



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI AUTOCTONI DI
SACCAROMYCES CEREVISIAE E IMPIEGO
DI *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA* IN
FERMENTAZIONE MISTA, PER LA PRODUZIONE
DI VINI BIOLOGICI.**

**CHARACTERIZATION OF *S. CEREVISIAE* NATIVE
STRAINS AND USE OF *M. PULCHERRIMA* IN MIXED
FERMENTATION TO PRODUCE ORGANIC WINES.**

Tesi di Laurea Magistrale
di:
Marco Sebastiani

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Francesca Comitini

Correlatore:
Alice Agarbati

Sessione Autunnale Ottobre 2024

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Il vino e il processo di vinificazione.....	4
1.2 Il vino verdicchio.....	6
1.3 I lieviti autoctoni.....	9
1.4 La fermentazione spontanea.....	11
1.5 Il lievito <i>S. cerevisiae</i> e l'evoluzione della microflora indigena durante il processo fermentativo	13
1.6 I lieviti non- <i>Saccharomyces</i> nel vino.....	17
1.7 <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	19
2. SCOPO DEL LAVORO.....	23
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1 Campagna di campionamento.....	25
3.2 Isolamento, identificazione e tipizzazione dei lieviti autoctoni <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	26
3.3 Allestimento di fermentazione su scala pilota	28
3.3.1 Produzione di biomassa di <i>M. pulcherrima</i>	28

3.3.2	Inoculo di <i>M. pulcherrima</i>	29
3.3.3	Preparazione del “Pied de cuve”	29
3.4	Monitoraggio delle fermentazioni	30
3.5	Analisi del vino finale	31
3.5.1	Caratteri analitici del vino finale	31
3.5.2	Composti secondari di fermentazione	32
3.5.3	Degustazione de vino finale	35
3.6	Analisi statistica	35
4.	RISULTATI	36
4.1	Tipizzazione dei lieviti <i>S.cerevisiae</i>	36
4.2	Evoluzione della biomassa e cinetica di fermentazione	39
4.3	Caratteri analitici del vino finale	42
4.4	Composti volatili nel vino	43
4.5	Analisi sensoriale del vino finale	46
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	48
6.	REFERENZE	51

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Vino E Il Processo Di Vinificazione

A partire dall'era dei popoli antichi e delle prime civiltà conosciute, fino ad arrivare al giorno d'oggi, si assiste alla presenza di una bevanda che accompagna ogni evento, passo storico e pasto, portando con sé quell'importanza sociale e quei caratteri che le permettono di essere al centro di ogni tavola e di ogni avvenimento sociale. Si tratta ovviamente del vino. La trasformazione dell'uva per la produzione del vino, infatti, è una pratica millenaria che abbraccia la nostra cultura e la nostra storia.

Dalla fermentazione del mosto dell'uva si ottiene il vino. L'uva è il frutto della vite (*Vitis vinifera*), che una volta giunta a maturazione viene raccolta e pigiata, per ricavarne il succo (o mosto), il quale viene fatto fermentare. Il mosto è infatti, un composto ad alta concentrazione zuccherina quindi un substrato ottimale per la fermentazione alcolica.

I passaggi della vinificazione sono diversi e rendono il processo molto complesso. Le differenze che si possono verificare tra un passaggio e l'altro danno anche una diversificazione nella tipologia di vino ottenuto. Questo spiega l'enorme varietà di vini che si possono trovare sul mercato. L'uva raccolta in vigneto subisce numerose fasi durante il processo di vinificazione. La prima operazione è la pigiatura delle uve, in cui viene separata la parte

liquida da quella solida (vinacce e vinaccioli). È seguita dalla diraspatura, ossia la separazione degli acini dai raspi. Le due operazioni possono avvenire contemporaneamente utilizzando delle macchine dette pigiadiraspatrici. A questo punto il mosto ottenuto viene lasciato riposare (fase di chiarificazione), fino alla fase successiva, ossia la fermentazione. Una volta convertiti gli zuccheri del mosto in alcol etilico, il vino ottenuto subisce un processo di affinamento o maturazione, in contenitori di acciaio o di legno e per un periodo di tempo variabile. Terminata la maturazione, il vino viene filtrato e imbottigliato, dove subirà un ulteriore periodo di affinamento (in bottiglia) prima di essere consumato o immesso sul mercato (Figura 1) (Leder, 2020).



Figura 1: Fasi del processo di vinificazione (Leder, 2020).

Ad influenzare l'aroma del vino finale, oltre alle tecniche di produzione, determinanti sono le condizioni in cui il vigneto è coltivato. Il tutto influisce sulle caratteristiche organolettiche dell'uva e quindi del prodotto finale: dal colore al contenuto zuccherino, dai sentori aromatici al gusto.

Non meno importante è l'influenza delle caratteristiche climatiche che a sua volta influenza la comunità microbica presente sulla superficie dell'uva. Numerosi studi hanno evidenziato come la comunità microbica presente sull'uva è abbondantemente influenzata dalle condizioni pedoclimatiche (ambiente, clima, esposizione) e dalla regione in cui viene coltivato il vitigno, così come ne è influenzato il processo fermentativo e a sua volta il risultato finale (Barata et al., 2012) Questo fa sì che lo studio delle interazioni microbiche tra varie specie e con l'ambiente, può essere determinante ai fini di ottenere un vino con tratti particolari, talvolta distintivi e di sicuro ricercati dalle aziende vitivinicole. D'altra parte, l'intervento sulla comunità microbica permette di gestire fasi importanti della vinificazione.

1.2 Il Vino Verdicchio

Il vino Verdicchio origina dall'omonimo vitigno, uno dei vitigni bianchi più importanti e apprezzati d'Italia, coltivato principalmente nella regione Marche,

in particolare nelle colline a cavallo tra la provincia di Ancona e quella di Macerata. Ha radici antiche, con documentazioni che ne attestano la coltivazione già nel Medioevo. Produce vini di grande qualità che si distinguono per le loro caratteristiche organolettiche uniche: è noto per il suo profilo aromatico, che al naso offre un bouquet complesso e accattivante, con sentori di fiori bianchi, frutta fresca (mela verde, pera, agrumi) e note erbacee. Spesso, emergono anche sfumature di mandorla amara, tipiche del vitigno. La sua struttura è oleosa e avvolgente, con una freschezza vibrante dovuta alla sua elevata acidità.

Si riconoscono due tipi di Verdicchio: il Verdicchio dei Castelli di Jesi e il Verdicchio di Matelica. Per entrambi vale l'etichetta DOC (denominazione origine controllata) ad indicare e certificare un vino di qualità le cui caratteristiche sono attribuibili alle peculiarità della zona di produzione (DISCIPL. "VERDICCHIO DEI CASTELLI DI JESI" Approvato con DPR 11.08.1968, mod. DM 07.11.2014). Per ottenere l'etichetta, infatti, la produzione deve seguire le regole di uno specifico disciplinare e il processo di coltivazione e vinificazione deve avvenire in una determinata area geografica. In particolare, si tratta della Valle Esina, attraversata dal fiume Esino, una zona che porta con sé influenze climatiche sia dalla montagna, che dal mare,

donando al vino i caratteristici aromi e sentori gustativi. (Figura 2a)
(<http://www.verdicchio.it>) – (<https://www.quattrocalici.it>).

Ne deriva che le complesse condizioni climatiche influenzano anche la composizione della popolazione microbica che naturalmente colonizza l'uva, soprattutto quella lievitifforme, e quindi la loro partecipazione alla fermentazione alcolica, con impronta caratterizzante gli aspetti chimici e sensoriali del vino Verdicchio.

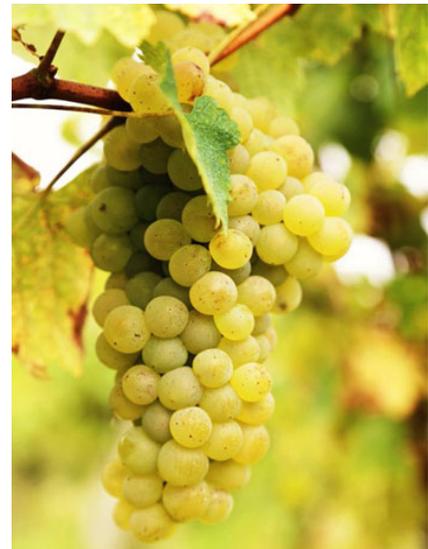


Figura 2a: area geografica Verdicchio dei Castelli di Jesi.

Figura 2b: Grappolo di un vitigno Verdicchio

(<https://www.agraria.org/vini/verdicchiodeicastellidijesi.html>)

1.3 I Lieviti Autoctoni

Per lieviti autoctoni si intendono quei lieviti che naturalmente si ritrovano nell'uva, ma anche nel vigneto, sulle attrezzature e più in generale nel mosto e nella cantina. Questi possono appartenere a diverse specie e possono subire un processo di selezione naturale sulla base di determinanti ecologici e parametri tecnologici (Ciani et al. 2009) fino a ritrovarsi vivi e vitali, in alcuni casi, sino al momento del processo di vinificazione. Ad oggi, la componente microbica autoctona è un importante argomento di studio da parte del settore enologico e della ricerca. I motivi sono vari, e sono principalmente legati alla partecipazione dei suoi componenti nelle fermentazioni durante il processo di vinificazione. Infatti, l'intera microflora vinicola contribuisce alla chimica del vino, ma un ruolo predominante spetta ai lieviti, i quali sono i principali protagonisti della fermentazione alcolica. La biodiversità di questi ceppi viene sempre più associata all'area di lavorazione, a sostegno dell'idea che i lieviti autoctoni possono essere associati ad uno specifico "*terroir*" (Bokulich et al. 2014; Gilbert et al. 2014) che può essere definito come un'area ben delimitata, dove le condizioni naturali, fisiche e chimiche del terreno, la zona geografica e il clima influenzano le caratteristiche del vino finale. Le tecniche agronomiche hanno grande influenza sulla biodiversità microbica, queste giocano un ruolo importante nella riduzione dei lieviti considerati spoilage

(alterativi), che si ritrovano nel processo di vinificazione e che portano caratteri finali negativi. Infatti, non tutti i lieviti autoctoni e indigeni hanno effetto positivo, molti sono utili in quanto possono dare l'avvio della fermentazione, altri invece sono da evitare. Non tutti, infatti operano trasformazioni favorevoli alla qualità del vino, ad esempio il *Brettanomyces* è un particolare lievito contaminante particolarmente pericoloso, per la produzione di una sgradevole molecola odorosa responsabile di un intenso odore di sudore di cavallo conosciuto anche come carattere "Brett" (Renouf et al.,2007).

Uve apparentemente sane sono colonizzate non solo da lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, il cui ruolo è di primaria importanza nel processo di fermentazione alcolica, ma anche da molte altre specie lievitiforimi, ognuno con caratteristiche tecnologiche diverse, tra le più importanti: i lieviti apiculati debolmente fermentanti, ad esempio *Hanseniaspora spp.*, alcuni filmogeni come *Pichia spp.*, i lieviti ossidativi come *Candida spp.*, ed altri lieviti fortemente fermentanti come *Torulaspora spp.*, *Metschnikowia spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Lachancea spp.*

I lieviti considerati spoilage fanno parte anch'essi della comunità microbica e i più importanti sono: *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces spp.*

1.4 La Fermentazione Spontanea

La fermentazione spontanea è un processo non controllato, messo in atto da lieviti e microrganismi naturalmente presenti in cantina e sulle uve (detti autoctoni o indigeni), senza l'inoculo di ceppi commerciali selezionati. È una pratica che veniva sfruttata fin dall'origine delle produzioni enologiche (probabilmente la prima produzione, quindi la scoperta, si ottenne per eventi casuali, come è stato per altri cibi fermentati). Nel corso degli anni, la fermentazione spontanea è stata gradualmente sostituita dalla cosiddetta fermentazione controllata. Quest'ultima prevede l'utilizzo di colture pure, selezionate, di lievito *S. cerevisiae* (starter commerciali), che garantiscono alcuni vantaggi tecnologici e produttivi durante la vinificazione. I lieviti commerciali, infatti permettono di avere un maggiore controllo del processo di vinificazione ottenendo così vini con caratteristiche riproducibili, costanti e privi di difetti olfatto-gustativi. Tuttavia, il massiccio impiego di colture starter selezionate come avviatori di fermentazione ha portato all'appiattimento sensoriale dei vini, che sono risultati sempre più uniformi e privi di complessità organolettica. Quest'ultima risulta invece la prerogativa caratteristica dei vini ottenuti dalla fermentazione spontanea, in quanto ciascuno dei lieviti presenti come popolazione spontaneamente presente nell'uva e in cantina, sviluppa prodotti secondari di fermentazione unici che possono contribuire

positivamente alle caratteristiche aromatiche del vino. Per questi motivi assistiamo sempre di più ad un ritorno alla fermentazione spontanea per ottenere un vino che presenti caratteristiche riconoscibili, ma anche nell'obiettivo di produrre dei vini che seguano i disciplinari della produzione biologica, o addirittura naturale.

Ad oggi è ben noto il ruolo dei lieviti, se ne conosce la sua capacità fermentativa, e la capacità di produrre composti secondari di fermentazione, con i vari esiti (positivi e negativi) che questi portano con sé.

Tuttavia, la ricerca sta avanzando anche con l'obiettivo di definire i comportamenti e il contributo della microflora enologica, soprattutto quello del lievito autoctono *S. cerevisiae* da poter sfruttare nella vinificazione. Si ha una visione molto più ampia su quanto riguarda il suo contributo al processo fermentativo. Ciò permette di poter arrivare ad una relazione stretta tra il processo fermentativo spontaneo e la selezione di lieviti autoctoni in grado di conferire caratteri sensoriali ricercati nel vino e allo stesso tempo evitare gli aspetti enologici negativi che la fermentazione non controllata potrebbe presentare.

1.5 Il lievito *S. Cerevisiae* e l'evoluzione della microflora indigena durante il processo fermentativo.

S. cerevisiae è un lievito unicellulare, fondamentale nel processo di fermentazione del mosto, di cui è il “motore biologico”. Durante la fermentazione alcolica, in assenza di ossigeno, questo lievito converte gli zuccheri presenti nel mosto in alcol etilico (etanolo) e anidride carbonica (CO₂), liberando anche calore ed altri composti e sostanze aromatiche (acidi organici, glicerolo, esteri, aldeidi e composti fenolici) che contribuiscono al profilo organolettico della bevanda. *S. cerevisiae* è noto quindi per la sua efficienza fermentativa, data dalla rapidità e affidabilità nella fermentazione, dalla capacità di tollerare alte concentrazioni di etanolo (fino al 15-18% in volume) e alte concentrazioni zuccherine. È in grado, inoltre, di sopravvivere e proliferare in ambienti con diverse condizioni di stress, temperature e gradi di acidità variabili. Queste capacità di adattarsi a diverse condizioni ambientali e tecnologiche sono sicuramente conferite anche dall'esistenza di numerosi ceppi diversi appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, i quali si differenziano per doti e adattamenti diversi. Nei campionamenti ambientali in cantina, è possibile ritrovare gli stessi ceppi, in diverse annate, altri risultano essere “nuovi”, a dimostrazione di un'evoluzione microbica sempre attiva. Questi ceppi di *S. cerevisiae* possono avere un genotipo nuovo e possono essere caratterizzati da

uno specifico profilo di metaboliti secondari. Tale ragione porta allo studio dei nuovi genotipi di questi lieviti attraverso analisi molecolari e prove di microfermentazione che evidenziano le proprietà e i tratti distintivi che gli stessi conferiscono ai caratteri aromatici del vino. I lieviti indigeni che colonizzano una medesima cantina per diverse annate determinano una caratterizzazione organolettica al prodotto finale in questione, a supporto dell'idea del cosiddetto "effetto vinario" (Agarbaty et al., 2024). Questo concetto può essere esteso anche a livello di territorio. Questo è dovuto probabilmente ad un migliore adattamento di questi lieviti alle gestioni enologiche della cantina, ma anche all'ambiente e alle pratiche agronomiche.

Conoscere le proprietà dei vari ceppi di *S. cerevisiae* permette di sfruttare questi lieviti nel processo di vinificazione, sia per raggiungere obiettivi qualitativi, sia per superare i problemi che si possono avere durante la fermentazione. Tuttavia, nella vinificazione (e ancor prima in vigneto) si assiste ad una colonizzazione microbica molto più complessa, in cui diverse specie lievitifforme e batteriche si susseguono prendendo parte al processo fermentativo e conferiscono il loro apporto specifico.

L'uva è una delle principali fonti di microrganismi per la produzione del vino (si stima che sulla superficie dei grappoli la popolazione microbica raggiunga valori di 10^3 - 10^5 UFC/g). La popolazione dei lieviti è piuttosto scarsa negli

acini immaturi, ma aumenta progressivamente all'aumentare del grado di maturazione dell'uva, raggiungendo una concentrazione di 10^4 - 10^6 UFC/g e principalmente rappresentati dai generi *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Aureobasidium*). Sui grappoli maturi i lieviti che colonizzano spontaneamente la superficie delle bacche d'uva sono principalmente *Hanseniaspora spp.*, *Kloeckera* e *Metschnikowia spp.* che rappresentano il 50-75% della popolazione. Sono presenti anche *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (Clavijo et al., 2010). Come già detto, sono molti i parametri che influenzano la composizione della microflora delle uve come il “*terroir*”, le tecniche agronomiche che vengono eseguite durante la coltivazione, e parametri biologici, come ad esempio insetti e uccelli che determinano la rottura dell'acino e la fuoriuscita del succo, diventando così un substrato ideale per un incremento della popolazione microbica.

È evidente che in questa prima fase il lievito *S. cerevisiae* sia ancora assente o presente in concentrazioni molto basse, ma una volta che l'uva viene pigiata, e si ottiene il mosto, in quest'ultimo se ne ritrova una quantità maggiore rispetto a quelli presenti nell'uva. È determinante, infatti, il contributo che forniscono le attrezzature utilizzate e l'ambiente cantina. L'inizio della vinificazione porta

con sé delle differenze che vanno a modificare l'ecologia microbica, con lo sviluppo sequenziale di alcune specie di lieviti, che verranno man mano sostituite con altre più adatte alle condizioni che si vengono a creare. Tutto questo procede fino a quando la fermentazione alcolica crea un ambiente adatto alla proliferazione di poche specie, in prevalenza *S. cerevisiae*. In particolare, nelle prime fasi della fermentazione alcolica predominano lieviti caratterizzati da una debole attività fermentativa, appartenenti ai generi *Candida* e *Hanseniaspora*. Con il procedere della fermentazione si assiste alla diminuzione dei lieviti non-*Saccharomyces*, e alla predominanza del lievito *S. cerevisiae* fino al termine del processo. Infatti, con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consentendo in tal modo ai lieviti *Saccharomyces*, dotati di un maggiore potere alcoligeno, di prendere il sopravvento, e portare a compimento la fermentazione. (Giovanna Suzzi e Rosanna Tofalo-Microbiologia enologica-2018) (Figura 3).

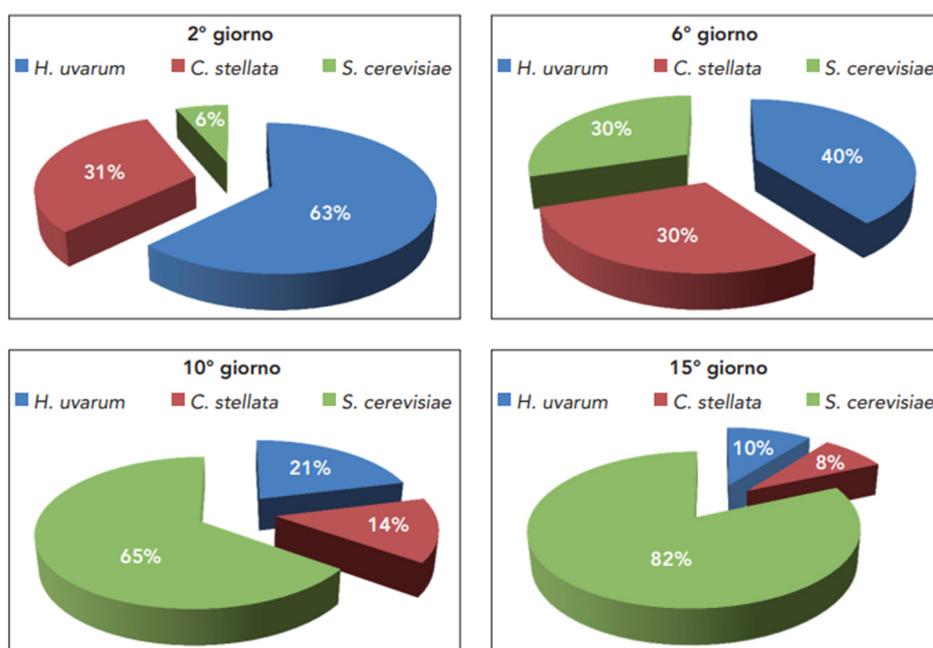


Figura 3 - Evoluzione delle specie *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata* e *S. cerevisiae* durante la fermentazione spontanea di mosto (Suzzi e Tofalo, 2018)

1.6 I lieviti non-*Saccharomyces* nel vino

Diversi studi hanno attribuito un importante contributo delle specie di lievito non-*Saccharomyces* alle dinamiche di crescita dei lieviti durante le fermentazioni vinicole, nonché al prodotto finale. Essi rappresentano la componente più abbondante in alcune fasi del processo di vinificazione. Negli ultimi anni, infatti, il loro interesse a livello enologico è cresciuto molto, in quanto ad oggi sappiamo che ognuna di queste specie possiede un ruolo all'interno del processo di vinificazione. I lieviti non-*Saccharomyces* si

ritrovano nelle uve e nel mosto, e si è visto che hanno un ruolo essenziale nell'iniziare la fermentazione. Di fondamentale importanza sono le interazioni interspecifiche che questi lieviti prendono all'interno della microflora vinaria, le quali determinano le dinamiche di crescita dei vari lieviti durante le fermentazioni. Pertanto, le specie di lievito non-*Saccharomyces* rappresentano un fattore di diversità che richiede studi specifici e la capacità di controllarne lo sviluppo, sia per evitare conseguenze negative, sia per sfruttare il loro potenziale positivo (Jolly et al., 2003). Ogni specie può contribuire in modo diverso al miglioramento o deprezzamento delle qualità del vino, quindi appare chiaro il motivo per cui anche le specie non-*Saccharomyces* sono considerate una risorsa biotecnologica importante (Capozzi et al., 2015).

Dal metabolismo di questi lieviti si ottengono metaboliti riconducibili ad alcune categorie come: alcoli superiori, acidi organici, esteri, aldeidi, acidi grassi e composti solforati. Questi sottoprodotti del metabolismo influiscono direttamente sulla qualità e sulle proprietà organolettiche del vino.

Per fare un esempio dell'impronta notevole che questi metaboliti apportano alle caratteristiche del vino, è possibile citare l'acidità volatile il cui 90% è data dall'acido acetico (limite legale di 1,2 g/l⁻¹). A concentrazione di 0,8 g/l⁻¹ conferisce già un sapore acido, dannoso per il vino (aroma di aceto) (Bely et

al., 2003). I lieviti non-*Saccharomyces* producono acido acetico in concentrazioni variabili: alcuni ceppi di *Kloeckera apiculata* producono tra 1 e 2,5g/l⁻¹, *Candida stellata* tra 1 e 1,3 g/l⁻¹, *Hansenula anomala* tra 1 e 2 g/l⁻¹ (Fleet e Heard 1993; Renault et al., 2009). Questi possono essere confrontati con le quantità di acido acetico prodotti, ad esempio, da *S. cerevisiae* che varia nell'intervallo tra 0,3-1, g/l⁻¹ (Fleet e Heard, 1993).

Al pari dell'acidità volatile, la produzione di numerosi altri metaboliti andrà a conferire note aromatiche e sentori che si manifesteranno poi nel vino prodotto.

1.7 *Metschnikowia pulcherrima*

Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, uno dei più noti a livello enologico è senza dubbio *Metschnikowia pulcherrima*. Esso è un lievito comunemente presente in natura, in particolare può essere isolato da uva, ciliege, frutti avariati e fiori. La superficie dell'acino d'uva rappresenta un habitat ottimale ricco di sostanze nutritive, per questo lo ritroviamo di frequente nel mosto e nei successivi processi di vinificazione fino ad arrivare alle prime fasi di fermentazione. Tra i lieviti non-*Saccharomyces*, *M. pulcherrima* è uno dei più studiati per il suo molteplice contributo alla vinificazione. Presenta diversi ruoli biotecnologici positivi al processo e in particolare può: i) modulare la sintesi di metaboliti

secondari per migliorare il profilo sensoriale del vino, ii) agire come agente di biocontrollo verso altri microrganismi indesiderati (Varela et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Per quanto riguarda il profilo sensoriale del vino, è stato osservato che durante una fermentazione mista che vede coinvolti sia lieviti *Sacchamomyces* che non-*Saccharomyces*, l'impiego di *M. pulcherrima* determina:

1. un aumento del tiolo 4-MSP (4-metil-4sulfanylpentenal-2-one) al di sopra della soglia sensoriale. Questo composto solforato è presente a livelli estremamente bassi nel vino; tuttavia, sono potenti odoranti e hanno soglia sensoriale estremamente bassa. Il 4-MSP conferisce al vino sentori aromatici della pianta di bosso e del frutto della passione. (Swiegers *et al.*, 2007);
2. possiede attività enzimatiche come pectinasi, proteasi, glucanasi, lichenasi, β -glucosidasi, cellulasi, xinalasi, amilasi, solfito reduttasi, lipasi e attività β -litica. Queste attività permettono il rilascio di amminoacidi all'interno del vino che servono da nutrimento per *S. cerevisiae* (Marangon et al., 2012), il quale trae beneficio dall'associazione con *M. pulcherrima*. L'attività della glucosidasi invece promuove il rilascio di aromi nel vino;

3. una riduzione dell'acidità volatile con variazioni stimate tra il 10% e il 75% (Hranilovic et al., 2020; Roca-Messa et al.,2020).

L'attività di biocontrollo di *M. pulcherrima* invece è conferita alla produzione di pulcherrimina (un pigmento che in coltura su piastra assume una colorazione rossa derivante dalla deplezione del ferro) (Figura 4), che possiede attività antifungina (Csutak et al2013; Oro et al., 2018). È proprio la sottrazione dello ione ferro che determina un ambiente ostile alla crescita di microrganismi che necessitano di questo metallo per il loro sviluppo. I lieviti maggiormente colpiti dal suo effetto antimicrobico sono diversi: *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, *Brettanomyces/Dekkera*, i generi *Hanseniaspora* e *Pichia*, i funghi *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Monilia spp.*

È essenziale sottolineare che la sua attività antifungina non influenza invece l'attività fermentativa di *S. cerevisiae*.

Sono questi i principi per cui *M. pulcherrima* desta un interesse sempre maggiore nell'industria vinaria.

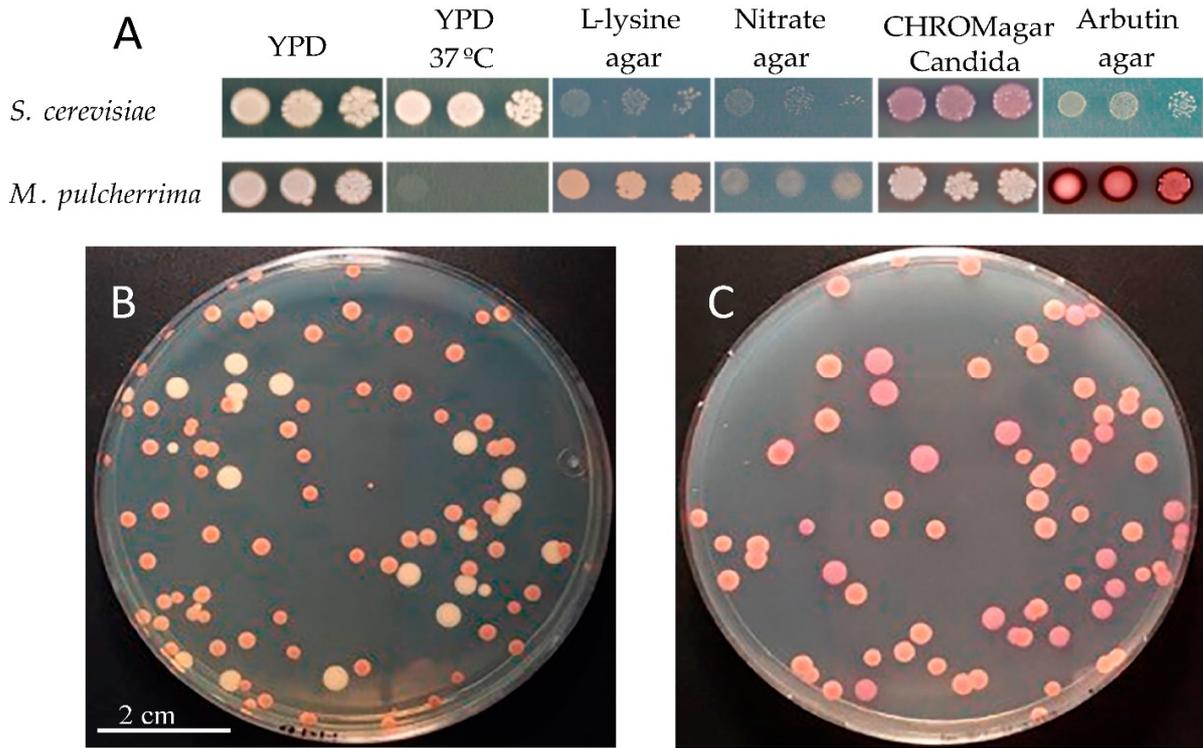


Figura 4. Colonie di *M. pulcherrima* (colonie rosse) e di *S.cerevisiae* (colonie bianche) in terreno YPD (Morata et al., 2019).

2. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di isolare e caratterizzare ceppi diversi di lieviti vinari autoctoni, appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, naturalmente presenti in una cantina che non fa uso di ceppi starters commerciali. L'obiettivo è stato raggiunto isolando i ceppi e allestendo fermentazioni su scala pilota e analizzando successivamente, i caratteri enologici e sensoriali dei vini ottenuti. Nello specifico, 66 lieviti autoctoni sono stati isolati dai campionamenti effettuati sulle uve, sul piede di fermentazione, in cantina e sulle attrezzature utilizzate. Successivamente sono stati biotipizzati con lo scopo di analizzare il numero di genotipi diversi per avere una stima della biodiversità presente in cantina e definire quali ceppi colonizzavano il piede di fermentazione e dominava il processo fermentativo.

Parallelamente, è stata allestita una prova di fermentazione mista inoculando un ceppo isolato precedentemente e facente parte della collezione DiSVA appartenente alla specie *M. pulcherrima* in pre-chiarifica del mosto su cui è stato inoculato anche un piede di fermentazione prodotto in precedenza. La prova aveva lo scopo di valutare l'effettivo ruolo di biocontrollo del ceppo non-*Saccaromyces* ed ipotizzare una possibile riduzione dell'utilizzo di anidride solforosa, antisettico convenzionale utilizzato per il controllo dei

microorganismi spoilage. È stato infine valutato il contributo aromatico di *M. pulcherrima* sul prodotto finale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campagna di campionamento

Una buona campagna di campionamento consente di rilevare quali ceppi di *S. cerevisiae* popolano l'ambiente e intervengono nel processo di vinificazione. Questa è stata effettuata, nella cantina, sulle attrezzature utilizzate durante la vinificazione, sulle vinacce, sul " *ped de cuve* " e su mosto in fermentazione. In particolare, prima della vendemmia, i campionamenti sono stati effettuati su 3 serbatoi diversi, sui muri della zona dei serbatoi, sui pavimenti davanti alla pressa, sulla diraspatrice, e tra gli interstizi tra muri e pavimenti. Durante la vendemmia, i campionamenti sono stati ripetuti, compresi campioni vinacce. Il campionamento delle attrezzature e della cantina viene effettuato attraverso dei tamponi sterili, strisciati su superfici casuali di 10 cm² (Figura 5).

Le vinacce campionate invece sono state raccolte e inserite in sacchetti sterili, infine sono stati prelevati 50 mL di mosto in fermentazione attraverso dei contenitori sterili.

Tutti i campioni vengono conservati in ghiaccio durante il campionamento e trasportati in laboratorio il prima possibile per l'isolamento e l'identificazione di *S. cerevisiae*.

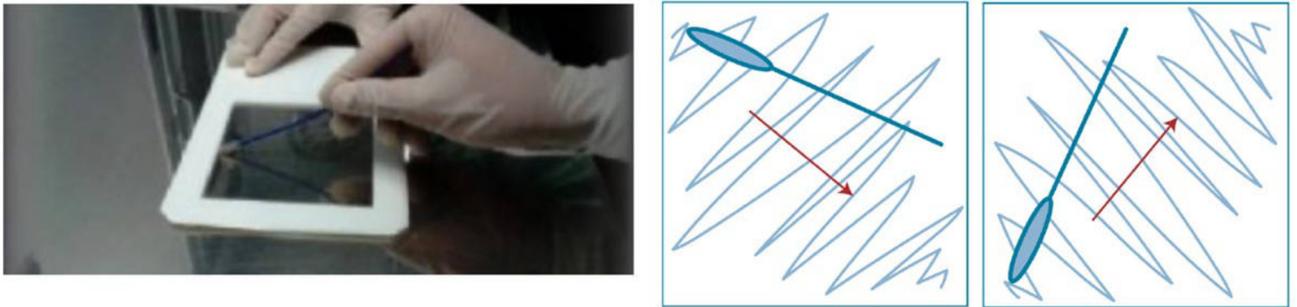


Figura 5. campionamento su superficie con tamponi. (<https://www.techno-one.it>).

3.2 Isolamento, identificazione e tipizzazione dei lieviti autoctoni *S. cerevisiae*.

I campioni raccolti sono stati processati in laboratorio: nel primo step il tampone di cotone è stato immerso in 10 mL di acqua sterile e agitato per 20 minuti a 120 rpm su uno shaker MAXQ 4450 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), per consentire il trasferimento dei microrganismi dal tampone alla soluzione.

I campioni di vinacce sono stati pressati manualmente e messi in agitazione con le stesse condizioni appena descritte.

I campioni di mosto in fermentazione sono stati sottoposti a diluizioni seriali.

Successivamente, tutti i campioni sono stati seminati su terreno di coltura WL (Wallerstain Laboratories, Oxoid, Hampshire, Regno Unito) con aggiunta di cloramfenicolo allo 0,005% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) per

sopprimere la crescita dei batteri (Agarbati et al., 2022). Tutte le piastre sono state incubate a 25 °C per 5 giorni. Sulla base della tipica macro- e micro-morfologia, ogni presunta colonia di *S. cerevisiae* è stata purificata su terreno di coltura YPD agar (estratto di lievito 1%, peptone 2%, D-glucosio 2% e agar 1,8%), fino ad ottenere la colonia isolata.

Una volta ottenute le colonie di lievito isolate, si prosegue all'identificazione delle stesse attraverso l'analisi del DNA genomico. Il DNA è stato estratto a 95 °C per 10 min mediante utilizzo di un termociclatore e poi utilizzato per allestire una reazione di amplificazione di PCR utilizzando i primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTCGCG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3'), seguendo la procedura riportata da Esteve-Zaroso et al.,2003

Attraverso l'utilizzo dei primer $\Delta 12-21$ (delta12: 5-TCAACAATGGAATCCCAAC-3; delta21: 5-CATCTTAACACCGTATATGA-3) è stata eseguita l'analisi di tipizzazione molecolare con lo scopo di analizzare le differenze a livello di ceppo della popolazione di *S. cerevisiae* identificata. Il ciclo di PCR è stato eseguito come segue: 3 minuti a 95°C; seguiti da 25 minuti a 94°C, 30 secondi a 45°C, 30 secondi a 50°C, e 90 secondi a 72°C, tutti vengono ripetuti per 9 cicli, poi 25 secondi a 94°C, 30 secondi a 50°C, e 90 secondi a 72°C ripetuti per 21 cicli.

Alla fine dei cicli c'è un'ulteriore fase di 10 minuti a 72°C (Legras e Karst 2003).

Tutti gli ampliconi ottenuti vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% (1.5g di agarosio in 100 mL di tampone TBE), 66V per 90 minuti in 0.5× TBE buffer. I differenti profili ottenuti dalle analisi interdelta definiscono i diversi biotipi dei *S.cerevisiae* trovati.

3.3 Allestimento di fermentazione su scala pilota.

3.3.1 Produzione di biomassa di *M. pulcherrima*

Il ceppo di *M. pulcherrima* DiSVA46 appartiene alla collezione di dipartimento (Università politecnica delle Marche, dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente). La biomassa del ceppo è stata ottenuta da preculture in terreno YPD modificato (0.5% estratto di lievito, 0.1% di peptone e 2% glucosio). È stata coltivata per 48 h a 25°C in un agitatore orbitale (150 giri/minuto). Dopodiché le preculture sono state usate come inoculo in un bioreattore (Biostat® C; B. Braun Biotech Int., Goettingen, Germany), contenente 25L dello stesso terreno YPD modificato. La biomassa ottenuta è stata poi raccolta attraverso centrifugazione, sono stati effettuati lavaggi con acqua distillata sterile ed infine stoccata a 4°C fino al suo inoculo.

3.3.2 Inoculo di *M. pulcherrima* in pre-chiarifica del mosto

26 hL di mosto Verdicchio sono stati utilizzati per effettuare due prove di fermentazione di 13 hL ciascuna. Il mosto Verdicchio aveva le seguenti caratteristiche: contenuto zuccherino iniziale, 256 g/L; pH 3.09; acidità totale 5.17 g/L; e l'azoto assimilabile (YAN), 9 mgN/L.

In fase di pre-chiarifica del mosto, una prova è stata inoculata con *M. pulcherrima* ad una concentrazione di 1×10^6 cell/mL e mantenuto a 10 °C per 24 h. La seconda prova è stata mantenuta alle stesse condizioni ma non è stato inoculato alcun lievito ed usata come controllo. Dopo 24 h di chiarifica del mosto, l'azoto assimilabile dal lievito (YAN) è stato portato ad una concentrazione finale di 250 mgN/L, attraverso l'aggiunta di fosfato di ammonio e scorzette di lievito (Genesis Lift® Oenofrance, Bordeaux, France) e infine inoculato con un piede di fermentazione ("*ped de cuve*").

3.3.3 Preparazione del "*ped de cuve*"

Sono stati raccolti 100 kg di uva sana e quindi deraspata e pigiata secondo i protocolli standard. Il mosto ottenuto è stato chiarificato (a 10 °C per 24 ore) con l'aggiunta di enzimi e bentonite (MICROCOL ALPHA, laffort), senza aggiunta di SO₂. Effettuato l'inoculo di *M. pulcherrima* il tino è stato fatto

fermentare per 2 giorni e utilizzato per inoculare i mosti di entrambe le prove (prova con *M. pulcherrima* e prova di controllo).

3.4 Monitoraggio delle fermentazioni

3.4.1 Conta microbiologica e sua evoluzione

Durante le fermentazioni sono stati raccolti dei campioni per valutare l'evoluzione della biomassa attraverso conta vitale su piastra utilizzando terreno Agar lisina (Oxoid, Hampshire, UK), che consente la distinzione dei lieviti *Saccharomyces* dai lieviti non-*Saccharomyces*, e WL nutrient agar (Oxoid, Hampshire, UK), un terreno differenziale che permette il riconoscimento delle diverse colonie di lievito. Le piastre sono state incubate a 25°C per 48-72 h tempo necessario per lo sviluppo dei lieviti su piastra e poi contate riportando il valore in UFC/mL. Questa analisi è stata ripetuta a più tempi durante tutto l'intero processo fermentativo (al momento dell'inoculo, al secondo giorno di fermentazione, e successivamente ai giorni: 4, 5, 6, 8, 12, 14, 18, 20 di fermentazione).

3.5 Analisi del vino finale

3.5.1 Caratteri analitici del vino finale

Per la determinazione dell'etanolo il campione da analizzare è stato preparato mediante la filtrazione di una piccola aliquota di fermentato (10 mL) con filtro cut-off 0,2 μm . Al filtrato sono stati aggiunti 100 μL 1-pentanololo come standard. Da ogni campione di vino già filtrato sono stati prelevati 1 μL di preparato, attraverso una siringa, e sono stati così iniettati direttamente nel gas cromatografo utilizzando la colonna Zebron ZB-WAX Plus, secondo il protocollo:

- Temperatura dell'iniettore: 150°C;
- Colonna Zebron ZB-WAX plus in polietilenglicole (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm);
- Iniettore: split 10:2; iniettato 1 μL di campione;
- Temperatura: 40°C per 5 minuti fino a 150°C, poi 5°C per 5 minuti fino a 220°C, infine 20°C per 2 minuti;
- Gas vettore: Azoto

Le analisi dei principali caratteri come: Acidità totale, Zuccheri residui, pH, Acidità volatile, SO₂ totale e quantità di acido malico totale, sono state effettuate in accordo con i metodi ufficiali europei (2000).

3.5.2 Composti secondari di fermentazione

I composti volatili acetaldeide, acetato di etile, l'n-propanolo, l'isobutanolo, gli alcoli amilici ed isoamilici e l'acetoino ed altri composti secondari sono stati quantificati mediante iniezione diretta in un sistema di gascromatografia (GC-2014-Shimadzu, Kyoto, Japan); La valutazione della componente volatile è stata determinata mediante la tecnica di microestrazione in fase solida (HS-SPME). Tale tecnica può essere eseguita secondo tre tipologie: ad immersione diretta SPME (DI-SPME), su membrana SPME (M-SPME) e in spazio di testa SPME (HS-SPME). In questo studio l'analisi è stata eseguita secondo la tipologia della tecnica SPME in spazio di testa (HS-SPME) utilizzando la fibra a tripla fase divinilbenzene (DVB)/carboxen (CAR)/polidimetilsilossano (PDMS) (figura 6).

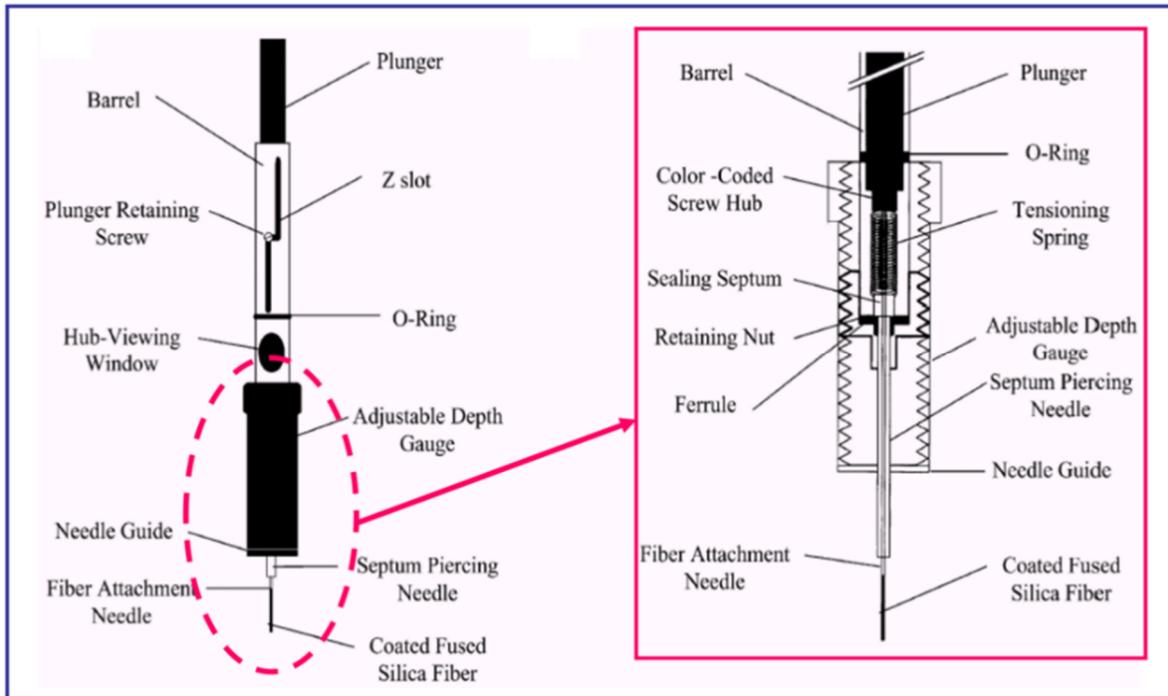


Figura 6. Illustrazione schematica di una fibra per gascromatografia volatile (chimica analitica UNIBA 2021)

L'estrazione della componente volatile è stata eseguita su 5 mL di vino, inseriti in una vial di vetro e aggiunti 25 μ L di standard di estrazione (3-ottanolo) e 1 g di NaCl. Il campione è stato posto in agitazione con una ancoretta magnetica per 10 minuti a 25°C. Dopodiché l'ago è stato inserito nel setto della vial ed estratta la fibra, per permettere l'assorbimento dei composti volatili nello spazio di testa e il tutto è stato posto in termostato a 55°C per 30 minuti. Passato questo tempo la fibra viene ritratta e rimossa dalla fiala contenente il campione. L'intero sistema viene posto in termostato a 50°C per 30 minuti. Al Gascromatografo (Figura 7) l'ago è stato inserito nella porta dell'iniettore del gas-cromatografo sempre con la fibra retratta ed è stato premuto lo stantuffo,

esponendo la fibra per circa 5 minuti nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna. 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 (60 m, 0.25 μm e diametro interno di 0.32mm);
- 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.

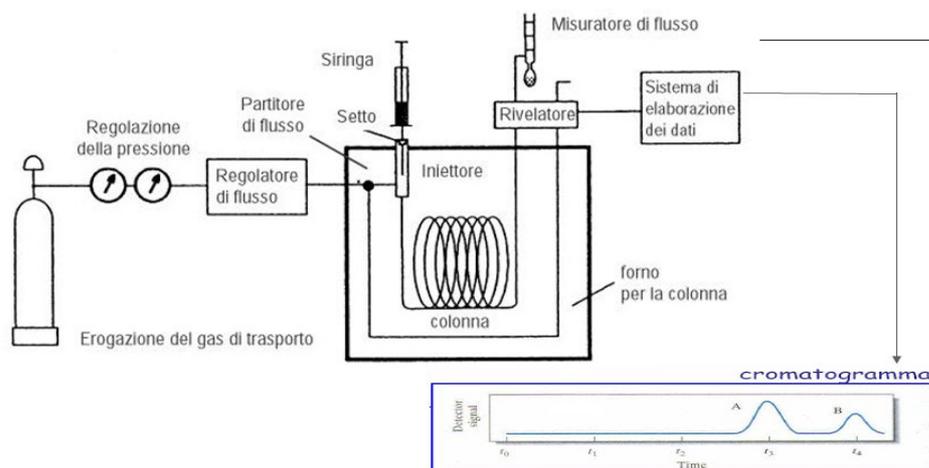


Figura 7. Schema di un gas cromatografo (UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI-Gas cromatografia-Prof. S. Andini).

3.5.3 Degustazione del vino finale

Alla fine della fermentazione, il vino è stato decantato e dopo tre mesi è stato trasferito in bottiglie da 750 mL le quali sono state mantenute a 4° C fino all'analisi sensoriale. Questa è stata fatta da un gruppo di 15 assaggiatori, di cui 10 maschi e 5 femmine, di età compresa tra 25 e i 45 anni (80% dei quali considerati non esperti e il 20% considerati esperti).

È stata usata una scala di valori tra 1 e 10, dove il valore 10 rappresentava il giudizio migliore, mentre 1 era attribuibile al giudizio peggiore. I descrittori analizzati sono stati: fruttato/floreale, fruttato tropicale, citrico, miele, tostato, speziato, erbaceo, acidità, amarezza struttura e persistenza.

3.6 Analisi Statistica

Tutti i dati sono stati elaborati statisticamente utilizzando il programma JMP11® (statistical discovery from SAS, NewYork, NY, USA). Le differenze sostanziali tra le medie dei valori sono state elaborate usando il Duncan Test ($p\text{-value} < 0.05$).

4. RISULTATI

4.1 Tipizzazione dei lieviti *S.cerevisiae*.

La campagna di isolamento ha portato all'isolamento di 66 lieviti tutti identificati come appartenenti alla specie *S. cerevisiae* che sono stati sottoposti a biotipizzazione con lo scopo di evidenziare i biotipi presenti nei vari settori di campionamento. I risultati della biotipizzazione sono ripostati in Tabella 1 da cui chiaramente si evince la presenza di un totale di 7 biotipi diversi.

Nello specifico, la prova C, la prova M e " *ped de cuve* " hanno mostrato maggiore variabilità di biotipi (con 5 biotipi ciascuno). Nei campioni raccolti dalle vinacce sono stati isolati e caratterizzati 4 biotipi e ne attrezzature 3 biotipi; infine nell'ambiente cantina soltanto 2 biotipi ad indicare una minore variabilità.

Interessante far notare come i Biotipi I, II, III, IV si ritrovano sia nella prova controllo che nella prova con l'inoculo di *M. pulcherrima*, ed erano presenti anche nel " *ped de cuve* ".

Il biotipo I domina tutto il processo di vinificazione, ed è stato ritrovato in quasi tutti i campionamenti effettuati, e durante tutto il processo di fermentazione, ma non era presente nell'ambiente cantina e nelle vinacce.

Si presume che il biotipo II derivi dalle Vinacce e si ritrova anche nel "*pied de cuve*" e nelle prove di fermentazione.

Il biotipo III è stato trovato a partire dalle attrezzature e nel "*pied de cuve*" ed è presente anche durante le due prove di fermentazione.

I biotipi IV e V sono gli unici che si ritrovano in cantina, e li ritroviamo successivamente nel "*pied de cuve*".

Il biotipo VI compare soltanto nelle prove fermentative (prova C e prova M), e il biotipo IX è stato ritrovato solo nelle vinacce e nelle attrezzature.

Nel complesso i risultati della biotipizzazione hanno mostrato grande varietà di biotipi colonizzanti i vari habitat produttivi ed ecologici, ad ogni modo i biotipi ritrovati nei "*pied de cuve*" utilizzati per avviare la fermentazione, sono stati ritrovati, come atteso, nelle prove C ed M e sono quindi quelli che hanno condotto l'intero processo fermentativo.

	Biotipi	%	N. ceppi
Ambiente cantina	IV	40	2
	V	60	5
Attrezzature	I	69.23	9
	III	7.69	1
	IX	23.07	3
Vinacce	II	50	5
	III	20	2
	IV	10	1
	IX	10	1
" <i>pied de cuve</i> "	I	12.5	2
	II	37.5	6
	III	12.5	2
	IV	12.5	2
	V	25.0	4
Prova di fermentazione controllo	VI	10.0	1
	I	20.0	2
	II	30.0	3
	III	-	-
	IV	40.0	4
Prova <i>M.pulcherrima</i> in chiarifica	VI	42.0	5
	I	17.0	2
	II	17.0	2
	III	8.0	1
	IV	17.0	2

Tabella 1. Ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* trovati in cantina, nelle attrezzature, nella fermentazione spontanea e nelle due prove di fermentazione.

4.2 Evoluzione della biomassa e cinetica di fermentazione.

Nella figura 8 viene riportata l'evoluzione della biomassa dopo 24 h di chiarifica, nelle due prove di fermentazione (*Prova Controllo e Prova M. pulcherrima*). Tale indagine serviva a valutare la reale capacità antimicrobica di *M. pulcherrima* nei confronti della popolazione lievitiforme indigena.

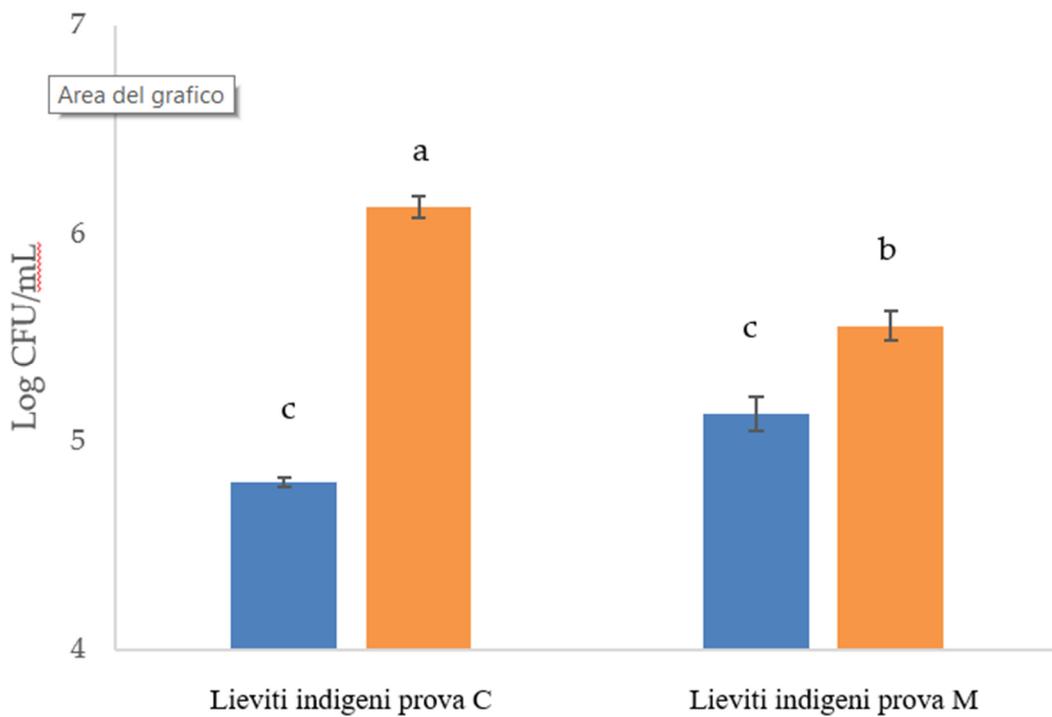


Figura 8. Evoluzione biomassa dopo chiarifica in prova C e prova M. Le lettere (a,b,c) in apice indicano risultati statisticamente differenti tra loro.

La concentrazione di lieviti indigeni prima della chiarifica aveva una concentrazione pari a circa Log 5 CFU/ml nella prova C, che, come atteso aumentava dopo la chiarifica. Si può osservare invece, come l'inoculo di *M. pulcherrima* abbia avuto l'effettiva capacità di contenere lo sviluppo di lieviti indigeni, quindi di avere effetto di biocontrollo sulla concentrazione di lieviti non-*Saccharomyces* (soprattutto di due lieviti appartenenti alla specie *Pichia* e *Hanseniaspora*) che colonizzano le uve.

L'evoluzione della biomassa durante l'intero processo fermentativo è stata monitorata attraverso conte vitali ad intervalli di tempo definiti e i risultati sono riportati in Figura 9.

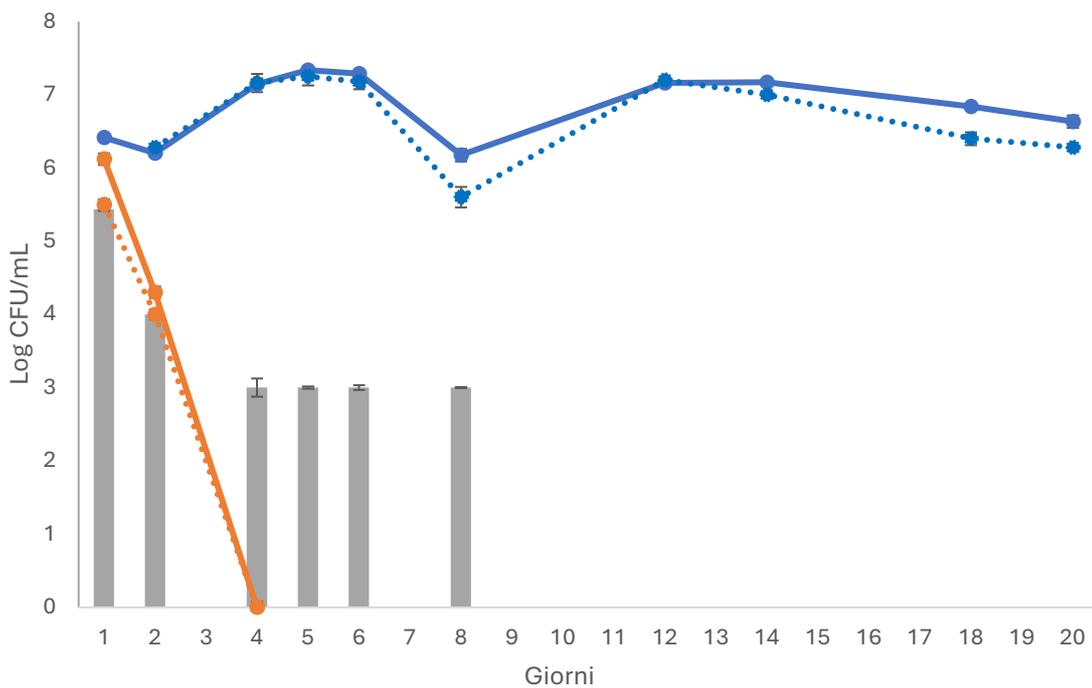
La concentrazione di cellule iniziale di *S. cerevisiae* era di circa 10^6 cell/ml, e viene raggiunto il massimo di crescita al quinto giorno di fermentazione. Successivamente rimane costante fino alla fine dell'intero processo.

La concentrazione iniziale dei lieviti indigeni era simile a quella di *S. cerevisiae*, e si abbassa velocemente fino a scomparire durante i primi quattro giorni di fermentazione.

Dopo la chiarifica, l'inoculo di *M. pulcherrima*, manteneva una concentrazione di 10^3 cell/ml fino all'ottavo giorno, per poi scomparire al dodicesimo giorno. Questo risultata indicava chiaramente la capacità di sopravvivenza di questo

ceppo di lievito in fase di chiarifica, dove la temperatura era nettamente inferiore alla temperatura ottimale di un lievito

In generale, l'andamento di *S. cerevisiae* è molto simile in entrambe le prove fermentative, questo a dimostrazione del fatto che *M. pulcherrima* non influenza negativamente lo sviluppo di *S. cerevisiae*.



Legenda:

- : Concentrazione *S. cerevisiae* prova C;
- ...●... : Concentrazione *S. cerevisiae* Prova M;
- +— : Concentrazione lieviti indigeni prova C;
- ...+... : Concentrazione lieviti indigeni prova M.
- : Biomassa *M. pulcherrima* in prova M.

Figura 9. Cinetica di fermentazione.

4.3 Caratteri analitici del vino finale.

I vini finali ottenuti sono stati analizzati per i principali caratteri analitici, come riportato nella Tabella 2. Si può osservare che la presenza di *M. pulcherrima* durante la chiarifica non ha influito in modo particolare sui principali caratteri enologici del vino. Riguardo il contenuto in etanolo si può osservare che la prova C mostra un contenuto di etanolo dello 0,5% v/v inferiore rispetto alla prova M. L'unica differenza sostanziale, infatti, è il residuo zuccherino, che nella prova inoculata con *M. pulcherrima* è risultato più basso rispetto alla prova di controllo.

	Prova M	Prova C
Etanolo %v/v	15.05±0.02 ^a	14.49±0.01 ^b
Acidità totale (g/L acido tartarico)	6.26±0.09 ^a	6.52±0.01 ^a
Residuo zuccherino (g/L)	3.7±0.02 ^b	14.0±0.03 ^a
pH	3.28±0.02 ^a	3.25±0.00 ^a
Acidità volatile (g/L acido acetico)	0.64±0.01 ^a	0.56±0.02 ^b
SO ₂ totale (mg/L)	25±0.9 ^a	26±0.8 ^a
Acido malico (g/L)	0.55±0.03 ^a	0.49±0.02 ^a

Tabella 2: caratteri enologici principali del vino. I dati riportati sono ottenuti dalle medie dei valori ± la deviazione standard. Le lettere (a,b) in apice indicano risultati statisticamente differenti tra loro.

4.4 Composti volatili nel vino.

I vini risultanti sono stati analizzati anche per i principali prodotti di fermentazione, responsabili dell'aroma finale dei vini, e riportati nella tabella 3. L'inoculo di *M. pulcherrima* all'inizio della chiarifica modifica le quantità dei composti volatili del vino e conduce ad un profilo aromatico diverso e

caratterizzante il vino. I risultati confermano che l'uso di *M. pulcherrima* nella chiarifica del mosto influenza la composizione dei composti volatili, in particolare dei terpeni, degli alcoli e di alcuni esteri. Nella prova con l'inoculo di *M. pulcherrima*, infatti, c'è un aumento significativo di Etilsesanoato, (estere responsabile dell'aroma fruttato, sentore di mela e ananas).

Inoltre, si osserva un aumento significativo del contenuto in monoterpeni, in particolare di Geraniolo (aroma floreale riconducibile alla rosa e al geranio) e Nerolo (erbe aromatiche) e anche di due alcoli superiori (N-propanolo e Isobutanolo) che mostrano una concentrazione maggiore rispetto alla prova controllo. La quantità di Acetaldeide cresce nella prova con *M. pulcherrima*, ma resta comunque entro i valori soglia. Al contrario invece la prova controllo, mostra un aumento significativo di Acetato di isoamile (aroma di banana) e di β -fenil etanolo (aroma dolce, simile al sentore di miele).

	<i>M. pulcherrima</i> inoculo in chiarifica	Prova Controllo
Esteri (mg/L)		
Etil butirrato	0.13±0.014 ^a	0.13±0.00 ^a
Etil acetato	35.75± 0.41 ^a	35.55± 0.36 ^a
Fenil etil acetato	0.89± 0.042 ^a	0.88±0.034 ^a
Etil esanoato	1.80± 0.121 ^a	0.63±0.142 ^b
Etil ottanoato	0.00± 0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Acetato di isoamile	1.27±0.026 ^b	2.22±0.147 ^a
Alcoli (mg/L)		
n- propanolo	30.88±0.36 ^a	26.08±0.13 ^b
Isobutanolo	20.48±0.29 ^a	18.30±0.10 ^b
Alcol amilico	13.00±0.55 ^a	11.69±0.41 ^a
Alcol isoamilico	113.94±0.05 ^a	114.16±0.24 ^a
β-Fenil etanolo	55.9±0.130 ^b	64.5± 0.152 ^a
Composti carbonilici (mg/L)		
Acetaldeide	63.16±0.28 ^a	25.35± 0.37 ^b
Monoterpeni (mg/L)		
Linalolo	0.015±0.001 ^a	0.012±0.002 ^a
Geraniolo	0.010±0.002 ^a	0.002±0.000 ^b
Nerolo	0.023± 0.001 ^a	0.005±0.000 ^b

Tabella 3. I principali sottoprodotti e composti volatili nel vino finale. Le lettere (a,b) in apice indicano risultati statisticamente differenti tra loro.

4.5 Analisi sensoriale del vino finale.

Parallelamente, al fine di valutare l'impatto determinato da *M. pulcherrima* inoculata in fase di chiarifica del mosto, sulla complessità aromatica del vino finale, quest'ultimo è stato sottoposto ad analisi sensoriale e confrontato con il vino ottenuto come prova di controllo.

I risultati, riportati in figura 10, hanno evidenziato un complessivo giudizio positivo da parte degli assaggiatori. Il vino ottenuto in presenza di *M. pulcherrima* era caratterizzato da specifiche note aromatiche, enfatizzando note di frutti tropicali, maggiore dolcezza e struttura del vino finale. Il vino della prova di controllo mostrava invece spiccate note di persistenza e di amarezza. Riguardo gli altri descrittori presi in considerazione, non sono state evidenziate sostanziali differenze fra le due tipologie di vino.

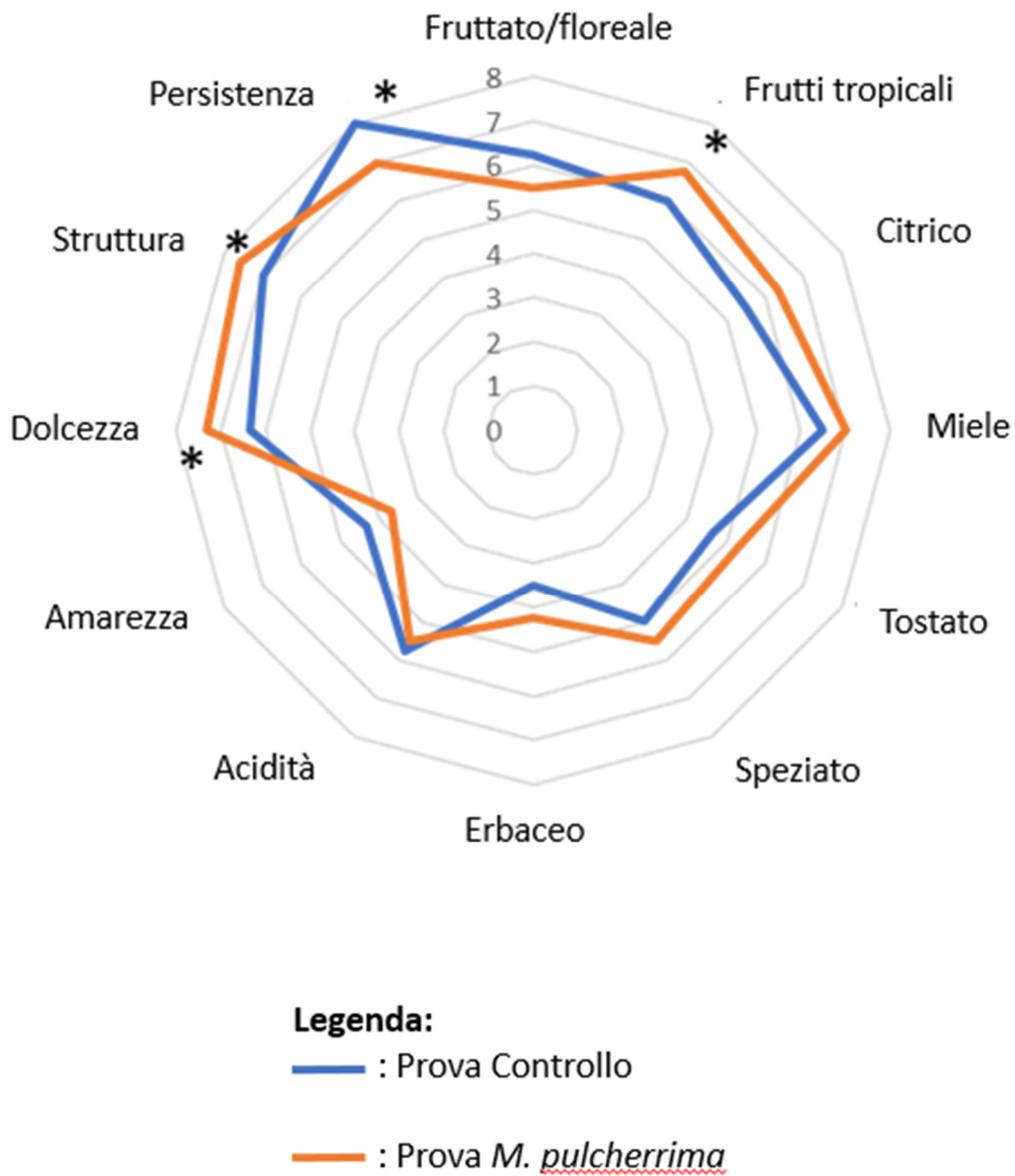


Figura 10: Risultati analisi sensoriale per vino prova controllo e vino con *M. pulcherrima* inoculata in prechiarifica. La presenza di “*” sta ad indicare differenze statisticamente significative tra i due vini.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Il termine “biocontrollo” può essere riferito all’utilizzo di microrganismi come agenti utili alla riduzione dei patogeni o alle malattie che essi provocano (Baker e Cook, 1983). Nel campo dell’agri-food questo concetto è correlato ad una strategia alternativa all’utilizzo di prodotti chimici, ad esempio pesticidi, in cui l’azione antagonista contro i patogeni (o come in questo caso contro microrganismi indesiderati) è svolta da altri microrganismi. Ne deriva che l’inutilizzo di prodotti chimici determina un miglioramento qualitativo del prodotto alimentare, della sua sicurezza e di moltissimi aspetti ambientali ed ecologici che spesso vengono compromessi dalle intensive pratiche agronomiche (Deguine et al 2017). La riduzione dell’impiego di agenti chimici è diventato un obiettivo da perseguire anche per l’industria vitivinicola, in seguito ad un costante e continuo aumento della domanda di vini “eco-friendly”, che mantengano comunque gli standard di sicurezza alimentare (Maesano et al., 2021). È quindi fondamentale il controllo dei microrganismi indesiderati nella vinificazione e in particolare nella fermentazione. A tale proposito, l’utilizzo di lieviti non-*Saccharomyces* come biocontrollo, potrebbe rappresentare una risorsa tecnologica valida da impiegare nel processo fermentativo, anche in virtù del contributo aromatico dato dalla varietà di metaboliti secondari che questi producono. I risultati di questo lavoro di tesi

hanno dimostrato infatti un importante contributo del lievito *M. pulcherrima* come agente di biocontrollo sulla microflora indigena naturalmente colonizzante la superficie delle uve (Chacon-Rodriguez et al., 2020) e quindi il mosto, quando inoculata nella fase di pre-chiarifica. Tale azione di biocontrollo da parte di *M. pulcherrima* è stata anche ampiamente studiata nei confronti di muffe patogeniche delle uve e vitigni (Parafati et al., 2015; Marsico et al., 2021). Inoltre, l'inoculo di *M. pulcherrima* ha determinato anche un miglioramento del bouquet finale del vino, aumentandone la complessità aromatica, come ripostato anche da Binati e collaboratori (2023) che hanno descritto il potenziale enologico di *M. pulcherrima*, sfruttandone la duplice azione di biocontrollo e diversificazione aromatica del vino.

Un altro aspetto che influisce sulla diversificazione aromatica del vino è legato all'impiego nel processo fermentativo di lieviti *S. cerevisiae* autoctoni.

In accordo con altri autori, dalla tipizzazione effettuata nei diversi habitat ecologici del processo di vinificazione, cioè la cantina, la superficie delle uve e durante la fermentazione è emerso che la popolazione di *S. cerevisiae* autoctoni mostra una grande variabilità di biotipi (Santamaria et al., 2019; Bisson, 2012; Granchi et al., 2019). Lo studio degli stessi ha permesso di stabilire quali hanno avuto un ruolo chiave nel guidare la fermentazione spontanea. Si è osservato che dei sette biotipi di *S. cerevisiae* rilevati, cinque

biotipi hanno dominato il processo fermentativo, seppur non tutti rilevati nei campioni di vinacce e nell'habitat produttivo. Tali risultati sembrano essere a sostegno di quanto riportato da Granchi et al. (2019) dove alcuni dei lieviti *S. cerevisiae* autoctoni ritrovati sulle vinacce sono stati gli stessi che hanno condotto la fermentazione vinaria.

È possibile quindi assumere che il concetto di fermentazione spontanea è strettamente legato alla popolazione dei lieviti *S. cerevisiae* autoctoni, che colonizzano cantina, attrezzature ed ambienti di lavorazione, e che a loro volta influenzano il vino finale. Inoltre, la conoscenza dei tratti enologici specifici di questi lieviti autoctoni potrebbe essere utile per caratterizzare ed esaltare i tratti distintivi di una specifica zona vitivinicola di produzione.

I risultati delle numerose ricerche condotte sui vini naturali, isolati in una specifica area geografica e caratterizzati dal basso contenuto di composti solforati (comuni allergeni), mostrano risultati concordanti con quelli ottenuti in questa tesi sperimentale. Infatti, il presente lavoro di tesi descrive una strategia utile al raggiungimento di questi obiettivi. Tale strategia è rappresentata dall'impiego di fermentazioni miste che prevedono l'inoculo del lievito selezionato *M. pulcherrima* insieme ai lieviti autoctoni *S. cerevisiae* naturalmente colonizzanti l'ambiente di produzione.

6. REFERENZE

Agarbati A, Canonico L, Comitini F, Ciani M. Ecological Distribution and Oenological Characterization of Native *Saccharomyces cerevisiae* in an Organic Winery. *Fermentation*. 2022; 8(5):224.

<https://doi.org/10.3390/fermentation8050224>

Agarbati A, Canonico L, Mancabelli L, Milani C, Ventura M, Ciani M, Comitini F. The Influence of Fungicide Treatments on Mycobiota of Grapes and Its Evolution During Fermentation Evaluated by Metagenomic and Culture-Dependent Methods. *Microorganisms*. 2019; 7(5):114.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7050114>.

Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2023). *Metschnikowia pulcherrima* in cold clarification: biocontrol activity and aroma enhancement in Verdicchio wine. *Fermentation*, 9(3), 302.

Agarbati, A., Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2020). Improved *Saccharomyces cerevisiae* strain in pure and sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* for the production of verdicchio wine with reduced sulfites. *Applied Sciences*, 10(19), 6722.

Agarbati, A., Comitini, F., Ciani, M., & Canonico, L. (2024). Occurrence and Persistence of *Saccharomyces cerevisiae* Population in Spontaneous

Fermentation and the Relation with “Winery Effect”. *Microorganisms*, 12(7), 1494.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.

Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(6), 507-512.

Binati, R. L., Maule, M., Luzzini, G., Martelli, F., Felis, G. E., Ugliano, M., & Torriani, S. (2023). From bioprotective effects to diversification of wine aroma: Expanding the knowledge on *Metschnikowia pulcherrima* oenological potential. *Food Research International*, 174, 113550.

Bisson, L. F. (2012). Geographic origin and diversity of wine strains of *Saccharomyces*. *American journal of enology and viticulture*, 63(2), 165-176.

Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139-E148.

Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological research*, *181*, 75-83.

Chacon-Rodriguez, L.; Joseph, C.L.; Nazaris, B.; Coulon, J.; Richardson, S.; Dycus, D.A. Innovative use of non-Saccharomyces in bio-protection: *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* applied to a machine harvester. *Catal. Discov. Into Pract.* 2020, *4*, 82–90.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS yeast research*, *10*(2), 123-133.

Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2010). Diversity of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International journal of food microbiology*, *143*(3), 241-245.).

Cook, R. J. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*, 539.

Csutak, O., Vassu, T., Sarbu, I., Stoica, I., & Cornea, P. (2013). Antagonistic activity of three newly isolated yeast strains from the surface of fruits. *Food Technology and Biotechnology*, *51*(1), 70.

Deguine J.-P., Gloanec C., Laurent P., Ratnadass A., Aubertot J.-N. (eds.). 2017. Agroecological crop protection. Springer. p. 246.

Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1999, 49, 329–337.

Fleet, G. H. (1993). Yeast-growth during fermentation. *Wine microbiology and biotechnology*, 27-54.

Gilbert, J. A., van der Lelie, D., & Zarraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 5-6.

Granchi, L., Ganucci, D., Buscioni, G., Mangani, S., & Guerrini, S. (2019). The biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous wine fermentation: The occurrence and persistence of winery-strains. *Fermentation*, 5(4), 86.

Hranilovic, A., Gambetta, J. M., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2020). Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *International Journal of Food Microbiology*, 329, 108651.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. R., & Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.

Leder, M. (2020). *Quattrocalici: conoscere il vino*. Marcello Leder.

Legras, J. L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS microbiology letters*, 221(2), 249-255.

Maesano, G., Di Vita, G., Chinnici, G., Gioacchino, P., & D'Amico, M. (2021). What's in organic wine consumer mind? A review on purchasing drivers of organic wines. *Wine Economics and Policy*, 10(1), 3-21.

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., ... & Waters, E. J. (2012). Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chemistry*, 135(3), 1157-1165.

Marsico, A. D., Velenosi, M., Perniola, R., Bergamini, C., Sinonin, S., David-Vaizant, V., ... & Ventura, M. (2021). Native vineyard non-saccharomyces yeasts used for biological control of botrytis cinerea in stored table grape. *Microorganisms*, 9(2), 457.

Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J. M., Bañuelos, M. A., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation*, 5(3), 63.

Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 18-22.

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 47, 85-92.

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 201-210.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., & Coulon, J. (2007). The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *OENO One*, 41(3), 161-173

- Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2020). Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-Saccharomyces yeasts of oenological interest. *Microorganisms*, 8(2), 157.
- Santamaría, P., López, R., del Patrocinio Garijo, M., Escribano, R., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., & Rosa Gutiérrez, A. (2019). Biodiversity of Saccharomyces cerevisiae yeasts in spontaneous alcoholic fermentations: Typical cellar or zone strains?. *Advances in grape and wine biotechnology*, 117-132.
- Suzzi, G., & Tofalo, R. (Eds.). (2018). *Microbiologia enologica*. Edagricole.
- Swiegers, J. H., Kievit, R. L., Siebert, T., Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., ... & Pretorius, I. S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food microbiology*, 26(2), 204-211.
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9861-9874.
- Zhang, B. Q., Shen, J. Y., Duan, C. Q., & Yan, G. L. (2018). Use of indigenous Hanseniaspora vineae and Metschnikowia pulcherrima co-fermentation with Saccharomyces cerevisiae to improve the aroma diversity of Vidal Blanc icewine. *Frontiers in microbiology*, 9, 2303.