>                | 0,66±0,00 <sup>b</sup>                                  | 0,42±0,00 <sup>b</sup>                                  | 1,03±0,01 <sup>a</sup>      |
| <b>Nonanal</b>                                      | 0,06±0,00 <sup>a</sup>                                  | 0,06±0,01 <sup>a</sup>                                  | 0,01±0,00 <sup>b</sup>      |
| <b>Benzene, 1,3-<br/>bis(1,1-<br/>dimetiletil)-</b> | 0,08±0,00 <sup>b</sup>                                  | 0,33±0,00 <sup>a</sup>                                  | 0,06±0,02 <sup>c</sup>      |
| <b>Ottanal</b>                                      | 0,00±0,00 <sup>c</sup>                                  | 0,00±0,00 <sup>c</sup>                                  | 0,00±0,00 <sup>c</sup>      |
| <b>Lilalolo</b>                                     | 0,31±0,13 <sup>b</sup>                                  | 0,80±0,02 <sup>a</sup>                                  | 0,30±0,03 <sup>b</sup>      |
| <b>Citronello-<br/>diidro</b>                       | 0,01±0,01 <sup>b</sup>                                  | 0,01±0,00 <sup>b</sup>                                  | 0,06±0,00 <sup>a</sup>      |
| <b>Benzaldeide</b>                                  | 0,23±0,02 <sup>b</sup>                                  | 0,72±0,01 <sup>a</sup>                                  | 0,28±0,04 <sup>b</sup>      |
| <b>alfa-Terpineolo</b>                              | 0,67±0,05 <sup>a</sup>                                  | 0,34±0,01 <sup>b</sup>                                  | 0,66±0,016 <sup>a</sup>     |

|  |                        |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b><i>Cis-Geraniolo</i></b>            | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,01±0,04 <sup>b</sup> | 0,02±0,00 <sup>a</sup> |
| <b><i>Benzaldeide 2,4-Dimetile</i></b> | 1,09±0,05 <sup>c</sup> | 1,17±0,00 <sup>b</sup> | 1,46±0,14 <sup>a</sup> |

Nella tabella 7 viene mostrato il contenuto di terpeni nelle tre diverse fermentazioni. La fermentazione sequenziale *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* da sola non ha mostrato differenze significative nella produzione dei diversi composti terpenici. Nella fermentazione sequenziale *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* si evidenzia un incremento significativo nella produzione di *Benzene*, *1,3-bis(1,1-dimetiletil)-*, *Lillalolo* e *Benzaldeide- 4 Metile*. *S. cerevisiae* in coltura pura mostra un aumento significativo dei seguenti composti: *3-Penten-2-one*, *4-methyl-*, *Citronello-diidro*, *Cis-Geraniolo* e *Benzaldeide 2,4-Dimetile*. Si può poi notare come le fermentazioni sequenziali di *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* abbiano mostrato una produzione significativa di *Nonanal*. Mentre *S. cerevisiae* coltura pura e la fermentazione mista *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* si distinguono per la produzione significativa di *alfa-Terpineolo*.

Tabella 5. Contenuto di Acidi al giorno due di fermentazione

I dati sono relativi alla media±deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).

| <b>ACIDI (mg/L)</b>       | <b><i>M. pulcherrima</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii</i> /<br/><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|---------------------------|---|---|-----------------------------|
| <b>Acido isobutirrico</b> | 0,05±0,00 <sup>b</sup>                                  | 0,13±0,00 <sup>a</sup>                                  | 0,11±0,00 <sup>a</sup>      |
| <b>Acido esanoico</b>     | 0,24±0,08 <sup>c</sup>                                  | 0,92±0,00 <sup>b</sup>                                  | 5,22±0,50 <sup>a</sup>      |
| <b>Acido eptanoico</b>    | 0,08±0,05 <sup>b</sup>                                  | 0,49±0,00 <sup>ab</sup>                                 | 0,03±0,00 <sup>b</sup>      |
| <b>Acido ottanoico</b>    | 0,72±0,32 <sup>c</sup>                                  | 4,15±0,02 <sup>b</sup>                                  | 20,3±1,57 <sup>a</sup>      |
| <b>Acido nonanoico</b>    | 1,25±0,78 <sup>a</sup>                                  | 0,60±0,24 <sup>b</sup>                                  | 0,39±0,06 <sup>c</sup>      |
| <b>Acido acetico</b>      | 1,85±0,176 <sup>b</sup>                                 | 0,56±0,020 <sup>c</sup>                                 | 2,91±0,031 <sup>a</sup>     |
| <b>Acido caproico</b>     | 0,08±0,02 <sup>c</sup>                                  | 0,19±0,003 <sup>a</sup>                                 | 0,14±0,009 <sup>b</sup>     |

|                              |                        |                        |                        |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Acido<br/>isovalerico</i> | 0,05±0,00 <sup>c</sup> | 0,21±0,02 <sup>a</sup> | 0,21±0,03 <sup>a</sup> |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|

Nella tabella 8 viene mostrata la produzione di acidi al giorno due di fermentazione. La fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* ha mostrato una produzione significativa di *Acido nonanoico*. La fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae* ha evidenziato un incremento significativo di *Acido caproico*. *S. cerevisiae* in coltura pura mostra invece un incremento significativo di *Acido ottanoico* e *Acido acetico*. In particolare, si evidenzia che sia nella fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae* che nella fermentazione singola di *S. cerevisiae* si assiste ad un incremento significativo di *Acido isobutirrico*.

#### **4.3.1. Evoluzione dei principali composti volatili a fine fermentazione**

È stata valutata la produzione dei composti aromatici nelle tre prove a fine processo fermentativo. Per comodità i dati sono stati organizzati in quattro tabelle che suddividono i composti in classi: esteri, alcoli, terpeni ed acidi.

Tabella 5a. Contenuto di Esteri a fine fermentazione.

I dati sono relativi alla media±deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).

| <b>ESTERI (mg/L)</b>                         | <b><i>M. pulcherrima</i></b><br><br><b><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii</i> /</b><br><br><b><i>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|--|---|---|-----------------------------|
| <b><i>Etil Acetato</i></b>                   | 27,7±1,92 <sup>b</sup>  | 87,8±7,65 <sup>a</sup>  | 83,3±1,24 <sup>a</sup>      |
| <b><i>Isobutil acetato</i></b>               | 0,08±0,06 <sup>c</sup>  | 0,32±0,04 <sup>b</sup>  | 0,93±0,04 <sup>a</sup>      |
| <b><i>Acido esanoico, estere etilico</i></b> | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 9,51±1,47 <sup>b</sup>  | 17,2±0,54 <sup>a</sup>      |
| <b><i>Acido acetico, estere etilico</i></b>  | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  | 0,89±0,18 <sup>b</sup>  | 1,36±0,07 <sup>a</sup>      |
| <b><i>3-Es-1-ol- acetato (Z)</i></b>         | 0,01±0,00 <sup>c</sup>  | 0,08±0,01 <sup>b</sup>  | 0,14±0,00 <sup>a</sup>      |

|  |                        |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|
|  |                        |                        |                        |
| <i>Acido ottanoico, estere etilico</i>   | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 3,85±0,58 <sup>b</sup> | 11,0±0,32 <sup>a</sup> |
| <i>Acido caprico, estere etilico</i>     | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,98±0,30 <sup>b</sup> | 1,86±0,16 <sup>a</sup> |
| <i>Acido benzoico, estere metilico</i>   | 0,39±0,03 <sup>a</sup> | 0,22±0,01 <sup>b</sup> | 0,23±0,02 <sup>b</sup> |
| <i>Butirrolattone</i>                    | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 0,03±0,00 <sup>a</sup> | 0,02±0,03 <sup>b</sup> |
| <i>Acido propanoico, feniletilestere</i> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,08±0,00 <sup>a</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Etil decanoato</i>                    | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,35±0,04 <sup>b</sup> | 0,53±0,13 <sup>a</sup> |
| <i>Acido isovalerico, estere etilico</i> | 0,05±0,00 <sup>c</sup> | 0,17±0,04 <sup>a</sup> | 0,10±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Acido laurico, estere etilico</i>     | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,08±0,02 <sup>b</sup> | 0,16±0,01 <sup>a</sup> |



|   |                        |                        |                        |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Acido propanoico, estere 2- feniletilico</i> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,08±0,00 <sup>a</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|

Nella tabella 5a viene mostrata la produzione di esteri a fine fermentazione. Per quanto riguarda la fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* non si sono evidenziate differenze significative nella produzione dei suddetti composti. Nella fermentazione *T. delbrueckii/ S. cerevisiae* si è evidenziata invece la produzione significativa dei seguenti composti: *Butirrolattone, Acido isovalerico estere etilico, Acido propanoico estere feniletilico. S. cerevisiae* coltura pura si è invece distinto per la produzione significativa di *Isobutil acetato, Acido esanoico estere, Acido acetico estere, Acido ottanoico, Acido caprico estere, Etil decenoato ed Acido laurico estere*. Infine per quanto riguarda il composto *Etil Acetato* se ne è registrata una produzione significativa sia nella fermentazione *T. delbrueckii/S. cerevisiae* che in quella pura di solo *S. cerevisiae*.

Tabella 6a. Contenuto di Alcoli a fine fermentazione.

I dati sono relativi alla media±deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).

| <i>ALCOLI (mg/L)</i>             | <i>M. pulcherrima /<br/>S. cerevisiae</i> | <i>T. delbrueckii /<br/>S. cerevisiae</i> | <i>S.<br/>cerevisiae</i> |
|----------------------------------|---|---|--------------------------|
| <i>Alcol metile</i>              | 1,69±0,17 <sup>b</sup>                    | 3,46±0,22 <sup>a</sup>                    | 3,28±0,09 <sup>a</sup>   |
| <i>1-Propanolo</i>               | 0,5±0,03 <sup>c</sup>                     | 20,8±0,88 <sup>a</sup>                    | 14,1±0,2 <sup>b</sup>    |
| <i>1-Propanolo, 2<br/>Metile</i> | 4,14±0,53 <sup>c</sup>                    | 11,14±0,65 <sup>b</sup>                   | 21,1±2,2 <sup>a</sup>    |
| <i>1-Butanolo</i>                | 0,09±0,00 <sup>c</sup>                    | 1,68±0,08 <sup>a</sup>                    | 0,81±0,08 <sup>b</sup>   |

|   |                        |                        |                         |
|---|------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>1-Butanolo, 3 Metile</i>               | 8,95±1,37 <sup>c</sup> | 65,4±1,38 <sup>b</sup> | 86,9±3,99 <sup>a</sup>  |
| <i>1-Esanolo</i>                          | 5,16±0,68 <sup>a</sup> | 1,05±0,02 <sup>b</sup> | 0,87±0,02 <sup>c</sup>  |
| <i>2-Ottanol, 2 Metile</i>                | 0,16±0,02 <sup>c</sup> | 0,16±0,00 <sup>c</sup> | 0,16±0,00 <sup>c</sup>  |
| <i>5-Epten, 2-one, 6 Metile</i>           | 0,02±0,00 <sup>a</sup> | 0,01±0,00 <sup>b</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup>  |
| <i>2-Esanolo</i>                          | 0,62±0,08 <sup>a</sup> | 0,13±0,01 <sup>b</sup> | 0,15±0,011 <sup>b</sup> |
| <i>3-Esen, 1-ol (Z)</i>                   | 0,01±0,00 <sup>c</sup> | 0,08±0,01 <sup>a</sup> | 0,05±0,00 <sup>b</sup>  |
| <i>Benzene, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-</i> | 0,07±0,00 <sup>c</sup> | 0,33±0,02 <sup>a</sup> | 0,34±0,01 <sup>a</sup>  |
| <i>1-Octen-3-ol</i>                       | 0,43±0,04 <sup>a</sup> | 0,18±0,00 <sup>b</sup> | 0,15±0,00 <sup>b</sup>  |

|                               |                        |                        |                        |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                               |                        |                        |                        |
| <b><i>1-Eptanolo</i></b>      | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 0,2±0,01 <sup>b</sup>  | 0,26±0,08 <sup>a</sup> |
| <b><i>1-Ottanolo</i></b>      | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,06±0,00 <sup>b</sup> | 0,12±0,00 <sup>a</sup> |
| <b><i>Otrienolo</i></b>       | 0,07±0,00 <sup>b</sup> | 0,10±0,00 <sup>a</sup> | 0,12±0,01 <sup>a</sup> |
| <b><i>1-Nonanolo</i></b>      | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,04±0,00 <sup>c</sup> | 0,03±0,03 <sup>c</sup> |
| <b><i>2-Furanmetanolo</i></b> | 0,17±0,01 <sup>a</sup> | 0,08±0,00 <sup>b</sup> | 0,07±0,00 <sup>b</sup> |
| <b><i>Dodecanale</i></b>      | 0,05±0,04 <sup>b</sup> | 0,06±0,05 <sup>b</sup> | 0,13±0,06 <sup>a</sup> |
| <b><i>1-Decanolo</i></b>      | 0,04±0,00 <sup>c</sup> | 0,04±0,00 <sup>c</sup> | 0,10±0,00 <sup>b</sup> |
| <b><i>Citronello</i></b>      | 0,04±0,00 <sup>c</sup> | 0,08±0,00 <sup>b</sup> | 0,11±0,00 <sup>a</sup> |
| <b><i>Trans-Geraniolo</i></b> | 0,33±0,03 <sup>b</sup> | 0,28±0,09 <sup>b</sup> | 0,36±0,18 <sup>a</sup> |

|                                   |                        |                        |                        |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>p-Propilbenzaldeide</i>        | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Alcol benzile</i>              | 0,07±0,00 <sup>b</sup> | 0,05±0,00 <sup>c</sup> | 0,05±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Alcol feniletile</i>           | 0,02±0,00 <sup>c</sup> | 13,4±11,6 <sup>a</sup> | 5,95±10,2 <sup>b</sup> |
| <i>1-Dodecanolo</i>               | 0,04±0,00 <sup>b</sup> | 0,10±0,00 <sup>a</sup> | 0,10±0,00 <sup>a</sup> |
| <i>1-Propanolo, 3-(metiltiol)</i> | 0,02±0,00 <sup>c</sup> | 0,17±0,02 <sup>a</sup> | 0,17±0,03 <sup>a</sup> |
| <i>6-Metil, 5-Epten-2ol-</i>      | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> |

Nella tabella 6 a viene mostrata la produzione di alcoli a fine fermentazione. Dalla tabella si evince che la fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* si è distinta significativamente per la maggior produzione dei seguenti composti: *1-Esanolo 5-Epten, 2-one, 6 Metile, 2-Esanolo, 1 Octen-3-ol e 2-Furanmetanolo*. La fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae* ha mostrato un incremento significativo di: *1-Propanolo, 3-Esen, 1-ol (Z), Otrienolo, Alcol feniletile*.

*S. cerevisiae* in fermentazione singola ha invece mostrato un incremento significativo di 1-*Propanolo*, 2 *Metile*, 1-*Butanolo*, 3 *Metile*, 1-*Eptanolo*, 1-*Ottanolo*, *Dodecanale*, *Citronellolo*, *Trans-Geraniolo*. Inoltre si può notare come sia *T. delbrueckii/S. cerevisiae* che *S. cerevisiae* abbiano mostrato un incremento significativo della produzione di *Alcol metile*, *Benzene*, 1,3-*bis(1,1-dimetiletil)-*, 1-*Dodecanolo*, 1-*Propanolo*, 3-*(metiltiol)*.

*Tabella 7a. Contenuto di Terpeni a fine fermentazione.*

*I dati sono relativi alla media±deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).*

| <b>TERPENI(mg/L)</b>                 | <b><i>M. pulcherrima / S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii / S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|--------------------------------------|--|--|-----------------------------|
| <b>3-Penten-2-one,<br/>4-methyl-</b> | <b>0,66±0,11<sup>a</sup></b>                 | 0,11±0,00 <sup>b</sup>                       | 0,11±0,00 <sup>b</sup>      |

|   |                        |                        |                        |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Nonanal</i>                            | 0,05±0,00 <sup>a</sup> | 0,01±0,01 <sup>c</sup> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Benzene, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-</i> | 0,07±0,00 <sup>b</sup> | 0,33±0,02 <sup>a</sup> | 0,34±0,01 <sup>a</sup> |
| <i>Ottanal</i>                            | 0,28±0,03 <sup>a</sup> | 0,01±0,00 <sup>c</sup> | 0,02±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Linalolo</i>                           | 1,48±0,13 <sup>a</sup> | 0,80±0,03 <sup>b</sup> | 0,82±0,04 <sup>b</sup> |
| <i>Citronello-<br/>diidro</i>             | 0,01±0,00 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,00±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>Benzaldeide</i>                        | 0,23±0,02 <sup>b</sup> | 0,72±0,12 <sup>a</sup> | 0,02±0,00 <sup>c</sup> |
| <i>alfa-Terpineolo</i>                    | 0,67±0,05 <sup>a</sup> | 0,34±0,01 <sup>b</sup> | 0,38±0,02 <sup>b</sup> |
| <i>Cis-Geraniolo</i>                      | 0,00±0,00 <sup>c</sup> | 0,05±0,00 <sup>b</sup> | 0,05±0,00 <sup>b</sup> |

|  |                              |                        |                        |
|--|------------------------------|------------------------|------------------------|
| <b><i>Benzaldeide 2,4-Dimetile</i></b> | <b>1,09±0,05<sup>a</sup></b> | 0,05±0,01 <sup>b</sup> | 0,04±0,00 <sup>b</sup> |
|--|------------------------------|------------------------|------------------------|

Nella tabella 7 a è mostrata la produzione di Terpeni a fine fermentazione. Si nota che la fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* ha mostrato un incremento significativo dei seguenti composti: *3-Penten-2-one*, *4-methyl-*, *Nonanal*, *Ottanal*, *Linalolo*, *alfa-Terpineolo*, *Benzaldeide 2,4-Dimetile*. La fermentazione sequenziale *T. delbrueckii/S. cerevisiae* ha invece mostrato un incremento significativo nella produzione di *Benzene*, *1,3-bis(1,1-dimetilettil)-* paragonabile a quello prodotto in fermentazione singola dal solo *S. cerevisiae*.

*Tabella 8a. Contenuto di Acidi a fine fermentazione*

*I dati sono relativi alla media±deviazione standard. I dati con differenti lettere all'interno di ogni riga rappresentano le differenze significative elaborate con il Duncan's test (0.05%).*

|                            |  |  |                             |
|----------------------------|--|--|-----------------------------|
| <b><i>ACIDI (mg/L)</i></b> | <b><i>M. pulcherrima /<br/>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>T. delbrueckii /<br/>S. cerevisiae</i></b> | <b><i>S. cerevisiae</i></b> |
|----------------------------|--|--|-----------------------------|



|                           |                        |                        |                        |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Acido isobutirrico</i> | 0,03±0,00 <sup>c</sup> | 0,13±0,01 <sup>a</sup> | 0,10±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Acido esanoico</i>     | 0,24±0,06 <sup>c</sup> | 2,14±0,26 <sup>b</sup> | 4,85±0,56 <sup>a</sup> |
| <i>Acido eptanoico</i>    | 0,08±0,05 <sup>b</sup> | 0,03±0,00 <sup>b</sup> | 0,02±0,00 <sup>b</sup> |
| <i>Acido ottanoico</i>    | 0,71±0,02 <sup>c</sup> | 4,72±0,87 <sup>b</sup> | 13,4±1,32 <sup>a</sup> |
| <i>Acido nonanoico</i>    | 1,25±0,78 <sup>a</sup> | 0,18±0,14 <sup>b</sup> | 0,03±0,04 <sup>c</sup> |
| <i>Acido acetico</i>      | 2,28±0,17 <sup>a</sup> | 0,56±0,15 <sup>b</sup> | 2,35±0,36 <sup>a</sup> |
| <i>Acido caproico</i>     | 0,08±0,01 <sup>b</sup> | 0,2±0,01 <sup>a</sup>  | 0,2±0,032 <sup>a</sup> |
| <i>Acido isovalerico</i>  | 0,05±0,00 <sup>c</sup> | 0,21±0,01 <sup>a</sup> | 0,29±0,03 <sup>a</sup> |

Nella tabella 8a viene mostrata la produzione di Acidi a fine fermentazione.

Dalla tabella si evince che la fermentazione sequenziale *M. pulcherrima*/S.

*cerevisiae* ha mostrato una produzione significativa di *acido nonanoico*. *T. delbrueckii/S. cerevisiae* ha invece mostrato una produzione significativa di *acido isobutirrico*. *S. cerevisiae* in fermentazione singola ha invece mostrato una produzione rilevante e significativamente superiore alle fermentazioni sequenziali di *acido esanoico* ed *acido ottanoico* ed *acido caprico*. Inoltre è evidenziato come sia la fermentazione sequenziale *T.delbrueckii/ S. cerevisiae* che la fermentazione singola *S. cerevisiae* abbiano mostrato un incremento significativo nella produzione di *acido caproico* ed *acido isovalerico*.

#### **4.4. Identificazione molecolare dei lieviti isolati in cantina**

La seconda parte del lavoro è stata improntata al fine di effettuare un controllo microbiologico sulle fermentazioni allestite in cantina.

Lo schema delle prove allestite è la seguente:

- **PROVA 1:** *T. delbrueckii* J401 (1x10<sup>6</sup> cell/mL)/ *S. cerevisiae* I4 (1x10<sup>6</sup> cell/mL)  
inoculato dopo 48h
- **PROVA 2:** *S. cerevisiae* I4 (1x10<sup>6</sup> cell/mL)
- **PROVA 3:** *S. cerevisiae* starter commerciale di controllo OKAY (1x10<sup>6</sup> cell/mL)

- **PROVA 4:** *M. pulcherrima* (M48) ( $1 \times 10^6$  cell/mL) / *S. cerevisiae* B4 ( $1 \times 10^6$  cell/mL)  
inoculato dopo 48h
- **PROVA 5:** *T. delbrueckii* (J401) ( $1 \times 10^6$  cell/mL) / *S. cerevisiae* B4 ( $1 \times 10^6$  cell/mL)  
inoculato dopo 48h
- **PROVA 6:** *M. fruticola* GAIA® ( $1 \times 10^6$  cell/mL) / *S. cerevisiae* B4 ( $1 \times 10^6$  cell/mL)  
inoculato dopo 48h
- **PROVA 7:** *T. delbrueckii* ALPHA® ( $1 \times 10^6$  cell/mL) / *S. cerevisiae* B4 ( $1 \times 10^6$  cell/mL)  
inoculato dopo 48h
- **PROVA 8:** *S. cerevisiae* B4 ( $1 \times 10^6$  cell/mL)

Lo scopo era quello di indagare eventuali contaminazioni da parte di *S. cerevisiae* nelle prime fasi del processo dove precedenti lavori ne avevano escluso la presenza ed attestare l'eventuale dominanza dei ceppi standard di *S. cerevisiae* inoculati nelle fermentazioni sequenziali. Il lavoro è stato reso possibile grazie all'amplificazione delle sequenze interdelta dei retrotrasposoni TY1 e TY2. È il metodo utilizzato per la caratterizzazione dei ceppi di *S. cerevisiae* in quanto la sequenza della

regione D1/D2, differisce più dell'1% tra specie diverse e meno dell'1% tra ceppi appartenenti alla stessa specie quindi consente di compiere una differenziazione all'interno dell'ampia varietà di specie di lieviti conosciute permettendo così la classificazione e l'identificazione molecolare degli isolati incogniti tramite i profili elettroforetici risultanti.

Il monitoraggio è stato effettuato isolando ceppi dalle diverse prove allestite, dopo l'inoculo dei lieviti . I risultati in percentuale sono mostrati nella tabella 9.

| <b>PROVE</b> | <b>%B4</b> | <b>%OKAY</b> | <b>% I4</b> | <b>%<br/>STARTER<br/>VARI</b> |
|--------------|------------|--------------|-------------|-------------------------------|
| <b>1</b>     | 80%        | //           | //          | 20%                           |
| <b>2</b>     | 26%        | 22%          | 21%         | 31%                           |
| <b>3</b>     | 11%        | 23%          | 35%         | 30%                           |
| <b>4</b>     | 100%       | //           | //          | //                            |
| <b>5</b>     | 75%        | //           | //          | 25%                           |
| <b>6</b>     | 30%        | 45%          | //          | 25%                           |
| <b>7</b>     | 63%        | //           | //          | 37%                           |
| <b>8</b>     | 70%        | //           | //          | 30%                           |

*Tabella 9; percentuali di dominanza dei ceppi isolati*

I risultati in tabella hanno mostrato, nella prova 1 una netta dominanza del ceppo *S. cerevisiae* B4 ritrovato nell'80% degli isolati. Il restante 20% ha mostrato dei profili non identificabili con nessuno dei ceppi usati come standard.

La prova 2 non ha mostrato una significativa dominanza di un ceppo rispetto ad un altro ma un lieve incremento, in termini di percentuali, di starter diversi da quelli noti.

La prova 4 ha mostrato una netta dominanza del ceppo *S. cerevisiae* B4.

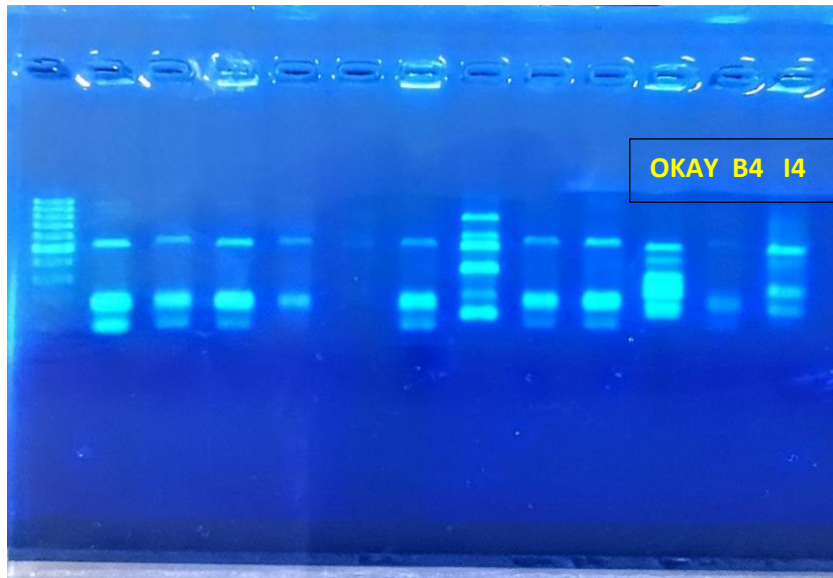
Anche nella prova 5, per il 75% degli isolati è stato riscontrato un profilo riferibile al ceppo standard *S. cerevisiae* B4.

Nella prova 6 il 45% degli isolati ha mostrato un profilo riconducibile al ceppo starter commerciale *S. cerevisiae* OKAY, in secondo luogo è stata isolata un percentuale del 30% di ceppi riconducibili al ceppo *S. cerevisiae* B4 e il restante 25% non è stato identificato come profilo affine ai tre standard utilizzati.

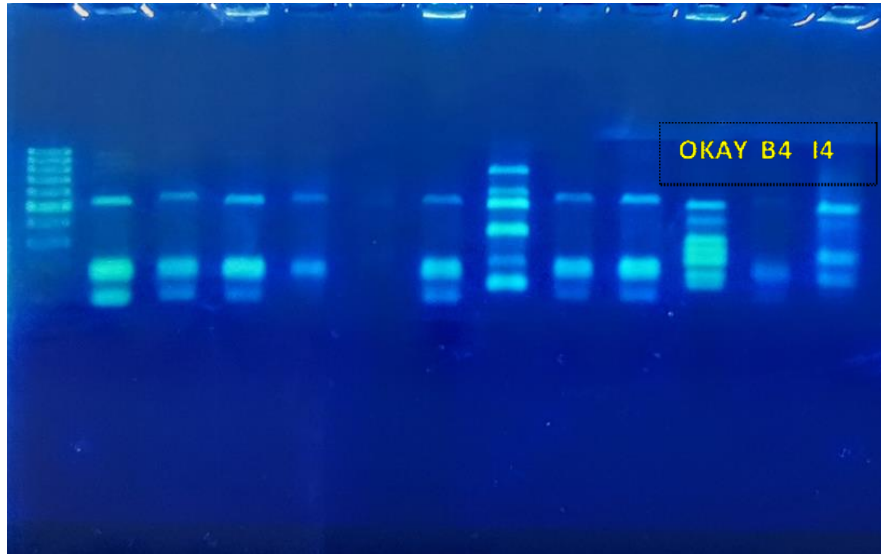
La prova 7 ha mostrato una dominanza significativa di ceppi riconducibili al *S. cerevisiae* B4, così come la prova 8 dove la dominanza del ceppo è identificata nel 70% degli isolati.

Di seguito sono mostrati alcuni dei risultati visualizzati dopo amplificazione e relativa elettroforesi su gel di agarosio. I profili dei ceppi isolati sono stati

opportunamente confrontati con i profili relativi agli standard utilizzati. (Fig. 9a e 9b)



*Fig 9 a; profilo elettroforetico isolati PROVA 7 confrontati con i profili elettroforetici di S. cerevisiae OKAY, B4, I4*



*Fig 9 a; profilo elettroforetico isolati PROVA 8 confrontati con i profili elettroforetici di S. cerevisiae OKAY, B4, I4*

## CAPITOLO 5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

### *Evoluzione della cinetica fermentativa*

Al fine di valutare l'effettivo contributo dei lieviti non-*Saccharomyces* nell'ambito della fermentazione mista è stata valutata l'evoluzione della cinetica fermentativa confrontando quella ottenuta dalle due fermentazioni sequenziali con quella propria del lievito *S. cerevisiae*. I risultati ottenuti hanno mostrato che, nonostante *S. cerevisiae* in coltura pura mostra una velocità maggiore nella produzione di CO<sub>2</sub> rispetto alle sequenziali la quantità in g/L di CO<sub>2</sub> svolta è la stessa. Questo risultato è in linea con le tesi presenti in letteratura. Canonico et al. (2017) in uno studio volto a studiare l'effetto di *T. delbrueckii*, sulla fermentazione, affermano che il lievito ha lievemente abbassato la cinetica di fermentazione del *S. cerevisiae* sequenziale, rispetto al *S. cerevisiae* in coltura pura. *M. pulcherrima* non ha inciso significativamente sulla velocità di produzione di CO<sub>2</sub> di *S. cerevisiae* sequenziale, andando perlopiù ad uniformarsi con la prova trattata con *T. delbrueckii*.



### ***Evoluzione della popolazione microbica***

L'influenza dei lieviti non *Saccharomyces* sull'evoluzione complessiva di crescita sembra essere correlata con le loro concentrazioni cellulari e la persistenza durante la fermentazione.

I risultati, in linea con gli esempi presenti in letteratura, hanno dimostrato la competitività dei lieviti non-*Saccharomyces* nel condurre il processo fermentativo. Tuttavia, nonostante entrambi i lieviti utilizzati nelle fermentazioni miste siano riusciti a svolgere il processo fermentativo, *M. pulcherrima*, già dopo pochi giorni non è stata più riscontrata significativamente nei controlli in piastra. Il risultato è in linea con gli studi presenti in letteratura. Ciani et al (2011) infatti avevano già confermato l'assenza di influenza di *M. pulcherrima* sulla velocità di crescita e fermentazione del ceppo di *S. cerevisiae*;

Questo non vale per *T. delbrueckii* che ha invece mostrato una competizione più elevata, andando pressappoco a raggiungere lo stesso livello di sopravvivenza di *S. cerevisiae* sequenziale. Seppur con minore vigore fermentativo rispetto a *S. cerevisiae* coltura pura, *T. delbrueckii* è risultato essere un buon competitor e quindi utilizzabile nelle fermentazioni come starter, pressappoco allo stesso modo di *S. cerevisiae*

### ***Evoluzione dei principali composti volatili***

I lieviti non *Saccharomyces* sono metabolicamente attivi durante le fermentazioni del mosto spontaneo e inoculato e, producendo una vastità di sottoprodotti, sono i responsabili principali della definizione dell'aroma del vino. È stato dimostrato che nelle fermentazioni miste lieviti *Saccharomyces* e non *Saccharomyces* non convivono passivamente ma sembrano invece interagire.

È stata valutata la produzione dei principali composti volatili sia al secondo giorno di fermentazione, dopo l'inoculo di *S. cerevisiae* sequenziale, che a fine del processo fermentativo. La sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae* ha mostrato la maggior produzione di esteri, in particolare l'*Etil acetato* e l'incremento nella produzione di acidi grassi. Il risultato ha confermato le tesi presentate in letteratura da diversi autori. Ciani et al (2011), per esempio, avevano già dimostrato l'effetto positivo sulle caratteristiche sensoriali della produzione massiva di acidi grassi derivante dalla fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/S. cerevisiae*.

*T. delbrueckii/S. cerevisiae* si è distinta per la produzione, in particolare di *Etil decenoato*, estere apolare che, come l'*etil acetato* dona un aroma fruttato ai vini giovani. *S. cerevisiae*, al secondo giorno di fermentazione si è distinto

particolarmente per la produzione di componenti ‘grasse’ come l’*acido ottanoico, acido esanoico e caprico* responsabili del decremento della torbidità del vino, strettamente correlato con l’incremento della componente aromatica fruttata, che è quella desiderata.

Per quanto riguarda la produzione di alcoli, *T. delbrueckii/S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* coltura pura hanno mostrato la maggior produzione di questi composti. In particolare, *alcol feniletile*, responsabile dell’aroma gradevole di rosa che contrasta la produzione di *1-propanolo*, responsabile invece dell’aroma pungente e considerato negativo nel prodotto.

I composti terpenici sono i principali responsabili dell’aroma floreale del vino. La fermentazione sequenziale *M. pulcherrima/ S. cerevisiae* ha prodotto la maggior parte dei terpeni. In particolare *Linalolo* e *alfa-Terpineolo*. I risultati hanno confermato i dati già presenti in letteratura sottolineando quindi il ruolo positivo dell’utilizzo dei lieviti non-Saccharomyces per la produzione di vini con aromi desiderabili. (Canonico et al, 2015)

La fermentazione del vino è un processo biologico complesso in cui i lieviti interagiscono con i composti presenti nel mosto d’uva. Per molti anni, la fermentazione è stata condotta spontaneamente dalla microflora naturalmente presente sulla superficie delle uve e residente nell’ambiente di cantina ove si succedevano diverse specie di lieviti, che vengono tradizionalmente divisi in

lieviti non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces cerevisiae*, che rappresenta il lievito vinario per eccellenza. La fermentazione spontanea è stata poi sostituita in tempi recenti, dalla fermentazione controllata, condotta utilizzando starter commerciali di *S. cerevisiae*. Questa garantisce un maggiore controllo della vinificazione, producendo vini con caratteristiche costanti e riproducibili. Nonostante i vantaggi della fermentazione controllata, l'utilizzo di colture pure di *S. cerevisiae* ha portato all'ottenimento di vini che mancano della complessità organolettica, che invece si osserva nei vini ottenuti dalla fermentazione spontanea, poiché ognuno dei lieviti che sviluppa in questo processo apporta il proprio contributo alle caratteristiche aromatiche del vino.

Il presente lavoro di tesi si è quindi posto l'obiettivo di rivalutare l'effetto dei lieviti non-*Saccharomyces*, in passato considerati 'spoilage', per la loro bassa efficienza di fermentazione e maggiore produzione di sostanze indesiderate rispetto a *S. cerevisiae*.

Nonostante non siano stati analizzati tutti i composti aromatici prodotti normalmente dai lieviti vinari, già questi risultati mettono in evidenza e confermano il ruolo preponderante dei lieviti non-*Saccharomyces* sul profilo organolettico del vino e la grande potenzialità delle colture starter miste non solo di *S. cerevisiae*, come strumento per esaltarne la componente aromatica e ottenere un prodotto finale estremamente peculiare.

### ***Identificazione molecolare dei lieviti isolati in cantina***

L'identificazione molecolare ha permesso di effettuare il controllo microbiologico di eventuali contaminazioni presenti in cantina da parte di *S. cerevisiae*. I risultati hanno mostrato che c'è un'effettiva contaminazione di *S. cerevisiae* in cantina. *S. cerevisiae* infatti non dovrebbe essere riscontrato nei primi momenti del processo fermentativo multistarter, in quanto la prima fase è sostenuta generalmente da lieviti non-*Saccharomyces*, poi sostituiti da *S. cerevisiae* quando il livello di zuccheri ed alcol aumenta. I risultati sono in linea con le tesi presenti in letteratura. Infatti, sebbene *S. cerevisiae* sia un lievito che partecipa alle fasi più prossime del processo fermentativo, alcuni autori si sono interrogati sulla presenza di una contaminazione di questa specie di lievito, specialmente per quanto riguarda l'ambiente cantina. In letteratura, Rosini (1984) aveva già dimostrato che, nei mesi successivi alla vinificazione, i lieviti *Saccharomyces*, responsabili della fermentazione, rimangono in cantina e colonizzano le superfici dei macchinari e della cantina stessa. Pretorius (2000) invece ha indicato che *S. cerevisiae* è la principale specie di colonizzatori della superficie della cantina.

*S. cerevisiae*, è il principale attore della trasformazione del mosto d'uva in vino. Si può riscontrare in tantissimi ambienti ma la sua presenza nell'ambiente

cantina e sugli acini d'uva è stata per molti anni controversa. Infatti le specie presenti in questi ambienti risultano essere in maggioranza lieviti non-*Saccharomyces*, lieviti apiculati i quali conducono una trasformazione in alcol molto più tumultuosa, fermentando anche il fruttosio e producendo quantità massive di acido acetico. Quando il contenuto di alcol nel mosto sale (5-6°), col procedere della fermentazione, i lieviti apiculati non resistono alla presenza del loro stesso rifiuto metabolico e soccombono, lasciando spazio alla conduzione del processo da parte di *S. cerevisiae*. L'effettiva presenza del lievito nell'ambiente cantina e sugli acini d'uva è ancora molto controversa. In questo lavoro se ne è confermata la massiva dominanza e contaminazione dell'ambiente. Tali risultati, confermano le tesi secondo cui le cellule possono passare agevolmente dalle superficie dell'ambiente cantina al mosto e viceversa, contaminando in maniera netta anche le attrezzature e le mani degli operatori. Questo apre nuove prospettive per quanto riguarda aspetti interessanti a livello di selezione genetica di nuove proprietà enologiche.

## CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA

- **Albergaria H. & Arneborg N. (2016)** *Dominance of Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions*
- **Baron M., Kumsta M., Prusova B., Sochor J., Tomaskova L.(2017)** *Terpene content of wine from the aromatic grape variety 'Irsai Oliver' (Vitis vinifera L.) depends on maceration time.*
- **Barker T., Borneman A., Curtin C., Varela. (2017)** *Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with Metschnikowia pulcherrima and Saccharomyces uvarum*
- **Bauer F.F. Du Toit M. (2007)** *Understanding Problem Fermentations – A review*
- **Beltran G., Guillamón J.M., Mas A. (2016)** *Non-conventional Yeast in the Wine Industry.*
- **Cacho, J.F., Escudero A., Fernandez V., Ferreira P., Pena C. (1995)** *Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young spanish wines by multivariate analysis. J. Sci.Food Agric. 67, 381-392*

- **Canonico L., Capece A., Ciani M. Comitini F., Romano P., Siesto G.** (2016). *Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation.*
- **Canonico L., Ciani M., Comitini F.** (2017) *Torulaspora delbrueckii contribution in mixed brewing fermentations with different Saccharomyces cerevisiae strains.*
- **Carpena M., Corral M. F., Garcia-Oliveira P., Nogueira R.A., Otero P., Prieto M.A., Simal-Gandara J.** (2021). *Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile*
- **Chitrakar B., Hu C., Jiawei C., Jie W., Xiaofang F., Yaqiong L., Ran S.** (2022) *Effects of spontaneous fermentation on microbial succession and its correlation with volatile compounds during fermentation of Petit Verdot wine. LWT - Food Science and Technology 168*
- **Ciani M., Comitini F., Domizio P., Gobbi M., Lencioni L.** (2011) *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae.*
- **Clemente-Jimenez J.M., Las Heras-Vazquez F.J., Martinez Rodríguez S., Mingorance-Cazorla L., Rodriguez-Vico F.** (2000) *Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation.*
- **David V., Hervé A., Maréchal R.T., Rousseaux S., Sadoudi M.** (2017) *Metschnikowia pulcherrima Influences the Expression of Genes Involved*



*in PDH Bypass and Glyceropyruvic Fermentation in Saccharomyces cerevisiae*

- **De Vero L., Giudici P., Solieri L.** (2011) *La selezione e il mito dei lieviti autoctoni. VIGNEVINI n° 4.*
- **Dharmadhikari M.**(1994) - *Vineyard Vintage View, Mo State University, 1994)*
- **Di Maio S., Oliva D., Polizzotto G.** (2017)*La microbiologia in cantina: un manuale per i controlli microbiologici.*
- **Domizio P., Rosi I., Vinella M.,** (2014). *Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin.*
- **Doneche B., Dubourdieu D., Lonvaud A., P. Ribereau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Doneche and A. Lonvaud,** (2006) *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition*
- **Graham H.**, (2008) *Wine yeasts for the future*
- **Guedes P., Hogg T., Mendes de Pinho F., Moreira N., Vasconcelos I.**(2008). *Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of Hanseniaspora uvarum and Hanseniaspora guilliermondii grown as pure and mixed cultures in grape must.*
- **Heard G.M.**(1999) *Novel yeasts in winemaking — looking to the future. Food Australia, 51: 347-352 ,1999*

- **Josè J., Maicas M. and S.,**(2016) *Application of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine-Making Process*
- **Larcher R., Nicolini G., Malacarne M., Mazzi E., Moser S., Romàn T.** (2011)  
*Torbidity of musts and aromaticity of white wines. Investigation in the interval 15-350 NTU Pag.1 www.infowine.com- Rivista internet di viticoltura ed enologia*
- **Larnbrechts M.G. and Pretorius I.S.,** (2000) *Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review*
- **Moschetti G., Nicola F.,** (2013)*I lieviti del vino Fiano di Avellino D.O.C.G.: tipicità attraverso le biotecnologie.*
- **Pretorius I.S., Rainieri S.**(2000) *Selection and improvement of wine yeasts. Annals of Microbiology, 50, 15-31 (2000)*
- **Pretorius I.S.** (2000) *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*
- **Rosini G.**(1984)*Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of Saccharomyces cerevisiae in wine-making*  
*J. Gen. Appl. Microbiol., 30 pp. 249-256*
- **Sicheri G.** (1998) *Industrie agrarie e agroalimentari. (1998). Hoepli pp.1-11*

- **Suzzi G.** *Microbiologia enologica, Edagricole-New Business Media, (2018)*
- **Tablino L.** (2011) *Il lievito in cantina: problemi pratici.*
- **Zamora F., Polo M.C. Moreno-Arribas M.V.**(2009) *Wine Chemistry and Biochemistry , Chapter 1 Biochemistry of Alcoholic Fermentation*

## ***Ringraziamenti***

Ringrazio il mio relatore, *prof. Maurizio Ciani*, la mia correlatrice *dott.ssa Laura Canonico* e la *dott.ssa Alice Agarbati* per la pazienza, la fiducia e per avermi insegnato tutto ciò che so.