



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

*EFFETTO ANTIMICROBICO E ANTIOSSIDANTE DI ROOIBOS
(Aspalathus linearis) COME ADDITIVO NATURALE DI VINIFICAZIONE*

*ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT EFFECT OF ROOIBOS
(Aspalathus linearis) AS A NATURAL VINIFICATION ADDITIVE*

Tesi di Laurea Magistrale di:
Giulia Pia Lozupone

Relatore
Prof. Francesca Comitini

Primo Correlatore
Prof. Elisabetta Damiani

Secondo Correlatore
Dott.ssa Alice Agarbati

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2021-2022

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE.....	4
1.1 Rooibos – Aspalathus linearis: origine, proprietà e benefici.....	7
1.2 Proprietà dei polifenoli del Rooibos.....	13
1.2.1 I polifenoli del Rooibos.....	17
1.3 I polifenoli del vino.....	21
1.4 I microrganismi spoilage nel vino.....	23
1.4.1 I lieviti <i>Brettanomyces</i>.....	25
1.5 Principali metodi di controllo dei lieviti <i>Brettanomyces</i> nel vino.....	28
1.6 Impiego del Rooibos nella produzione di vino come sostituto dell’anidride solforosa.....	30
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI.....	34
CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI	
3.1 Terreni colturali.....	36
3.2 Preparazione degli infusi di Rooibos.....	37
3.2.1 Concentrazione degli infusi.....	39
3.3 Valutazione dell’attività antimicrobica contro batteri patogeni.....	43
3.4 Tagli molecolari in serie degli infusi di RR e RV.....	45
3.5 Valutazione attività antimicrobica (Well test).....	47
3.6 Valutazione dell’attività del Rooibos nel controllo dello sviluppo dei lieviti <i>Brettanomyces</i>.....	50

3.6.1 Preparazione del vino sintetico.....	50
3.6.2 Adattamento e monitoraggio della vitalità dei lieviti <i>Brettanomyces</i> in vino sintetico.....	52
3.6.3 Conte vitali.....	54
3.6.4 Allestimento della prova di inibizione del Rooibos contro i lieviti <i>Brettanomyces</i> in vino sintetico.....	55
3.7 Quantificazione dei polifenoli totali: saggio TPC.....	57
3.7.1 Saggio TPC di RR e RV.....	59
 CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSINE	
4.1 Well-test infusi RR e RV sottoposti a taglio molecolare non in serie.....	64
4.2 Valutazione dell'attività antimicrobica contro batteri patogeni.....	68
4.3 Well Test: Frazioni Rr E Rv sottoposte a tagli molecolari in serie.....	73
4.4 Well Test con ceppi di <i>B. bruxellensis</i> come sensibili.....	76
4.5 Risultati dell'azione di controllo dei lieviti <i>Brettanomyces</i> adattati su vino sintetico.....	77
4.6 Valutazione della quantità totale di polifenoli all'interno dell'infuso Rooibos....	87
 CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI.....	 90
 CAPITOLO 6 – BIBLIOGRAFIA.....	 92
 CAPITOLO 7- SITOGRAFIA.....	 97

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Con il termine “vinificazione” si intende il processo di trasformazione del mosto (il succo che si ottiene dalla pigiatura degli acini d’uva) in vino. Questa trasformazione avviene tramite la fermentazione degli zuccheri naturalmente presenti nell’uva in alcol, grazie ai lieviti che agiscono durante la fase di fermentazione.

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è il principale responsabile della fermentazione alcolica, generalmente vengono utilizzati ceppi commerciali selezionati in grado di garantire un buon processo fermentativo. Inoltre, in questa fase vengono prodotti anche metaboliti secondari di fermentazione, importanti per le proprietà organolettiche del vino.

Il vino rosso, in particolare, è ottenuto dalla fermentazione alcolica del mosto accompagnata dalla macerazione delle vinacce. La macerazione è una fase importante in questo tipo di vinificazione, in quanto responsabile delle caratteristiche visive, olfattive e gustative che differenziano i vini rossi dai bianchi: essa apporta composti fenolici quali antociani e tannini, oltre che sostanze aromatiche e azotate, pectine e minerali.

A differenza dei vini rossi, i vini bianchi si ottengono tramite estrazione del succo d'uva, chiarificazione e fermentazione alcolica, quindi senza la fase di macerazione.

Il colore del vino, dunque, non deriva dal colore delle uve, ma dall'assenza della macerazione durante la fase alcolica.

Attualmente, in vinificazione è comune l'utilizzo dell'anidride solforosa (SO₂) che prolunga la conservabilità del vino, ne previene il deterioramento preservando sapore e aroma e allo stesso tempo possiede attività antisettica. Le dosi massime di anidride solforosa da aggiungere nel vino variano a seconda delle normative dei singoli Paesi. Nell'Unione Europea, il limite è di:

- 160 mg/L nei vini rossi
- 210 mg/L nei vini bianchi e rosati

L'Organizzazione Mondiale della Sanità stabilisce la dose massima di assunzione giornaliera per l'uomo che corrisponde a 0,7 mg per 1 kg di peso; mentre quella letale è di 1,5 g/kg. Tuttavia, la legislazione dell'Unione Europea impone di indicare sulle etichette alimentari la dicitura "contiene solfiti" senza specificarne la quantità, quando eccedano i 10 mg/kg/L (EFSA, 2016).

Negli ultimi anni è stato dimostrato che questo additivo provoca numerosi effetti collaterali per l'uomo, come ad esempio sintomi di reazioni allergiche, asma, difficoltà respiratoria, fiato corto, respiro affannoso e tosse. In virtù di ciò, il mondo enologico è alla continua ricerca di soluzioni alternative per limitare l'uso di questo composto chimico (Gunison et al.,1987).



Figura 1: *Aspalathus linearis* (<https://www.ideegreen.it/rooibos-proprieta-benefici-84300.html>)

1.1 Rooibos – *Aspalathus linearis*: origine, proprietà e benefici

Il Rooibos, detto anche “Tè Rosso Africano” il cui nome scientifico è *Aspalathus linearis*, appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*, ed è un infuso che si ricava dalle foglie dell’omonima pianta, appartenente alla famiglia delle Leguminose. È originario delle province del Capo Occidentale e Orientale del Sudafrica (Du Toit et al., 1998; Small & Catling, 2009). Il termine “Rooibos” significa “arbusto rosso” e deriva dall’afrikaans, una delle lingue ufficiali del Sudafrica.

Questa pianta cresce spontaneamente tra le montagne del Cederberg, allungandosi fino alla città di Nieuwoudtville, Clanwilliam e Citrusdal, verso nord.

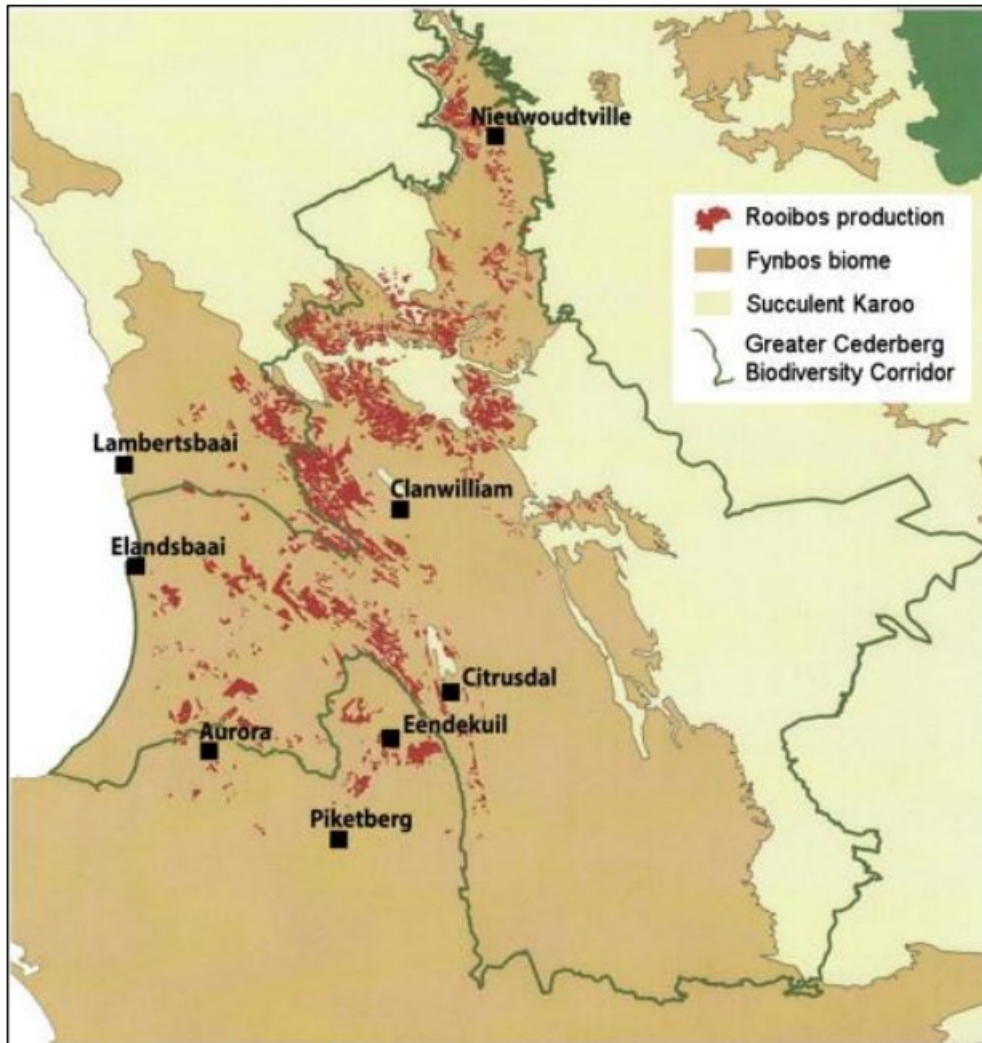


Figura 2: Aree di produzione dell'*Aspalathus linearis* nella regione del Cederberg (Joubert E. & de Beer D., 2011).

Le piante di Rooibos sono selvatiche; la variante che funge da materia prima nella lavorazione del tè Rooibos è quella di “Rooi Tea” o “Red Type”, in alternativa noto come variante Rocklands. Questa cresce sporadicamente in montagna e viene anche chiamata tipo Cederberg.

Essa viene raccolta e trasformata principalmente per produrre tisane, ma è attualmente utilizzata anche per alleviare le coliche renali infantili, trattare le

allergie, asma e per problemi dermatologici. Inoltre, possiede una grande quantità di polifenoli e di Vitamina C.

Secondo le analisi più recenti, il Rooibos è ricco di Sodio (Na) e Potassio (K), seguiti da Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Fosforo (P) e Zinco (Zn). Per questo, viene considerata una bevanda adattogena, cioè in grado di aiutare l'organismo sottoposto a sforzo. Il suo contenuto di calcio assicura la corretta formazione di denti e ossa nei più piccoli; lo zinco agisce invece rafforzando unghie e capelli (Mabuza et al., 2021).

Il Rooibos non contiene acido ossalico (Mabuza et al., 2021), può essere quindi consumato anche da chi soffre di calcoli renali. Sono stati dimostrati i suoi effetti positivi contro l'ipertensione ed il suo contenuto calorico è pressoché nullo (0.6 calorie per 100 mL di prodotto), qualità a favore di chi si trova a seguire un regime alimentare controllato (Joubert et al., 2017).

Recentemente, sono state descritte anche le sue proprietà antivirali: stimola il sistema immunitario ad agire rapidamente nel combattere le infezioni (Smith et al., 2018).

Il Rooibos contiene un elemento chiamato "Esperidina" che è un flavonoide naturale e ha ottenuto riconoscimenti per agire nella prevenzione di alcune malattie e capacità di promuovere benefici per la salute umana. Può anche agire

come agente chemio-preventivo durante la carcinogenesi del colon (Owen, 2015).

Tutti questi effetti benefici per la salute dell'uomo ne hanno determinato la sua crescente popolarità e di conseguenza aumento del consumo in tutto il mondo. Sono disponibili due forme di Rooibos: fermentato (di colore rosso) e non fermentato (di colore verde) (Figura 3).



Figura 3: Rooibos Verde e Rosso (https://www.cucina-naturale.it/alimentazione_salute/rooibos-una-tazza-di-salute/)

Per la preparazione della forma rossa, le foglie vengono sminuzzate e in seguito sottoposte al processo di fermentazione che consiste nel favorire il contatto fra gli enzimi contenuti nei plastidi ed i polifenoli contenuti nei vacuoli in presenza dell'ossigeno dell'aria.

Durante il processo di fermentazione, si verifica l'ossidazione di composti fenolici, conferendo all'infuso un caratteristico aroma e colore rossastro (Carlioni et al., 2012; Manach et al., 2004).

La fermentazione dura circa 8 ore. Al termine di questa, il prodotto viene fatto essiccare al sole ed all'aria su spianate di cemento.

Al termine dell'essiccazione il prodotto viene setacciato, pulito, se necessario aromatizzato e quindi confezionato.

Per la preparazione della forma verde, invece, si attua una differente lavorazione che va a bloccare il processo di ossidazione, conferendo una maggior concentrazione di polifenoli.

La metodica prevede di far essiccare le foglie appena raccolte, sottovuoto e, in un secondo momento, tritarle.

Questa procedura permette l'inattivazione degli enzimi coinvolti nell'ossidazione prima di andare a macinare le foglie (Joubert et al., 2008).

Infatti, sebbene gli estratti fermentati di Rooibos rosso contengano un'elevata quantità di composti fenolici, gli estratti verdi tuttavia ne contengono livelli circa tre volte superiori.

Il Rooibos è venduto principalmente nella forma "fermentata" (Joubert & De Beer, 2011), ovvero rosso ed è quella maggiormente consumata.

Infine, è emerso che il Rooibos ha un caratteristico profilo aromatico quindi il suo utilizzo in vinificazione potrebbe positivamente contribuire ad aumentare la complessità aromatica dei vini, sviluppando profili aromatici unici.

Al Rooibos sono state attribuite, infatti, caratteristiche sensoriali riguardanti l'aroma, il gusto, il retrogusto e la sensazione in bocca; possiede le seguenti caratteristiche aromatiche: sapori di miele e caramello, è fruttato, legnoso e erbaceo-floreale; ha un gusto leggermente dolce, un retrogusto legnoso ed è astringente (Jolley et al., 2020).

1.2 Proprietà dei polifenoli

I polifenoli sono composti bioattivi presenti soprattutto nella frutta e nella verdura contribuendo al loro colore e sapore. Essi sono prodotti dalle piante stesse e possono essere presenti sia come esteri di glicosidi che come agliconi liberi.

Si tratta di sostanze organiche che vengono sintetizzate dalle piante come prodotti secondari del loro metabolismo.

Si definiscono polifenoli, o composti fenolici, quelle sostanze la cui struttura molecolare contiene più gruppi fenolici.

Un fenolo è un anello aromatico (benzene) con, almeno, un idrossile. Un idrossile è un gruppo chimico formato da un atomo di ossigeno e uno di idrogeno.

I polifenoli vengono classificati a seconda della loro struttura chimica in flavonoidi e non-flavonoidi (figura 4).

I primi comprendono i flavoni, flavonoli, isoflavoni, neo-flavonoidi, calconi, antocianidine e proantocianidine, caratterizzati da uno scheletro C6-C3-C6.

I non-flavonoidi comprendono gli acidi fenolici e possono essere suddivisi in acidi benzoici (C6-C1) e cinnamici (C6-C3), stilbenoidi e ammidi fenoliche (Grozier & Jaganath; 2010 Ribéreau-Gayon, 1968).

Sono stati ampiamente studiati a causa delle loro proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, cardioprotettive e antitumorali; inoltre, sono responsabili dell'astringenza, dell'odore, della stabilità ossidativa, del sapore e soprattutto del colore dei cibi.

I polifenoli introdotti con la dieta passano attraverso l'intestino modificando la microflora intestinale, probabilmente grazie ad un meccanismo di inibizione dei batteri patogeni e contemporaneamente di stimolazione dei batteri benefici per il corpo umano. Il consumo a lungo termine di un'alimentazione ricca di polifenoli vegetali aiuta a proteggere da numerose malattie, in particolare, tra le proprietà attribuite ai polifenoli sono inclusi:

- effetto protettivo sul cuore;
- azione antitumorale;
- azione antidiabetica;
- azione anti-invecchiamento;
- protezione contro asma e infezioni;
- azione protettiva contro l'osteoporosi e le malattie neurodegenerative.

I polifenoli determinano un rafforzamento delle difese antiossidanti endogene. Questo potenziamento si ottiene attraverso l'attivazione degli elementi di risposta antiossidante (Antioxidant Responsive Elements, ARE), sequenze geniche localizzate nel sito del promotore di alcuni geni indotti da stress ossidativo e chimico, coinvolte nell'induzione di enzimi antiossidanti e detossificanti.

Il loro potere antiossidante dipende dal numero di anelli fenolici, dal numero e dalla posizione dei gruppi idrossilici e dei doppi legami presenti nella molecola. Inoltre, è determinato anche dalla presenza di un anello β -diidrossilato (gruppo catecolico), dalla presenza di insaturazione in posizione 2,3 associata ad una funzione 4-carbonilica nell'anello -C e di gruppi funzionali capaci di chelare i metalli di transizione.

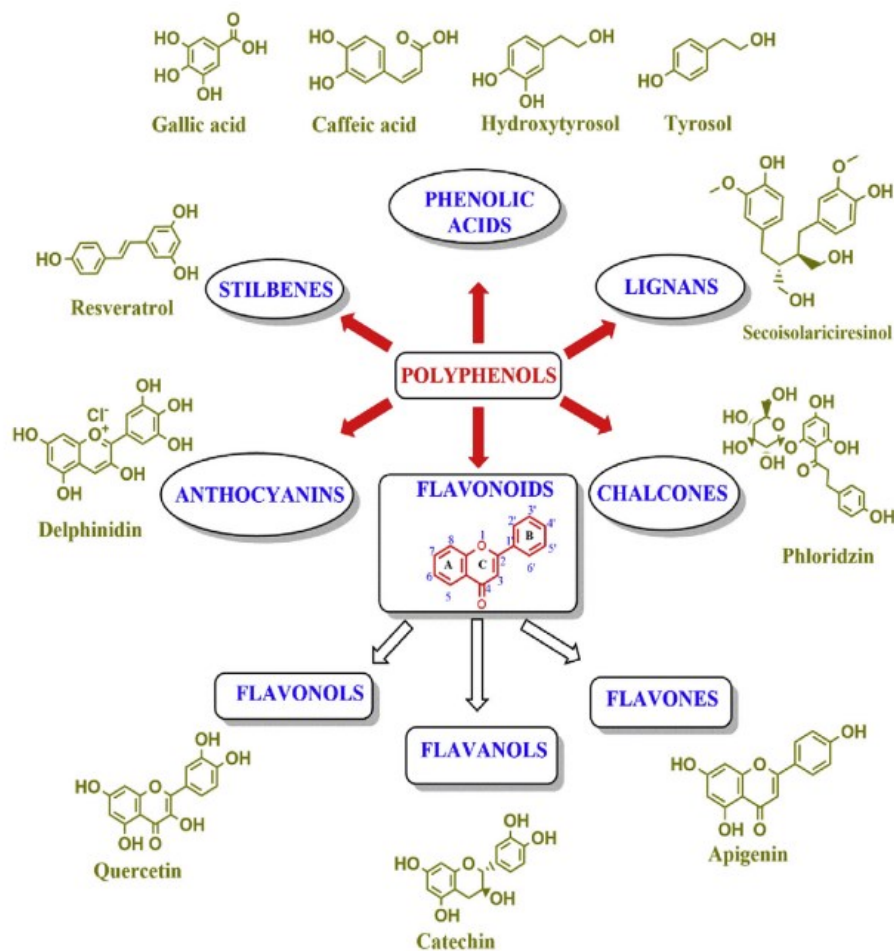


Figura 4: Classificazione schematica dei polifenoli con la struttura chimica di alcune molecole rappresentative (Losada-Barreiro et al 2017).

1.2.1 I polifenoli nel Rooibos

Il contenuto fenolico totale dell'estratto di Rooibos è stato determinato mediante saggio colorimetrico (Rossi & Singleton 1965).

Sono stati separati 25 composti fenolici e il contenuto medio totale di polifenoli è risultato essere di 252,07 mg/g.

La presenza di potenti antiossidanti, tra cui l'aspatina e vari flavonoidi, indica il potenziale delle proprietà benefiche per la salute del Rooibos, tra cui, sollievo della tensione nervosa, aiuto nella digestione, cura di problemi dermatologici e aiuto nel sostenere il sonno (Morton, 1983; Von Gadow, 1997) (*Tabella 1*).

I flavonoidi sono importanti metaboliti vegetali secondari che offrono protezione contro l'ambiente, caratterizzato da fattori di stress come la siccità, l'irradiazione UVB e il calore (Ferreira et al., 2012).

È stato osservato che il Rooibos Verde, che quindi non ha subito fermentazione e possiede ancora il suo colore verde di raccolta, ha livelli molto più elevati di composti polifenolici rispetto a quello Rosso (fermentato), questo perché il processo di fermentazione va a ridurre i livelli di aspatina. Quest'ultima rappresenta il calcene principale delle foglie di Rooibos. Nello specifico è un flavonoide C-glicoside, composto da due parti:

- una parte ossidica: il glucosio

- una parte di diidrocalcone: aglicone (-o genina)

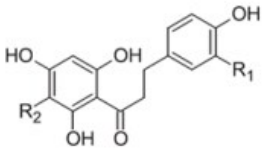
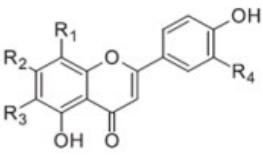
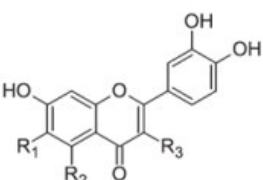
Structures	Compounds	Green (n=3)	Fermented (n=3)
	Dihydrochalcones		
	aspalathin (R ₁ =OH; R ₂ =C-glucosyl) nothofagin (R ₁ =C-glucosyl; R ₂ =OH)	2.559±0.699 0.251±0.230	0.421±0.017 0.040±0.022
	Flavones		
	orientin (R ₁ =C-glucosyl; R ₂ , R ₄ =OH; R ₃ =H)	0.263±0.087	0.202±0.026
	iso-orientin (R ₁ =H; R ₂ , R ₄ =OH; R ₃ =C-glucosyl)	0.450±0.163	0.329±0.049
	vitexin (R ₁ =C-glucosyl; R ₂ =OH; R ₃ , R ₄ =H)	0.042±0.020	0.035±0.009
	isovitexin (R ₁ , R ₄ =H; R ₂ =OH; R ₃ =C-glucosyl)	0.049±0.029	0.035±0.012
	luteolin (R ₁ , R ₃ =H; R ₂ , R ₄ =OH)	0.007±0.006	0.010±0.005
	luteolin-7-O-β-D-glucoside (R ₁ , R ₃ =H; R ₂ =O-glucosyl; R ₄ =OH)	0.015±0.008	0.015±0.008
chrysoeriol (R ₁ , R ₃ =H; R ₂ =OH; R ₄ =OCH ₃)	0.003±0.001	0.007±0.002	
	Flavonols		
	quercetin (R ₁ =H; R ₂ , R ₃ =OH)	0.001±0.001	0.010±0.001
	hyperoside (R ₁ =H; R ₂ =OH; R ₃ =O-galactosyl)	0.021±0.012	0.016±0.015
	rutin (R ₁ =H; R ₂ =OH; R ₃ =O-rutinosyl)	0.245±0.141	0.173±0.016

Figura 5: Contenuto delle maggiori componenti fenoliche nelle foglie di Rooibos Green e Rooibos

Fermentato (Rosso) a confronto (Joubert E. & de Beer D., 2011)

Questo flavonoide svolge un ruolo importante nel migliorare la sindrome metabolica (un insieme di fattori di rischio che aumentano la possibilità di sviluppare patologie cerebrali, cardiovascolari e diabete), strettamente correlata allo stress ossidativo. Infatti, l'attività antiossidante del Rooibos è stata ampiamente comprovata, ed è stato un punto focale del portafoglio di ricerca dell'ARC (African Research Council - Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch) (Joubert et al., 2008).

Studi scientifici condotti dal CREA (Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria, Roma), hanno comprovato che il contenuto di sostanze antiossidanti di questo infuso è pari a quello del tè nero o del tè verde (Piek et al., 2019). Ad un'ora dall'ingestione di infuso di Rooibos si ha un'assunzione significativa di sostanze ad azione antiossidante contro la formazione di radicali liberi.

I campioni di Rooibos sono, inoltre, ricchi di acidi fenolici, come caffeico, ferulico, p-cumarico e acidi p-idrossibenzoici (Rabe et al., 1994).

Attraverso un approccio Tandem-MS si è confermata l'identità della vitexina (apigenina 8-C glucoside), quercitina 4-O glucoside, rutina e crisoeriolo.

È stato infine osservato che l'infuso bollito di Rooibos è caratterizzato da quantità maggiori di acido ferulico, matairesinolo, catechina e tirosolo, ma anche di luteolina e antocianina (Damiani et al., 2019).

Chemical Composition of Rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>) and Honeybush (<i>Cyclopia</i>)		
Chemical compounds occurring in <i>Aspalathus linearis</i>		
Compound Type	Names	Reference
Aspalathin Aspalalinin Nothofagin	dihydrochalcone-C- glucoside cyclic dihydrochalcone dihydrochalcone-C-glucoside	Joubert, 2012
Flavanones	dihydro-orientin dihydro-isoorientin hemiphlorin	Joubert, 2008
Flavones	orientin isoorientin vitexin isovitexin luteolin luteolin-7-O- glucoside chrysoeriol	Preedy, 2014 Joubert, 1996 Joubert, 2008
Flavonols	Aglycone compound - quercitin quercitin-3-O-robonibioside hyperoside isoquercitrin rutin	Joubert, 1996
Coumarins	esculetin esculin	McKay, 2007 McKay, 2007
Phenolpropanoid	phenylpyruvic acid-2-O-glucoside (PPAG)	Joubert E, 2012
Other	phenolic acids (caffeic, ferulic, vanillic , ρ - hydrobenzoic acid, protocatechuic and p - coumaric) lignans flavone diglycosides (+)- catechin	McKay, 2007 Joubert, 2008

Tabella 1: Fenoli presenti nel Rooibos

(De Wet (2015) Rooibos honeybush wine making)

1.3 I polifenoli nel vino

I polifenoli sono anche importanti costituenti del vino rosso. Essi contribuiscono alle sue proprietà sensoriali, in quanto responsabili del colore, profumo e gusto. Inoltre, esercitano un'attività antiossidante a protezione del vino stesso.

A causa della diversità e complessità strutturale di questi composti, solo negli ultimi anni è stato possibile caratterizzare strutturalmente i polifenoli altamente polimerizzati presenti nell'uva e nel vino rosso.

Tecniche analitiche, come la HPLC-ESI-MS (spettrometria di massa associata ad altre tecniche come la HPLC usate per separare e identificare gli analiti) ne hanno permesso l'identificazione (Beltrán-Debón et al. 2011).

Questi risultano costituiti principalmente da proantocianidine (monomeri, oligomeri e polimeri) e antociani, in quantità minori da altri composti fenolici, come acidi fenolici, resveratrolo e suoi derivati, flavonoli e flavoni (Cheynier, 2002; Cheynier, 2012).

La quantità dei polifenoli nel vino dipende principalmente da due fattori:

- dal contenuto iniziale di polifenoli nelle uve
- dalle tecnologie di vinificazione adottate

Un parametro importante, che permette di scegliere la più corretta procedura di vinificazione, e quindi ottenere vini di qualità, è la maturità fenolica. Questa rappresenta lo stato di evoluzione delle sostanze fenoliche, ottenuta dalla quantità totale dei polifenoli, dagli antociani estraibili in laboratorio e dagli antociani che possono essere estratti durante il processo di vinificazione.

Il vino ha una notevole azione cardioprotettiva. Studi epidemiologici e prove sperimentali condotte sull'uomo hanno dimostrato che il vino rosso riduce l'incidenza di arteriosclerosi coronarica e, a causa dell'elevata quantità di polifenoli, è coinvolto nel ridurre la formazione di lipoproteine ossidate (LDL) nell'uomo.

Inoltre, i flavonoidi sembrano coinvolti nel prevenire il danno da radicali liberi. In particolare, sono in grado di eliminare un'ampia gamma di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno), come: ozono, anione superossido, perossido di idrogeno, radicale ossidrile, (alchil-) perossil- radicale, idroperossidi, ossido nitrico.

1.4 I microrganismi spoilage nel vino

Il vino, grazie a: grado alcolico, acidità e contenuto di polifenoli, presenta una efficace difesa verso l'ambiente esterno; tuttavia, essendo un prodotto di origine naturale è sensibile alla contaminazione di agenti microbici.

Si definiscono “spoilage” quei microrganismi responsabili delle alterazioni organolettiche del vino quali: perdita di aromi fruttati, sapori anomali, perdita della formazione di note olfattive indesiderate, cambiamenti di colore, produzione di amine biogene, torbidità, viscosità e precipitati (Hernández et al. 2018) (Figura 6).

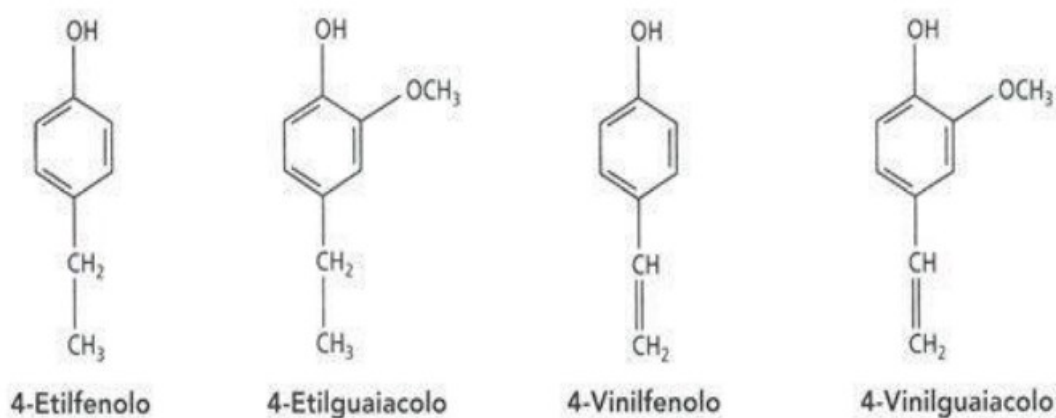


Figura 6: Fenoli responsabili delle alterazioni olfattive nei vini (Chatonnet P., 1993).

Tra questi microrganismi ci sono: batteri lattici e acetici, lieviti e muffe. In particolare, un lievito contaminante per i vini rossi, che può portare alla formazione di fenoli volatili nel vino è il *Brettanomyces bruxellensis*.

Le specie di lievito appartenenti al genere *Brettanomyces* isolate dai vini sono state riclassificate diverse volte e *D. bruxellensis* e *D. anomala* attualmente sono riconosciuti come i microrganismi responsabili delle alterazioni del vino.

Queste due specie presentano cellule ellissoidali, ogivali o cilindriche, hanno dimensioni di $2-2,5 \times 3-22 \mu\text{m}$, possono essere disposte singolarmente, in coppia, in corte catenelle o a grappoli; possono formare anche uno pseudo micelio e, in stato di quiescenza, possono raggrinzire ed assumere dimensioni tali da rendere inefficace la filtrazione.

La riproduzione asessuale avviene per gemmazione multilaterale o, più raramente, per gemmazione bipolare in successione basipetale su una base stretta (Fell & Kurtzman, 2000).

Gli aschi si formano senza coniugazione, sono evanescenti e contengono da 1 a 4 ascospore. Le ascospore sono a forma di cappello e sferoidali, con il bordo pieno e, se rilasciate, tendono ad agglutinare.

1.4.1 I lieviti *Brettanomyces*

Le alterazioni più importanti dei vini sono causate dallo sviluppo di lieviti appartenenti ai generi *Brettanomyces/Dekkera*.

Il genere *Brettanomyces/Dekkera* appartiene alla famiglia delle *Cryptococcaceae*.

Allo stato attuale sono ufficialmente riconosciute 5 specie:

1. *Brettanomyces nanus*
2. *Brettanomyces custersianus*
3. *Brettanomyces nardensis*
4. *Brettanomyces anomalus*
5. *Brettanomyces bruxellensis*.

Per le ultime due specie sono state osservate le forme telomorfe, o perfette, che prendono rispettivamente il nome di *Dekkera anomala* e *Dekkera bruxellensis* (Fell &, Kurtzman 2000).

Brettanomyces e *Dekkera* sono pertanto la forma perfetta ed imperfetta dello stesso genere, ma con analoghi deprecabili effetti sulla qualità dei vini.

Il metabolismo e lo sviluppo di *Brettanomyces/Dekkera*, come per la maggior parte dei microrganismi, risulta influenzato da alcuni fattori chimico-fisici,

quali la presenza di ossigeno, anidride solforosa ed etanolo, variazioni di pH, temperatura e fattori nutrizionali.

Questi lieviti, pur sviluppandosi in condizioni di anaerobiosi, risultano sensibili alla disponibilità di ossigeno in quanto la crescita e la fermentazione tendono ad aumentare in sua presenza; sono inibiti dall'alta concentrazione di etanolo e da una quantità maggiore di 16 mg/L di anidride solforosa. La temperatura è un fattore importante in quanto influisce sulla velocità di crescita di tutti i microrganismi; entro certi limiti accelera sia le reazioni chimiche sia le reazioni biochimiche.

I *Brettanomyces*, come la maggior parte dei lieviti, è mesofilo, ossia si sviluppa tra i 15 °C e i 45 °C e la crescita è ottimale a temperature comprese tra i 20 °C e i 37 °C, mentre le basse temperature ne inibiscono la crescita.

Quindi, tra le caratteristiche distintive di *Brettanomyces* vi è la capacità di sopravvivere in condizioni di anaerobiosi e sotto stress (basso pH, etanolo oltre il 10% v/v, bassa quantità di zuccheri).

I ceppi *Brettanomyces/Dekkera* hanno generalmente una morfologia allungata, hanno un breve ciclo vitale, lenta crescita e producono un'elevata quantità di acido acetico in condizioni di aerobiosi (*Figura 7*).

Quando *Brettanomyces/Dekkera* si sviluppano, producono metaboliti come, esterasi, acido acetico, acidi grassi volatili e tetraidropiridine, che risultano sgradevoli nel vino in quanto danno sapore di medicinale, di fumo, di roditore, di colla e di stalla.

La diffusione di questi lieviti spoilage nell'ambiente della cantina avviene attraverso l'importazione di vini contaminati, scarsa igienizzazione di tubi flessibili, serbatoi e botti di legno o attraverso l'adesione passiva al corpo della mosca di frutta (Edwards & Fugelsang, 2007).

L'aumento della gradazione alcolica durante la fermentazione causa generalmente una diminuzione della quantità dei microrganismi presenti; tuttavia, poiché la specie *Brettanomyces* ha una buona resistenza all'etanolo, nel vino la sua presenza non si riduce; perciò, durante la vinificazione è necessario rispettare le norme igieniche.

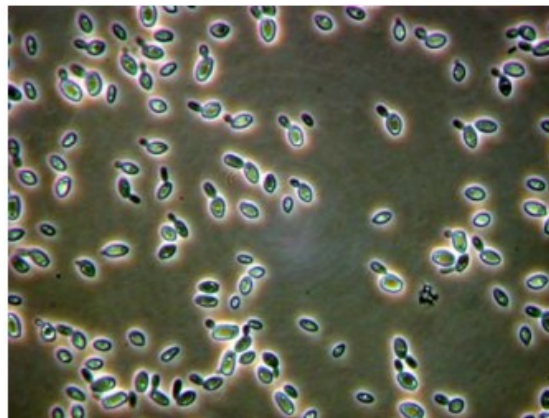


Figura 7: Immagine di una coltura di *Brettanomyces* al microscopio ottico in contrasto di fase. (Vinidea.Net-

Rivista Internet Tecnica Del Vino, 2005, N.5/2)

1.5 Principali metodi di controllo dei lieviti *Brettanomyces* nel vino

A causa dell'impatto di questi lieviti sulla qualità del vino, i metodi di controllo sullo sviluppo di questi microorganismi risultano essere importanti campi di studio.

Un primo approccio di prevenzione di contaminazione da *Brettanomyces* consiste nella scelta delle uve sane, infatti essi sono generalmente più presenti sulle uve ammuffite.

Anche il legno favorisce la crescita di questo lievito, in quanto capace di utilizzare il cellobiosio come fonte di carbonio; tuttavia, le botti risultano difficili da pulire e disinfettare in quanto la microporosità naturale del legno rende difficile la sua completa disinfezione. Per il loro risanamento sono stati studiati diversi approcci, ma nessuno di questi permette di rimuovere del tutto la presenza di *Brettanomyces* dalla superficie interna delle doghe o dal cocchiame.

Sono stati messi a punto diversi metodi per la prevenzione dello sviluppo di tali lieviti: (i) una adeguata igiene della cantina, (ii) solfitazione e (iii) invecchiamento a bassa temperatura. Tuttavia, durante l'invecchiamento del vino, alcune di queste procedure non possono essere attuate, per cui, se il vino risulta contaminato si pratica una filtrazione sterile (cut-off Ø 0,45 µm di

porosità), che tuttavia influisce negativamente sul corpo e sulla viscosità del vino, abbassandone la qualità e quindi causa di consistenti perdite economiche nella commercializzazione.

1.6 Impiego del Rooibos nella produzione di vino come sostituto dell'anidride solforosa

Il principale antiossidante normalmente utilizzato nella produzione del vino è l'anidride solforosa, il cui limite legale nei vini da tavola sudafricani è di 150 mg/L, mentre nell'Unione Europea, il limite è di:

- 160 mg/L nei vini rossi
- 210 mg/L nei vini bianchi e rosati

Tuttavia, per motivi di salute è necessario abbassare i livelli di SO₂ nel vino.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha esaminato i livelli di SO₂ accettati dall'organismo, stabilendo che la dose massima giornaliera è di 0,7 mg per 1 kg di peso; mentre quella letale è di 1,5 g/kg.

Tra le possibili alternative naturali all'utilizzo dell'anidride solforosa è possibile annoverare una serie di molecole, quali: i derivati della chitina (chitosano) di origine fungina, ossia polimeri di origine naturale non animale, non allergeni e biodegradabili o il lisozima, un estratto dall'albume dell'uovo ad attività battericida, la cui efficacia è stata dimostrata in diversi lavori (Delfini et al., 2004; Tosi et al, 2008;) dove si è osservata una drastica riduzione della popolazione batterica sia con l'aggiunta del lisozima nel mosto sia in coda alla fermentazione alcolica.

Tra le molecole ad azione antimicrobica sicuramente si possono annoverare i composti polifenolici. Una ricca fonte naturale di polifenoli è il Rooibos (un infuso che si ricava dalle foglie della pianta *Aspalathus linearis*, appartenente alla famiglia delle Leguminose) per via delle sue proprietà antiossidanti naturali, simili a quelle dei solfiti.

Si ritiene che queste proprietà antiossidanti del Rooibos siano in grado di proteggere il vino dall'ossidazione che lo rende più soggetto a deterioramento batterico (De Wet, 2015).

Questa pianta è nota per impartire benefici per la salute, in particolare sotto forma di infuso; tuttavia, l'utilizzo di questa nella produzione di vino rosso è stata finora poco conosciuta.

A causa delle caratteristiche pedoclimatiche ideali per la coltivazione del Rooibos, i primi studi effettuati e i primi vini ottenuti con l'utilizzo del Rooibos si sono svolti in Sud Africa, in quanto questo è adatto a sopravvivere in habitat con estati calde e molto secche.

I primi studi effettuati e i primi vini ottenuti con l'utilizzo del Rooibos si sono svolti in Sud Africa. Nel febbraio 2015, il ministro per le opportunità economiche del Capo Occidentale, Allan Winde, ha brevettato una tecnica unica di utilizzo di Rooibos e legno di Honeybush nel processo di produzione del vino.

KWV (Kooperatiewe Wijnbowers Vereniging van Zuid Afrika), in collaborazione con Audacia (azienda agricola produttrice di vino del Sudafrica), ha prodotto il suo primo vino contenente i legni ricavati dai tronchi maturi di piante di Rooibos, disponibili in commercio dal 2014 (figura 8).

Secondo Trevor Strydom e Michael van Niekerk dei vini Audacia, ci sono volute molte ricerche e sperimentazioni per escogitare il metodo e il dosaggio perfetti di Rooibos da aggiungere al vino. Quantità eccessive provocano un aroma prepotente da parte del Rooibos: si tradurranno in livelli sfavorevoli di tannini nel vino, soprattutto se viene utilizzato anche il tradizionale legno di quercia. Al contrario, se ne viene aggiunto troppo poco, il vino potrebbe mostrare segni di ossidazione.

Durante la fermentazione primaria del mosto, il lievito *Saccharomices cerevisiae* converte gli zuccheri naturali ad alcool. Durante questa fase, la fermentazione primaria del mosto provoca un innalzamento della temperatura, da temperatura ambiente a circa 20/30 °C. Questo aumento di temperatura è responsabile dell'estrazione di vari polifenoli dalla buccia, dai raspi e dai vinaccioli dell'uva presente nel mosto.

Contemporaneamente alla fase di fermentazione primaria, ai componenti del mosto si aggiunge la pianta *Aspalathus linearis* (Rooibos).

Preferibilmente, la fase di fermentazione primaria del mosto (convenzionale) può verificarsi in un intervallo di temperatura compreso tra 20 °C e 30 °C; tuttavia, attraverso l'uso della tecnologia esistente, l'intervallo di preferenza potrebbe essere molto maggiore con un massimo di 90 °C, questo facilita l'estrazione di ulteriori polifenoli del Rooibos, inclusi alcuni tannini aggiuntivi, antiossidanti e flavonoidi.

Questa aggiunta di materiale vegetale è in parte responsabile nel conferire un aspetto unico per quanto riguarda sapore, sensazione in bocca, aroma e colore del vino, inoltre, la presenza di antiossidanti nel mosto consente una conservazione più lunga del mosto.

Ciò consente a un enologo di ridurre notevolmente la quantità di conservanti artificiali (in particolare zolfo) che vengono tipicamente aggiunti al prodotto vitivinicolo, o semplicemente omettere del tutto lo zolfo dal processo.



Figura 8: Vino prodotto da “Audacia” contenente Rooibos. (<https://www.thetablemountainfund.org.za/a-glass-of-rooibos-red-please-sas-first-indigenously-wooded-wine/>).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

I lieviti *Brettanomyces/Dekkera* sono microrganismi indesiderati nel vino in grado di alterare negativamente le proprietà organolettiche di quest'ultimo (in particolare di quello rosso), causando torbidità, aumento dell'acidità volatile e producendo cattivi odori e sapori rendendo il vino sgradevole da bere e quindi causa di gravi perdite economiche.

Le aziende vinicole sono quindi alla continua ricerca di metodi naturali alternativi all'utilizzo di dosi massicce di solforosa, per debellare o contenere lo sviluppo di questi microrganismi.

Attualmente, le procedure di prevenzione di contaminazione da *Brettanomyces* riguardano l'adozione di adeguate norme igieniche, processi di vinificazione ad adeguati valori di pH e di temperatura, l'utilizzo dell'anidride solforosa. Tuttavia, quest'ultima risulta essere dannosa per la salute dell'uomo.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di analizzare le proprietà antiossidanti della pianta Rooibos e valutare la possibile capacità di questa di ostacolare l'azione dei lieviti spoilage *Brettanomyces* nel vino rosso.

In questo lavoro sono state studiate le foglie dei due tipi di Rooibos: il Rooibos verde (forma non fermentata) e il Rooibos rosso (forma fermentata).

Per entrambe le forme di Rooibos sono stati ottenuti degli estratti a caldo ed a freddo, ed entrambi sono stati sottoposti a tagli molecolari usando 4 differenti cut-off mediante l'uso di colonnine di cellulosa (membrana Ultracel, Amicon Ultra-15). Attraverso i tagli molecolari, si ottengono il permeato (diluato) e il retentato (concentrato).

Gli estratti e le frazioni ottenute (retentato e permeato), sono state analizzate per valutarne l'attività antiossidante in riferimento al contenuto in polifenoli e l'eventuale attività antimicrobica mediante test *in vitro*. Successivamente, le frazioni di Rooibos Verde e Rosso che avevano mostrato maggiore attività inibente nei confronti di lieviti spoilage sensibili nel test *in vitro*, sono state utilizzate per allestire prove di controllo dello sviluppo del lievito *Brettanomyces*. In particolare, è stata simulata in laboratorio una contaminazione da *Brettanomyces*, utilizzando vino sintetico inoculato separatamente con 14 ceppi appartenenti alla specie *B. bruxellensis* di varia origine. Lo scopo è stato quello di valutare, su un ampio spettro, l'eventuale efficacia del Rooibos nel limitare lo sviluppo di questi lieviti spoilage riducendo così l'utilizzo dell'anidride solforosa come agente antiossidante ed antisettico.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 TERRENI CULTURALI

YPD (Yeast Extract–Peptone–Dextrose Broth): 10 g/L di glucosio, 10 g/L di peptone, 5 g/L di estratto di lievito. Tale terreno in forma agarizzata prevede l'aggiunta di 9 g/L di agar. Si tratta di un terreno liquido ricco, utilizzato per l'isolamento, lo sviluppo ed il mantenimento delle colture di lievito. I lieviti sono microrganismi unicellulari eucarioti ed eterotrofi: necessitano pertanto per crescere di una fonte di carbonio (rappresentata in questo terreno dal D-glucosio o destrosio) e di alcuni amminoacidi che vengono forniti dalla presenza, nella formulazione, sia del peptone che dell'estratto di lievito (quest'ultimo assicura tra l'altro anche la presenza d'importanti precursori nucleotidici per la divisione cellulare e non solo).

AGAR MALTO (Difco Laboratoires, Detroit, Michigan): 5,4 g di estratto di malto, 3,6 g di agar, sciolti in 100 mL di acqua deionizzata, tamponato a pH 4,4 con tampone citrato-fosfato (acido citrico 0,1 M e sodio fosfato dibasico 0,2 M). È un terreno utilizzato per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti e nei prodotti farmaceutici.

3.2 PREPARAZIONE DEGLI INFUSI DI ROOIBOS

I due tipi di Rooibos studiati, Verde (RV) e Rosso (RR), sono stati utilizzati per ottenere due tipi di infusi: a caldo ed a freddo.

Le infusioni a freddo sono state preparate versando acqua minerale naturale della marca Frasassi, temperatura ambiente (circa 21 °C) sulle foglie di Rooibos poste all'interno di un barattolo di vetro.

Per il Rooibos rosso sono stati pesati:

- 1,25 g/100 mL di H₂O (TqF)
- 12,5 g/100 mL di H₂O (10xF)

Per il Rooibos Verde sono stati pesati:

- 1,25 g/100 mL di H₂O (TqF)
- 12,5 g/100 mL di H₂O (10xF)

Questi infusi sono stati posti sotto agitazione meccanica (150 rpm) una notte a 4 °C in camera fredda, ed in seguito filtrati con un colino in maglia fine per togliere in maniera grossolana le foglie, per poi essere sottoposto ad una seconda filtrazione con carta da filtro Whatman No.4.

Le infusioni a “caldo” sono state preparate nella maniera seguente: è stata versata acqua minerale naturale (Frasassi) portata ad ebollizione tramite

bollitore elettrico (100 °C) in un contenitore di pyrex contenente il campione di Rooibos precedentemente pesato:

Per il Rooibos Rosso sono stati pesati:

- 1,25 g/100 mL di H₂O (TqC)
- 12.5 g/ 100 di H₂O (10xC)

Per il Rooibos Verde, invece, sono stati pesati:

- 2,50 g/200 mL di H₂O (TqC)
- 25 g/200 mL di H₂O (10xC)

Gli infusi sono stati poi messi in microonde a massima potenza per 5 minuti e filtrati come descritto precedentemente per l'estratto a freddo.



Figura 9: Infusi di Rooibos Verde e Rosso (estratti a caldo e freddo).

3.2.1 CONCENTRAZIONE DEGLI INFUSI

Ciascun infuso è stato microfiltrato con filtri di acetato di cellulosa (con diametro dei pori 0,45 μm) sotto cappa a flusso laminare per garantire la sterilità dei campioni e conservato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prima di procedere alle analisi successive.

Tutti gli infusi ottenuti sono stati concentrati dieci volte ($10\times$) con lo scopo di massimizzare la concentrazione dell'eventuale principio ad azione antimicrobica. Tale concentrazione è stata fatta mediante l'uso di colonnine di cellulosa (membrana Ultracel, Amicon Ultra-15). Tali colonnine vengono generalmente usate per concentrare i campioni e offrono recuperi elevati in un vasto intervallo di tagli molecolari.

Nel caso specifico sono state utilizzate colonnine con membrane di taglio molecolare di 3 KDa, 10 KDa, 30 KDa e 50 KDa.

Procedura:

- Volume iniziale di campione, 10 mL
- 1. Si posiziona il dispositivo filtrante nel rotore di centrifuga (controbilanciato con un dispositivo simile) e si centrifugano i 10 mL di campione con una forza pari a 5000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per circa 15-60 minuti. La forza centrifuga consentirà il passaggio attraverso la membrana

filtrante delle molecole con grandezza inferiore rispetto al cut-off della stessa: in questo caso viene raccolto un volume pari a 9 mL; tale frazione che passa prende il nome di permeato (P). Al contrario, non sarà consentito il passaggio delle molecole più grandi del cut-off di membrana, le quali si concentreranno nel volume restante, in questo caso 1 mL; tale frazione prende il nome di retentato (R) (Figura 7).

2. Per recuperare il retentato (1 mL), si inserisce una pipetta nella parte inferiore del dispositivo filtrante e si preleva il campione nella zona laterale per assicurare il recupero totale evitando di danneggiare la membrana filtrante.

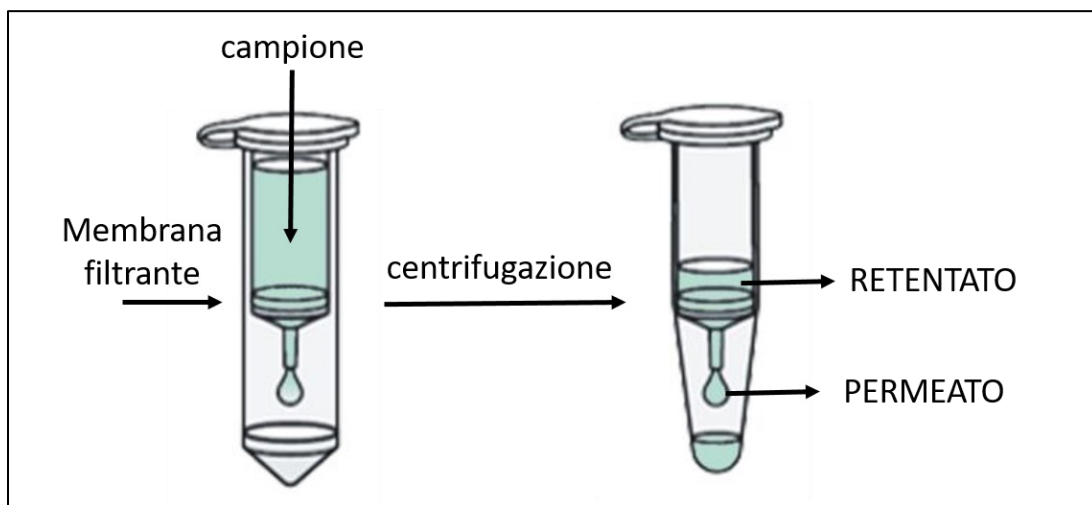


Figura 10: Esempio di colonnina filtrante

In tabella 2 sono riassunte le frazioni di RR e RV (sia gli infusi a caldo che quelli a freddo) con i relativi codici che si sono ottenute attraverso i tagli molecolari.

Le frazioni sono state conservate a -20 °C e successivamente testate mediante il Well-test per la loro azione antimicrobica nei confronti di ceppi di lievito sensibili.

CAMPIONI	CODICE
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRC-50R 10X
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRC-50P
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRC-30R 10X
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRC-30P
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRC-10R 10X
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRC-10P
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRC-3R 10X
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRC-3P
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVC-50R 10X
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVC-50P
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVC-30R 10X
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVC-30P
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVC-10R 10X
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVC-10P
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVC-3R 10X
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVC-RP

CAMPIONI	CODICE
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRF-50R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRF-50P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRF-30R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRF-30P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRF-10R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRF-10P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRF-3R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRF-3P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVF-50R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVF-50P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVF-30R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVF-30P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVF-10R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVF-10P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVF-3R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVF-RP

Tabella 2. Frazioni ottenute in seguito ai vari tagli molecolari

3.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIMICROBICA CONTRO BATTERI PATOGENI

Gli infusi di RR e RV ottenuti a caldo e freddo, ed i vari tagli molecolari sono stati testati per la loro attività antimicrobica su 5 comuni patogeni umani:

1. *Escherichia coli*
2. *Salmonella enterica*
3. *Listeria monocytogenes*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Candida albicans*

Ciascun batterio è stato coltivato in un brodo per il conteggio delle piastre (triptone 5,0 g/L; estratto di lievito 2,5 g/L; glucosio 1,0 g/L) utilizzato per consentire la crescita dei batteri a 30 °C per 24 ore, mentre il brodo YPD è stato utilizzato per *C. albicans* nelle stesse condizioni (Agarbaty et al; 2020).

Le prove sono state allestite utilizzando piastre Microtiter-96 well (*figura 11*). In ogni pozzetto sono stati inseriti 100 µL della sospensione di patogeno da testare (alla concentrazione di 1×10^4 UFC/mL) e 100 µL del campione di Rooibos; per il controllo, al posto del campione di Rooibos, sono stati aggiunti ai patogeni 100 µL di soluzione fisiologica (NaCl 0,9 %) poiché, essendo questa una soluzione isotonica, permette il mantenimento delle cellule. La piastra è stata posta ad incubare nel termostato a 37 °C per 24 h, dopodiché si

è andati a valutare la torbidità di ciascun pozzetto, indicante che il patogeno è cresciuto e quindi la frazione in questione non ha avuto attività inibente. Il risultato è stato espresso con il simbolo + in caso di crescita del patogeno, - in caso di non crescita del patogeno (ad indicare attività inibente del Rooibos) e \pm in caso di poca crescita.

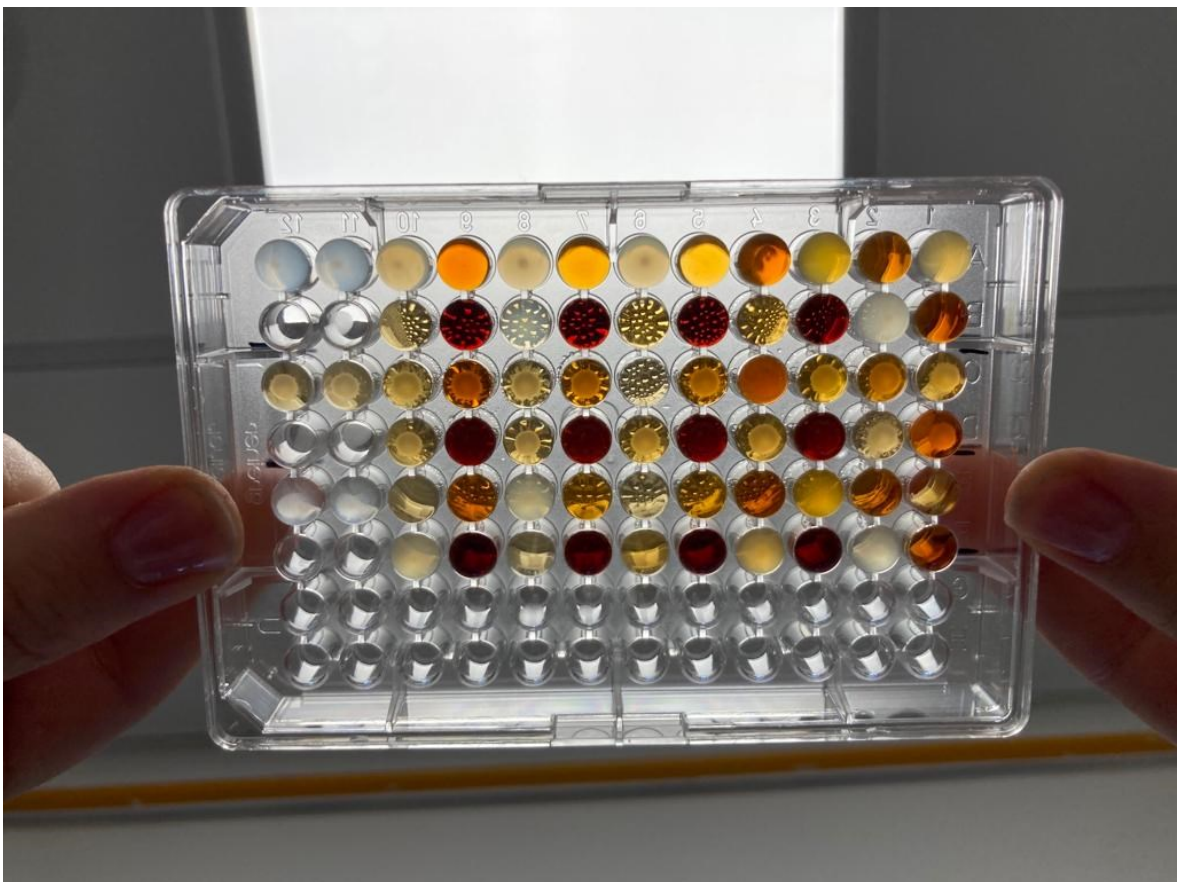


Figura 11: Microtiter con Rooibos e patogeni dopo 24 h.

3.4 TAGLI MOLECOLARI IN SERIE DEGLI INFUSI DI RR E RV

Tutti gli infusi di RR e RV (RRC, RRF, RVC, RVF) sono stati sottoposti anche a tagli molecolari in serie. Cioè:

1. Si prelevano 10 mL dell'infuso e si mettono nella colonnina da 50 KDa e avviata la centrifugazione a freddo (4 °C) sempre a 5000 rpm 15-60 minuti. Si recupera 1 mL di retentato ed i 9 mL di permeato. Il permeato di questa frazione verrà posto nella colonnina con cut-off di membrana 30 KDa e sottoposto a centrifugazione. Anche in questo caso verrà recuperato 1 mL di retentato e 8 mL di permeato.
2. Si prelevano poi gli 8 mL di permeato e si pongono nella colonnina con cut-off di membrana da 10 KDa e si sottopone a centrifugazione.
3. Dalla colonnina da 10 KDa si avrà 1 mL di retentato e 7 mL di permeato, il quale verrà posto nell'ultima colonnina con cut-off di membrana da 3 KDa e sottoposto a centrifugazione.

Una volta effettuati i tagli molecolari in serie, le frazioni ottenute, riassunte in Tabella 4 sono state conservate a -20 °C e poi testate per la loro attività antimicrobica tramite Well-test utilizzando Agar Malto pH 4,4 e come ceppo sensibile il lievito *Saccaromyces cerevisiae* ceppo 6500.

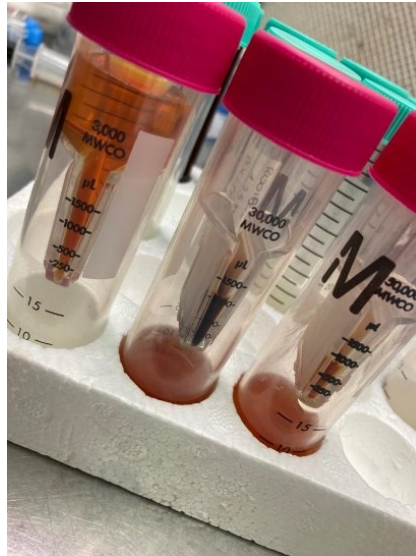


Figura 12: Colonnine da centrifuga

CAMPIONI	CODICE
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRC-50R 10X S
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRC-50P S
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRC-30R 10X S
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRC-30P S
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRC-10R 10X S
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRC-10P S
RR infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRC-3R 10X S
RR infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRC-3P S
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVC-50R 10X S
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVC-50P S
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVC-30R 10X S
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVC-30P S
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVC-10R 10X S
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVC-10P S
RV infuso a caldo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVC-3R 10X S
RV infuso a caldo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVC-RP S
CAMPIONI	CODICE
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRF-50R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RRF-50P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRF-30R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RRF-30P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRF-10R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RRF-10P
RR infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRF-3R 10X
RR infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RRF-3P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVF-50R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 50 Kda	RVF-50P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVF-30R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 30 Kda	RVF-30P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVF-10R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 10 Kda	RVF-10P
RV infuso a freddo: Retentato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVF-3R 10X
RV infuso a freddo: Permeato Taglio Molecolare da 3 Kda	RVF-RP

Tabella 3. Frazioni ottenute in seguito ai vari tagli molecolari in serie

3.5 VALUTAZIONE ATTIVITA' ANTIMICROBICA (WELL-TEST)

Per valutare l'attività antimicrobica delle differenti frazioni delle foglie di Rooibos, ottenute dai tagli molecolari eseguiti in serie e non, è stato effettuato un saggio secondo il metodo del pozzetto, descritto da *Woods & Bevan* nel 1968 (Well-test).

Il ceppo sensibile utilizzato è il *S. cerevisiae* codice di laboratorio 6500, proveniente da una coltura in piastra di YPD agar. Questo è stato sospeso in acqua sterile fino ad ottenere una sospensione avente una densità ottica OD₆₀₀ tra 0,06 e 0,08 misurata mediante uno spettrofotometro (SHIMADZU SPECTROPHOTOMETER UV-1800). Questo valore corrisponde ad una concentrazione cellulare di circa 1×10^6 cell/mL.

Un mL della suddetta sospensione microbica è stato versato all'interno di una piastra Petri insieme al terreno Agar Malto (tamponato a pH 4,4 con tampone citrato-fosfato) e ben distribuito (composizione descritta nel paragrafo 3.1). Dei pozzetti di piombo sterili, con diametro di 7 mm sono stati appoggiati nel terreno prima che solidificasse. Una volta solidificato, i cilindretti sono stati rimossi con una pinza sterile. All'interno del pozzetto, così creato, sono stati posti 70 µL di ogni frazione da testare (Bevan e Woods, 1968).

Le piastre sono state incubate a 22 °C e analizzate mediante misurazione (in mm) di un alone di inibizione (alone trasparente) della crescita del ceppo sensibile, a distanza di 24 h, 36 h, 48 h e 72 h (Figura 12).

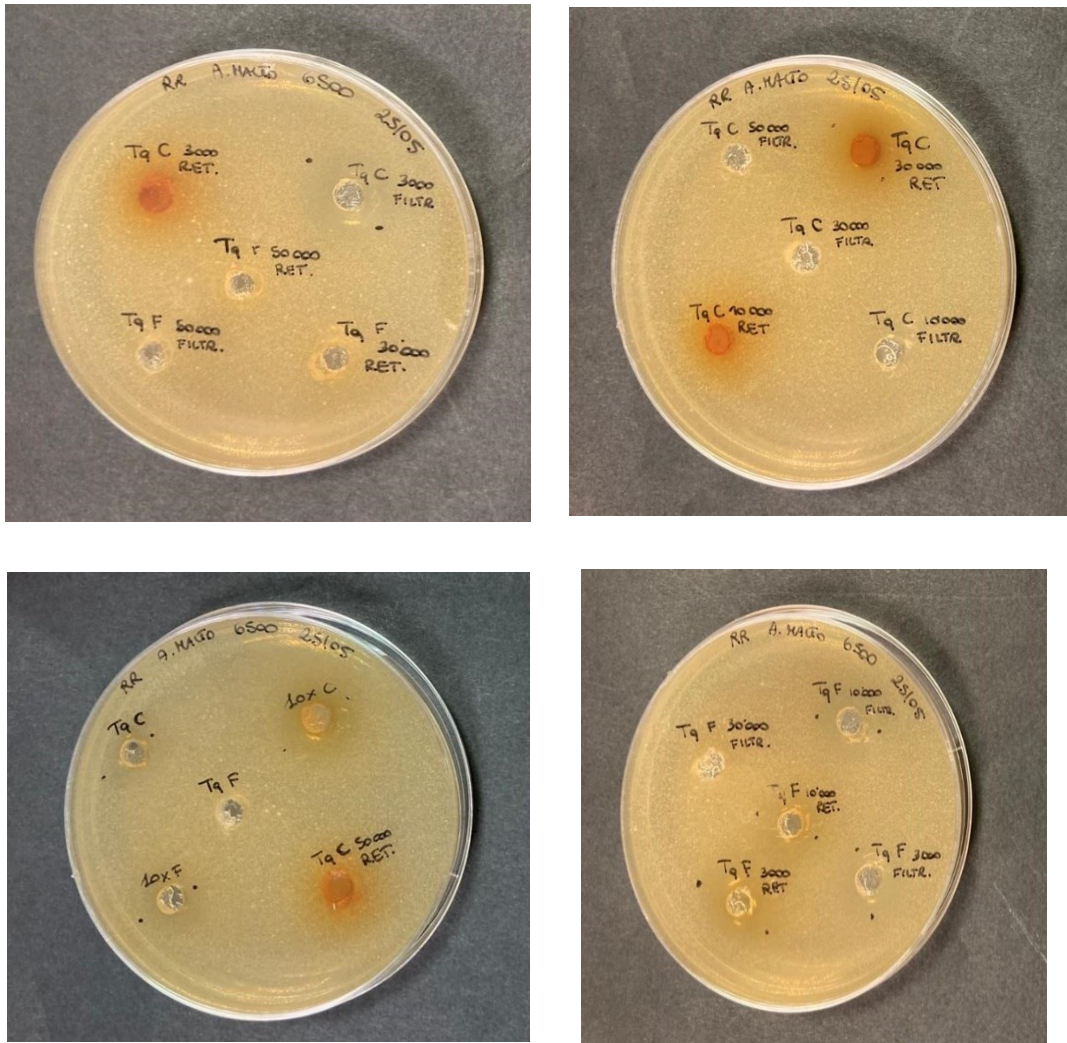


Figura 13: Alone di inibizione su piastra di agar malto.

Successivamente e tramite lo stesso tipo di test, le frazioni che hanno mostrato attività antimicrobica nei confronti del ceppo *S. cerevisiae* 6500 (TqC, per il

Rooibos Rosso e 30000R TqF, per il Rooibos Verde) sono state testate anche su vari ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* (figura 13), essendo questi ultimi, i responsabili della produzione di etilfenoli (composti che rendono il vino sgradevole) nel vino.

In particolare, sono stati utilizzati i ceppi di *B. bruxellensis*: Fi10, Fi38, Fi14, 5-6A, 10A, 14A, 212D, 6705, EB1G, G2, 21A4, 6706, C2.3.

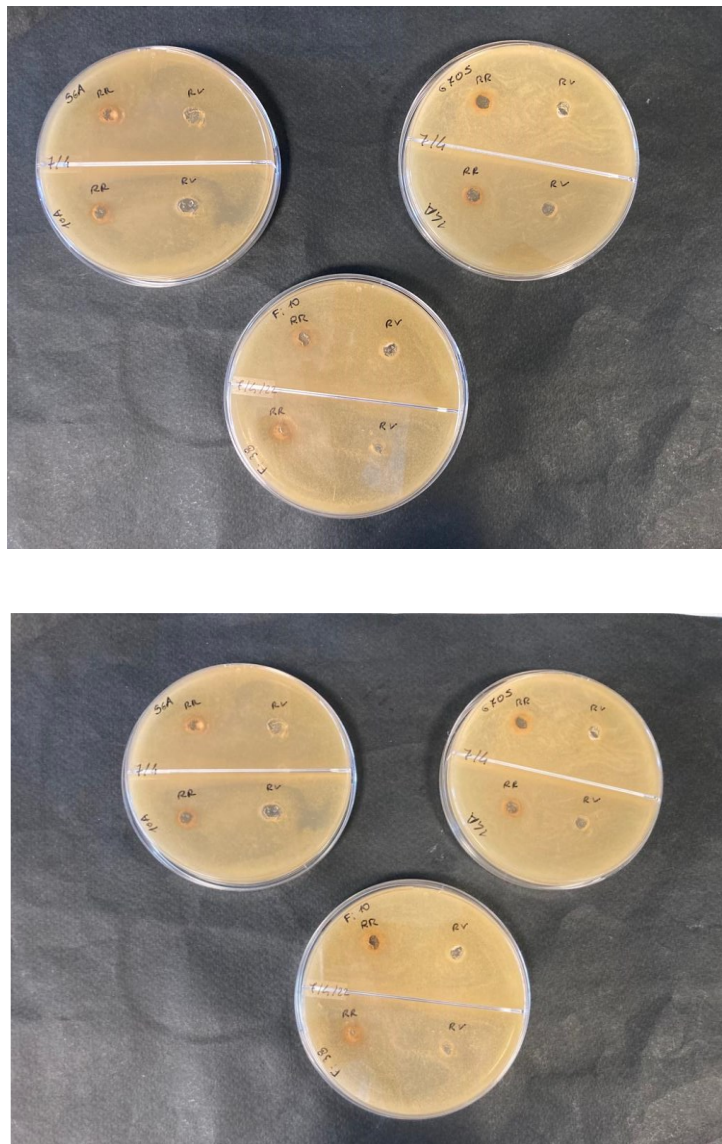


Figura 14: Well-Test con Rooibos e ceppi di *Brettanomyces*

3.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DEL ROOIBOS NEL CONTROLLO DELLO SVILUPPO DEI LIEVITI *BRETTANOMYCES*

È stata testata l'attività antimicrobica delle frazioni di Rooibos su alcuni ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* precedentemente adattati su vino sintetico.

3.6.1 PREPARAZIONE DEL VINO SINTETICO

Considerando un volume finale di 1 L, si pesano:

- 5 g Acido Tartarico
- 5 g Acido Malico
- 0,30 g Cloruro di Calcio
- 0,13 g Magnesio Solfato
- 1 g Di-ammonio Fosfato
- 125 mL Etanolo
- 2,5 g Idrossido di Potassio

In un becher si versano 0,75 L di acqua deionizzata e si pone in agitazione su un agitatore meccanico con l'aggiunta di un'ancoretta magnetica. Poco alla volta si aggiungono i vari componenti. Questo è un passaggio importante per impedire la formazione di precipitati.

Quando tutti i composti precedentemente descritti sono ben sciolti si procede con l'aggiunta di vitamine, quali:

- 0,02 g Mio-inositolo
- 0,4 mg Piridossina cloridrato
- 0,4 mg Acido nicotinico
- 0,2 mg Calcio pantotenato
- 0,1 mg Tiamina cloridrato
- 0,04 mg Acido p-aminobenzoico
- 0,04 mg Riboflavina
- 0,03 mg Biotina
- 0,04 mg Acido folico

Una volta disciolte tutte le componenti, si porta a volume finale di 1 L con acqua deionizzata.

Il vino sintetico così ottenuto è stato sterilizzato per filtrazione (cut-off membrana filtrante 0,45 μm) utilizzando l'ausilio di una pompa a vuoto.

Una volta pronto, si ripone il vino sintetico in cella fredda a 4 °C fino all'utilizzo.

3.6.2 ADATTAMENTO E MONITORAGGIO DELLA VITALITÀ DEI LIEVITI *BRETTANOMYCES* IN VINO SINTETICO

Tredici diversi ceppi di lievito appartenenti alla specie *B. bruxellensis*, afferenti alla collezione del dipartimento DiSVA dell'Università Politecnica delle Marche, sono stati adattati in vino sintetico per 60 giorni. Questo passaggio è importante in quanto permette ai lieviti di adattarsi alle condizioni enologiche con ambiente “sfavorevole” e cioè a bassa concentrazione di nutrienti ed in presenza di etanolo, condizione che mima l'eventuale contaminazione in cantina da *Brettanomyces*. Prima della fase di adattamento, tali ceppi di lievito sono stati precedentemente coltivati/mantenuti in coltura pura in terreno ricco YPD agar.

Procedura di adattamento:

- Si va ad aliquotare 40 mL di vino sintetico in contenitori Falcon da 50 mL
- Si preleva un'ansata di lievito dalle colture pure in piastra di YPD e si stempera nel vino sintetico
- Si vortexa e si effettua la conta attraverso la Camera di Thoma-Zeiss, considerando questo valore la concentrazione del lievito iniziale (cioè al tempo zero)

La Camera di Thoma-Zeiss (*figura 14*) è una camera conta globuli in vetro con doppio reticolo di lettura. Ogni reticolo presenta un solo grande quadrato centrale, corrispondente al quadrato centrale del reticolo di Neubauer, con area di $1 \times 1 \text{ mm}^2$ suddiviso in 16 quadrati, la profondità della camera è di 0,1 mm. Ogni quadrato è, a sua volta, suddiviso in gruppi di quadrati più piccoli di $0,05 \times 0,05 \text{ mm}^2$.

La capacità del lievito di adattarsi a questo substrato è stata fatta nel tempo monitorando la sua capacità di sopravvivere o crescere attraverso conte vitali su piastre di YPD dopo: (i) 15 giorni, (ii) 30 giorni, (iii) 60 giorni dall'inizio dell'adattamento.

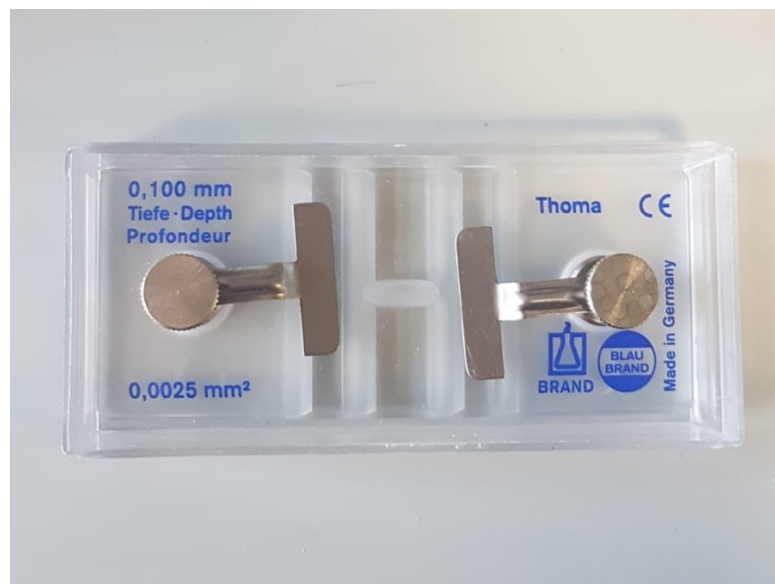


Figura 15: Camera di Thoma

3.6.3 CONTE VITALI

Si è testato ogni ceppo di *Brettanomyces* seguendo i rapporti: 1:10, 1:5, 1:2 per il TqC (Rooibos Rosso) e 1:10 per il 30000 R TqF (Rooibos Verde).

Ogni sterilin conterrà, quindi:

- Per il rapporto 1:10: 0,5 ml di Rooibos e 4,5 ml di vino sintetico
- Per il rapporto 1:5: 1 ml di Rooibos e 4 ml di vino sintetico
- Per il rapporto 1:2: 2,5 ml di Rooibos e 2,5 ml di vino sintetico.

Una volta preparati lo sterilin di controllo e gli sterilin contenenti anche il

Rooibos, si è effettuata la conta vitale su piastra con terreno YPD con piastre:

10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} a seconda della crescita dei *Brettanomyces*.

Per il Rooibos Rosso si è utilizzato il terreno YPD con aggiunta

dell'antibiotico Cloranfenicolo, in quanto è stata osservato che, in assenza di questo, si avevano piastre contaminate.

Le conte vitali sono state osservate dopo 7, 14, 21 e 30 giorni.

3.6.4 ALLESTIMENTO DELLA PROVA DI INIBIZIONE DEL ROOIBOS CONTRO I LIEVITI *BRETTANOMYCES* IN VINO SINTETICO

La prova è stata allestita con lo scopo di testare la capacità del Rooibos di contenere/inibire lo sviluppo dei lieviti *Brettanomyces*, riconosciuti come lieviti spoilage del vino e perciò causa di ingenti danni economici. Tale prova è stata allestita in vino sintetico nel quale sono stati inoculati, separatamente, 11 ceppi di *B. bruxellensis*, mimando una potenziale contaminazione microbiologica del vino. Dopodiché è stata aggiunta la dose di Rooibos da testare. In particolare, sono state saggiate le frazioni Rooibos Rosso TqC in rapporto 1:10, 1:5, 1:2 rispetto al volume finale di vino sintetico, e Rooibos Verde freddo 30R 10x S in rapporto 1:10. Tali frazioni sono state scelte in quanto risultate le migliori dal Well-test.

La prova è stata allestita in sterilin contenenti, per ciascuna frazione testata:

- Per il rapporto 1:10: 0,5 mL di Rooibos e 4,5 mL di vino sintetico
- Per il rapporto 1:5: 1 mL di Rooibos e 4 mL di vino sintetico
- Per il rapporto 1:2: 2,5 mL di Rooibos e 2,5 mL di vino sintetico.

Si è poi proceduto con l'inoculo dei ceppi di *Brettanomyces* ad una concentrazione finale pari a 10^4 cell/mL, valore borderline nel vino per lo sviluppo degli etilfenoli responsabili di sentori sgradevoli.

Per ciascun ceppo sono state allestite prove di controllo contenenti vino sintetico e *Brettanomyces*, quindi senza frazione di Rooibos per vedere lo sviluppo microbiologico in assenza del principio attivo testato.

Tutti i campioni sono stati incubati in termostato a 22 °C e il monitoraggio dello sviluppo microbiologico è stato effettuato attraverso conte vitali su piastra, utilizzando terreno di coltura YPD agar.

Le conte vitali sono state fatte a 7, 14, 21 e 30 giorni dall'allestimento della prova.

In seguito, è stata valutata la quantità di polifenoli presente all'interno delle frazioni che hanno mostrato una maggiore inibizione contro i lieviti *Brettanomyces*.

3.7 QUANTIFICAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI: SAGGIO TPC

Il saggio per determinare il “Contenuto di Polifenoli Totali” (TPC) è un metodo che utilizza il reattivo di Folin-Ciocalteu per determinare la capacità riducente di un campione in esame, che può essere correlata con il suo contenuto in fenoli. (Singleton, 1999; Prior, 2005).

Il metodo Folin-Ciocalteu (FC) è il metodo ufficiale per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) nei vini nella Comunità Europea. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin, costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Nello specifico, in ambiente basico si ha la deprotonazione dell'anello fenolico con formazione dell'anione fenolato, ione in grado di ridurre il reattivo FC che, una volta ridotto, presenta un picco di assorbimento a 750 nm (Singleton et al., 1965).

L'analisi è condotta mediante determinazione spettrofotometrica.

Si tratta di una reazione colorimetrica: il reattivo presenta una colorazione gialla che, in seguito a ossidazione dei fenoli, vira al blu, con un picco di assorbanza massimo nella regione 745-760 nm. Tanto maggiore sarà la quantità di fenoli presente, tanto maggiore sarà l'intensità del colore risultante. Per

evitare che questo reagente venga ridotto da altri composti oltre ai fenoli, alla miscela si aggiunge il Carbonato di Sodio che crea un ambiente alcalino che favorisce la dissociazione ionica dei fenoli e, quindi, facilita la loro reazione con il reattivo. La concentrazione di polifenoli viene poi espressa come equivalenti di acido gallico (GAE mM). L'acido gallico è un polifenolo appartenente alla sottoclasse degli acidi fenolici ed esso viene utilizzato per realizzare una retta standard, che servirà per la quantificazione dei polifenoli (Carrieri et al., 2016).



Figura 16: Microwell Plate da 96 pozzetti dopo il saggio TPC sui campioni di Rooibos prima della lettura allo spettrofotometro.

3.7.1 SAGGIO TPC DI RR e RV

Il saggio del TPC è stato eseguito prima sulle frazioni di Rooibos Rosso e Verde ed in seguito si è effettuata la stessa prova con i campioni di *Brettanomyces* adattati su vino sintetico con aggiunta del Rooibos, utilizzando solo i ceppi che mostravano una riduzione nella conta vitale su piastra nelle quattro settimane: C2.3 (Rooibos Rosso rapporti 1:5, 1:10), 5-6A (Rooibos Rosso rapporto 1:10), Fi14 (Rooibos Rosso rapporto 1:10), G2 (Rooibos Rosso rapporti 1:5, 1:10), 14A (Rooibos Rosso rapporto 1:10), 6706 (Rooibos Rosso rapporto 1:10), 10A (Rooibos Rosso rapporto 1:10), 21A4 (Rooibos Rosso rapporti 1:5,1:10). Per il Rooibos Verde (rapporto 1:10) si sono testati i ceppi: 10A, C2.3, 14A, 5-6A, Fi14.

Per entrambe le prove la procedura è stata la stessa:

1. Preparazione dei reagenti:

- Acido gallico 20 mM in H₂O deionizzata: 0,0068 g/2 mL
- Reattivo di Folin diluito: 4 mL di reattivo in 36 mL di H₂O deionizzata
- Soluzione acquosa di Carbonato di sodio: 10% P/V
- Si procede a preparare le soluzioni per la retta standard in eppendorf da 1.5 mL, secondo le concentrazioni:
- A: 0.035 g/L (63 µL A. gallico + 937 µL H₂O)

- B: 0,018 g/L (500 μ L A + 500 μ L H₂O)
- C: 0,009 g/L (500 μ L B + 500 μ L H₂O)
- D: 0.0045 g/L (500 μ L C + 500 μ L H₂O)
- E: 0,0022 g/L (500 μ L D + 500 μ L H₂O)
- F: 0,0011 g/L (500 μ L E + 500 μ L H₂O)

2. Vengono diluiti i campioni:

- Rooibos Rosso, diluizione 1:5 (40 μ L di campione + 160 μ L di acqua)
- Rooibos Verde, diluizione 1:20 (10 μ L di campione + 190 μ L di acqua)
- Rooibos Rosso, frazione TqC con *Brettanomyces* adattati su vino sintetico, diluizione 1:10 (20 μ L di campione + 180 μ L di acqua)
- Rooibos Verde freddo, 30 R 10x S, si utilizza il tal quale, quindi non è stata effettuata nessuna diluizione

3. Viene allestita la micropiastra da 96 pozzetti con:

- Retta standard: 150 μ L di Folin + 50 μ L di Acido gallico diluito
- Bianco: 50 μ L di acqua + 150 μ L di Folin
- Campione: 50 μ L di estratto + 150 μ L di Folin

4. Una volta allestita la piastra, si lascia al buio per 10 minuti

5. Si aggiungono 100 μ L di Na₂CO₃ in ogni pozzetto e si mette la piastra in un incubatore al buio a 37 °C per 30 minuti

6. La piastra viene posta nel lettore di micropiastre (Biotek) e dopo agitazione si esegue la lettura a 760 nm
7. Infine, con i valori di assorbanza ottenuti, si costruisce la retta di taratura (*figura 17*) la cui pendenza (STAT) permette di calcolare le concentrazioni dei campioni in esame attraverso l'equazione ($y=mx+q$).

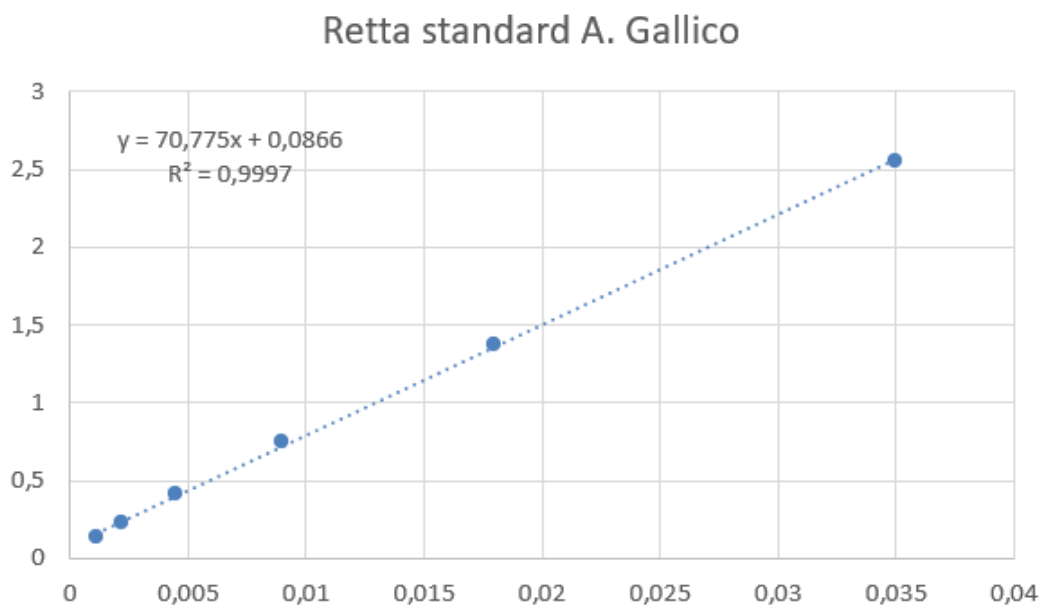


Figura 17: Retta di taratura effettuata con Acido Gallico per il saggio TPC

Per la costruzione della retta di taratura si sono messi in grafico in ordinata i valori dell'assorbanza ($Y=A_{760}$) e in ascissa i valori della concentrazione di Acido Gallico nei pozzetti ($x=\mu\text{M GAEq}$).

A questo punto, trovata la pendenza della retta che meglio interpola i punti (STAT) è possibile ricavare la concentrazione di GAEq nei pozzetti in cui sono stati introdotti i campioni diluiti di estratto da analizzare. È stato possibile calcolare la seguente equazione: $\mu\text{M GAEq pozzetto} = A760/\text{STAT}$.

Quindi, utilizzando la formula: $C_i * V_i = C_f * V_f$ dove:

- C_i è la concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ del campione di estratto diluito;
- V_i è il volume del campione di estratto diluito aggiunto nel pozzetto (50 μL);
- C_f è la concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ nel pozzetto;
- V_f è il volume di soluzione contenuta nel pozzetto (300 μL)

Si può risalire alla concentrazione $\mu\text{M GAEq}$ del campione di estratto diluito:

$C_i = \mu\text{M GAEq campione di estratto diluito} = \mu\text{M GAEq nel pozzetto} * 300\mu\text{L} / 50\mu\text{L}$.

Una volta calcolate le concentrazioni finali equivalenti in Acido Gallico, queste andranno moltiplicate per il fattore di diluizione in questione, che, nello specifico sarà:

- * 5: RR
- * 20: RV

- * 10: Rooibos Rosso, frazione TqC con *Brettanomyces* adattati su vino sintetico
- Per il RV non si effettua nessuna moltiplicazione in quanto il campione non è stato diluito, quindi la concentrazione ricavata attraverso la costruzione della retta di taratura, rispecchia la concentrazione effettiva di polifenoli all'interno del RV.

I risultati ottenuti sono la media di tre esperimenti eseguiti in triplicato.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 WELL-TEST INFUSI RR E RV SOTTOPOSTI A TAGLIO MOLECOLARE NON IN SERIE

L'attività dei due infusi, RR e RV, sottoposti a taglio molecolare non in serie, è stata testata attraverso Well-test, utilizzando due terreni:

1. Agar Malto pH 4.4: pH ottimale per l'attività del principio tossico in generale
2. YPD pH 6,5: non tamponato

I risultati hanno evidenziato che i due infusi presentano attività antimicrobica con il terreno "Agar Malto", al contrario, non si è evidenziata nessuna attività con il terreno "YPD", questo ad indicare che il pH risulta essere fondamentale nell'attività del Rooibos.

Per il RR, riguardo le varie frazioni saggate: TqF, TqC, 10xF, 10xC, i risultati sono riportati in tabella 4.

In particolare tutti gli infusi hanno mostrato azione antimicrobica, ad eccezione del TqF.

CODICI INFUSI	AGAR MALTO Ph 4,4
TqF	0 mm
TqC	15 mm
10XF	14,5 mm
10XC	18 mm

Tabella 4: Well-test dell'infuso RR con terreno Agar Malto pH 4,4 e relativi diametri degli aloni di inibizione

Riguardo le frazioni di taglio molecolare, ottenute da infusi a freddo (riportate in tabella 5), mostrano attività inibente quelle sottoposte sia a taglio molecolare da 10 KDa sia quelle da 3 KDa (sia retentato che permeato). Questo potrebbe essere indice del fatto che il principio tossico ha peso molecolare intorno ai 10 KDa, dunque alcune molecole potrebbero essere trattenute dalla membrana e altre oltrepassarle sotto l'effetto della pressione.

Laddove presente l'entità dell'azione antimicrobica è pari ad un alone di range compreso tra 16-20 mm.

Nello specifico, le frazioni che hanno mostrato attività sono risultate essere: RRF-30R 10X, RRF-10P, RRF-3R 10X, RRF-3P.

CODICI FRAZIONI	AGAR MALTO Ph 4,4
RRF-50R 10X	0 mm
RRF-50P	0 mm
RRF-30R 10X	0 mm
RRF-30P	0 mm
RRF-10R 10X	16 mm
RRF-10P	16 mm
RRF-3R 10X	20,5 mm
RRF-3P	15 mm

Tabella 5: Well-Test delle frazioni RRF con terreno Agar Malto pH 4,4 e relativi diametri degli aloni di inibizione.

L'estrazione a caldo, invece, riduce il principio tossico (tabella 6), infatti, non si osservano attività inibenti ad eccezione della frazione RRC-30R 10X e la frazione RRC-3P. Questo potrebbe fare presupporre a una natura proteica dell'agente inibente.

Anche in questo caso, il risultato suggerisce un principio tossico avente un peso molecolare di circa 30 KDa.

CODICI FRAZIONI	AGAR MALTO Ph 4,4
RRC-50R 10X	0 mm
RRC-50P	0 mm
RRC-30R 10X	15,5 mm
RRC-30P	0 mm
RRC-10R 10X	0 mm
RRC-10P	0 mm
RRC-3R 10X	0 mm
RRC-3P	19 mm

Tabella 6: Well-test delle frazioni RRC con terreno Agar Malto pH 4,4.

Situazione diversa è stata osservata per il RV, per il quale, la maggior parte dei campioni testati non ha mostrato attività inibente, ad eccezione delle frazioni: RVF-10R 10X, RVC-50R 10X, RCV-50P, RVC-3R 10X, RVC-3P, con un alone di inibizione compreso tra gli 11 mm ed i 16 mm.

Tali risultati suggeriscono una maggior presenza di principio tossico nel RR che nel RV.

4.2 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIMICROBICA CONTRO BATTERI PATOGENI

Gli infusi sottoposti a tagli molecolari non in serie sono stati testati per la valutazione dell'azione antimicrobica contro l'attività di 3 comuni patogeni alimentari: (i) *E. coli*, (ii) *S. enterica*, (iii) *C. albicans*.

Nella tabella 7 sono riportati i risultati dopo 24 h di incubazione.

I risultati a 24 h hanno evidenziato che *S. enterica* viene inibita dalle frazioni: TqC, 10XC, RRF-50R 10X, RRF-30R 10X, RRF-10R 10X, RRF-3R 10X, RRC-50R 10X, RRC-50P, RRC-30R 10X, RRC-30P, RRC-10R 10X, RRC-3R 10X, RRC-3P.

Da questi primi risultati emerge che *S. enterica* viene inibita dalle frazioni di retentato per quanto riguarda l'estrazione a freddo, al contrario, per l'estrazione a caldo, viene inibita dalle frazioni di permeato. Questo potrebbe indicare che l'estrazione a caldo ha un'attività maggiore nei confronti di questo patogeno, mentre quella a freddo ha una attività inferiore e quindi è necessaria la frazione di permeato, ossia la frazione più concentrata per contrastare la crescita di *S. enterica*. Allo stesso modo *E. coli* viene inibita dalle frazioni: TqF, TqC, 10XC, RRF-50R 10X, RRF-50P, RRF-30R 10X, RRF-10R 10X, RRF-10P, RRF-3R 10X, RRC-50R 10X, RRC-30R 10X, RRC-30P, RRC-10R 10X, RRC-10P, RRC-3R 10X.

In questo caso, come si può osservare in tabella, *E. coli* viene inibita dalla maggior parte delle frazioni, indice del fatto che gli infusi di Rooibos, sia a freddo che a caldo, hanno un'azione inibente elevata nei confronti di questa specie batterica. Al contrario, *C. albicans* non viene inibita da tali frazioni, ad eccezione della frazione RRF-50P.

Il test osservato dopo 72 h di incubazione (tabella 8) ha confermato i dati precedenti, ossia ha evidenziato che le frazioni inibenti la crescita del patogeno, vengono mantenute per *S. enterica* ed *E. coli*, mentre *C. albicans* viene inibita solo dalla frazione TqF-50R 10x.

I risultati, quindi, evidenziano che il RR ha maggiore attività contro le specie batteriche (*S. enterica*, *E. coli*) rispetto al lievito *C. albicans*.

Riguardo la prova del RV, i risultati sono riportati in tabella 9.

Come si osserva in tabella, per il RV, non è stata osservata alcun tipo di azione antimicrobica nei confronti del lievito *C. albicans*, sia a 24 h che a 72 h, similmente al RR.

Per quanto riguarda il patogeno *S. enterica*, i dati osservati dopo 24 h di incubazione evidenziano che questa viene inibita dalla maggior parte delle frazioni, ad eccezione di: 10XF, RVF-3R 10X, RVF-3P e RVC-10R 10X.

Situazione simile si osserva per *E. coli*, per il quale si ha crescita solo con le frazioni: TqC, RVC-50R 10X, RVC-30R 10X, RVC-10R 10X, RVC-3R 10X.

Dopo 72 h di incubazione (tabella 10) si nota una situazione differente, in quanto si ha una maggior crescita del patogeno *S. enterica* e una perdita dell'azione inibente da parte del RV, come si può osservare in tabella 10.

I risultati, in questo caso, mostrano che questo patogeno viene inibito, dopo 72 h, dalle frazioni: RVF-50R 10X, RVF-50P, RVF-30R 10X, RVF-30P, RVF-10R 10X, RVF-10P, RVF-3R 10X, RVF-10P, RVC-50P, RVC-30P, RVC-10P, RVC-3P.

Situazione diversa, invece, si osserva per *E. coli*, in cui i risultati dopo 72 h confermano i dati osservati dopo 24 h, ad eccezione della frazione RVF-50R 10X, in cui si nota che il patogeno in questione è cresciuto e che quindi questa frazione di RV non è riuscita ad inibirlo.

	TqF	10XF	RRF-50R 10X	RRF-50 P	RRF-30R 10X	RRF-30P	RRF-10R 10X	RRF-10P	RRF-3R 10X	RRF-3P
<i>S. enterica</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	TqC	10XC	RRC-50R 10X	RRC-50 P	RRC-30R 10X	RRC-30P	RRC-10R 10X	RRC-10P	RRC-3R 10X	RRC-3P
<i>S. enterica</i>	-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-	+

Tabella 7: risultati osservati dopo 24 h di incubazione a 37 °C tra patogeni e campioni di RR.

	TqF	10XF	RRF-50R 10X	RRF-50 P	RRF-30R 10X	RRF-30P	RRF-10R 10X	RRF-10P	RRF-3R 10X	RRF-3P
<i>S. enterica</i>	+	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+/-	+
	TqC	10XC	RRC-50R 10X	RRC-50 P	RRC-30R 10X	RRC-30P	RRC-10R 10X	RRC-10P	RRC-3R 10X	RRC-3P
<i>S. enterica</i>	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-	+

Tabella 8: Risultati osservati dopo 72 h di incubazione a 37 °C tra patogeni e campioni di RR.

(+: crescita del patogeno; -: nessuna crescita del patogeno, quindi attività da parte del Rooibos; +/-: lieve crescita del patogeno)

	TqF	10XF	RVF-50R 10X	RVF-50 P	RVF-30R 10X	RVF-30P	RVF-10R 10X	RVF-10P	RVF-3R 10X	RVF-3P
<i>S. enterica</i>	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
	TqC	10XC	RVC-50R 10X	RVC-50 P	RVC-30R 10X	RVC-30P	RVC-10R 10X	RVC-10P	RVC-3R 10X	RVC-3P
<i>S. enterica</i>	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+	-	+/-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+/-	+	-	+	-	+	-	+	-

Tabella 9: risultati osservati dopo 24 h di incubazione a 37 °C tra patogeni e campioni di RV.

	TqF	10XF	RVF-50R 10X	RVF-50 P	RVF-30R 10X	RVF-30P	RVF-10R 10X	RVF-10P	RVF-3R 10X	RVF-3P
<i>S. enterica</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-
	TqC	10XC	RVC-50R 10X	RVC-50 P	RVC-30R 10X	RVC-30P	RVC-10R 10X	RVC-10P	RVC-3R 10X	RVC-3P
<i>S. enterica</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+/-	+	-	+	-	+	-	+	-

Tabella 10: Risultati osservati dopo 72 h di incubazione a 37 °C tra patogeni e campioni di RV.

(+: crescita del patogeno; -: nessuna crescita del patogeno, quindi attività da parte del Rooibos; +/-: lieve crescita del patogeno)

4.3 WELL TEST: FRAZIONI RR E RV SOTTOPOSTE A TAGLI MOLECOLARI IN SERIE

In base ai risultati ottenuti dal primo Well-test, le frazioni di RR e RV sono state testate solo con il terreno Agar Malto pH 4,4 e osservate a 24, 36, 72 e 96 h, incubate a 22 gradi, utilizzando come ceppo sensibile il 6500.

La prima osservazione è stata fatta dopo 24 h.

Questa ha mostrato una crescita del ceppo sensibile eccessivamente scarsa per poter definire eventuali aloni di inibizione.

Stessa situazione si è evidenziata 36 h di incubazione.

I risultati a 72 h (riportati in tab 11) hanno mostrato che, le frazioni di RR hanno una maggiore attività inibente, nello specifico le frazioni: RRC-50R 10X, RRC-10R 10X, RRC-10P, TqC, RRF-50P, RRF-30R 10X, RRF-30P, RRF-10R 10X, RRF-10P. Da questi risultati si osserva che, per il RR Freddo, le frazioni che hanno azione inibente, sono quelle che vanno dai 10 ai 50 KDa. Questo potrebbe essere indice del fatto che il principio tossico ha peso molecolare intorno a questo range.

Per il RR Caldo, invece, la frazione che risulta essere più significativa è la RRC-10P S, con un alone di inibizione di 16 mm, in quanto, come si osserverà dopo 96 h, è quella che mantiene l'attività inibente.

FRAZIONI	RR CALDO	RR FREDDO	RV CALDO	RV FREDDO
50R 10X S	17 mm	0 mm	0 mm	0 mm
50P S	0 mm	14 mm	0 mm	13 mm
30R 10X S	0 mm	15 mm	0 mm	12 mm
30P S	0 mm	15 mm	0 mm	15 mm
10R 10X S	17 mm	14 mm	0 mm	0 mm
10P S	16 mm	18 mm	0 mm	0 mm
3R 10X S	0 mm	0 mm	0 mm	17 mm
3P S	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Tq S	17 mm	0 mm	0 mm	18 mm

Tabella 11: Risultati Well-test con terreno Agar Malto pH 4,4 osservati dopo 72 h.

Al contrario, nessuna attività inibente è stata osservata per il RVC. Invece, riguardo il RVF, l'attività inibente che si è osservata per le varie frazioni a 72 h si è persa dopo 96 h (tab. 12).

FRAZIONI	RR CALDO	RR FREDDO	RV CALDO	RV FREDDO
50R 10X S	18 mm	0 mm	0 mm	0 mm
50P S	0 mm	0 mm	0 mm	14 mm
30R 10X S	0 mm	14 mm	0 mm	16 mm
30P S	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
10R 10X S	10 mm	0 mm	0 mm	0 mm
10P S	15 mm	0 mm	0 mm	13 mm
3R 10X S	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
3P S	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Tq S	18 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabella 12: Risultati Well-test con terreno Agar Malto pH 4,4 osservati dopo 96 h.

In conclusione, le frazioni aventi attività inibente stabile nel tempo sono riportate in tabella 12 (a 96 h). In particolare, le due frazioni che hanno mostrato una maggiore attività inibente sono state: RR TqC e RVF-30R 10X. Per via di questi risultati, queste, sono le frazioni che verranno utilizzate nella prova successiva di contenimento dello sviluppo dei lieviti *Brettanomyces* in vino.

4.4 WELL TEST CON CEPPI DI *B. BRUXELLENSIS* COME SENSIBILI

Le due frazioni, RR TqC e RVF-30R 10X, scelte in quanto stabili nel tempo e con maggiore attività antimicrobica rispetto alle altre frazioni testate, sono state testate anche per 14 ceppi di *B. bruxellensis* appartenenti alla collezione del dipartimento Disva (Università Politecnica Delle Marche).

Tale test, condotto su Agar malto tamponato a pH 4,4 e incubato a 22 °C per 4/5 giorni (tempo necessario per la crescita di questa specie di lievito), non ha mostrato aloni di inibizione della crescita di alcun sensibile, indice che queste frazioni di Rooibos, testate su piastra, non hanno alcun potere inibente su questi lieviti.

Questo risultato potrebbe essere dovuto alla fase metabolica ottimale dei lieviti utilizzati, in quanto mantenuti fino a quel momento in un terreno ricco di nutrienti e, di conseguenza, il loro status metabolico ottimale probabilmente ha by-passato il principio tossico delle frazioni tossiche saggiate.

4.5 RISULTATI DELL' AZIONE DI CONTROLLO DEI LIEVITI *BRETTANOMYCES* ADATTATI SU VINO SINTETICO

In base ai risultati osservati nelle prove precedenti, sono state scelte due frazioni, RR TqC e RVF-30R 10X, per valutare il loro potere d'azione nel contenimento dello sviluppo dei lieviti *Brettanomyces* adattati su vino sintetico.

In relazione alla disponibilità delle due frazioni di Rooibos, la frazione di RR è stata testata a 3 diversi rapporti: (i) 1:10, (ii) 1:5, (iii) 1:2, mentre quella di RV, all'unico rapporto: 1:10.

Il monitoraggio dell'azione anti *Brettanomyces*, eseguito attraverso conte vitali nel tempo (7, 14, 21, 30 giorni) sono riportate nei grafici sottostanti (figura 18).

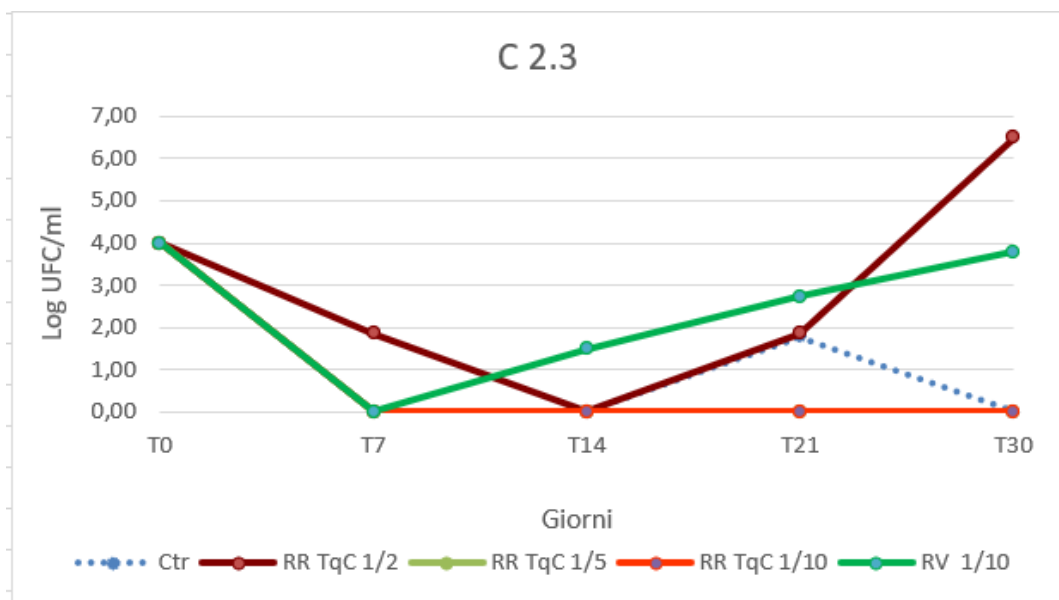
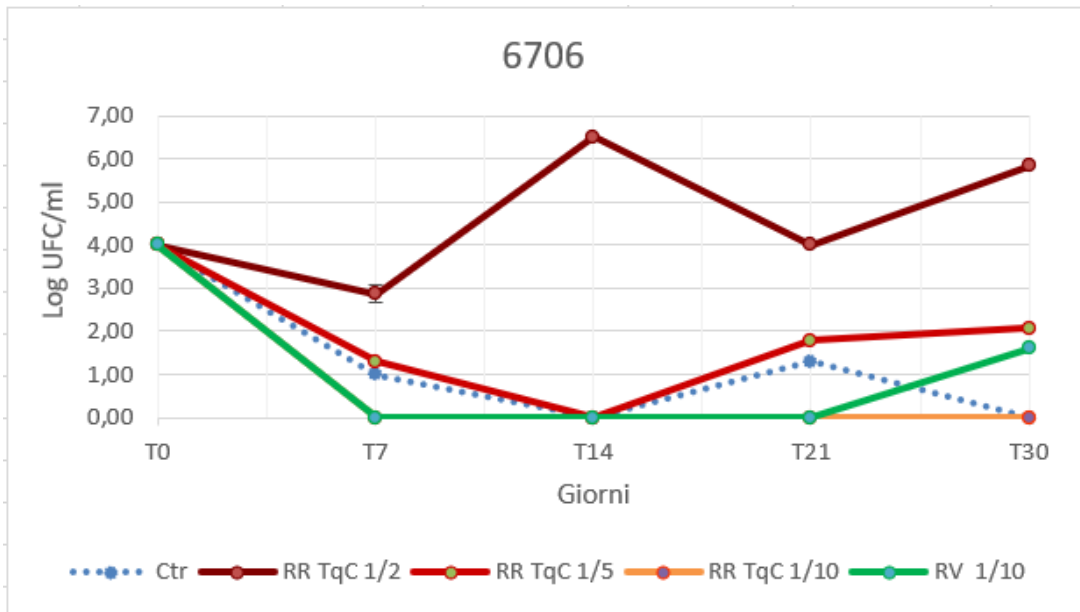
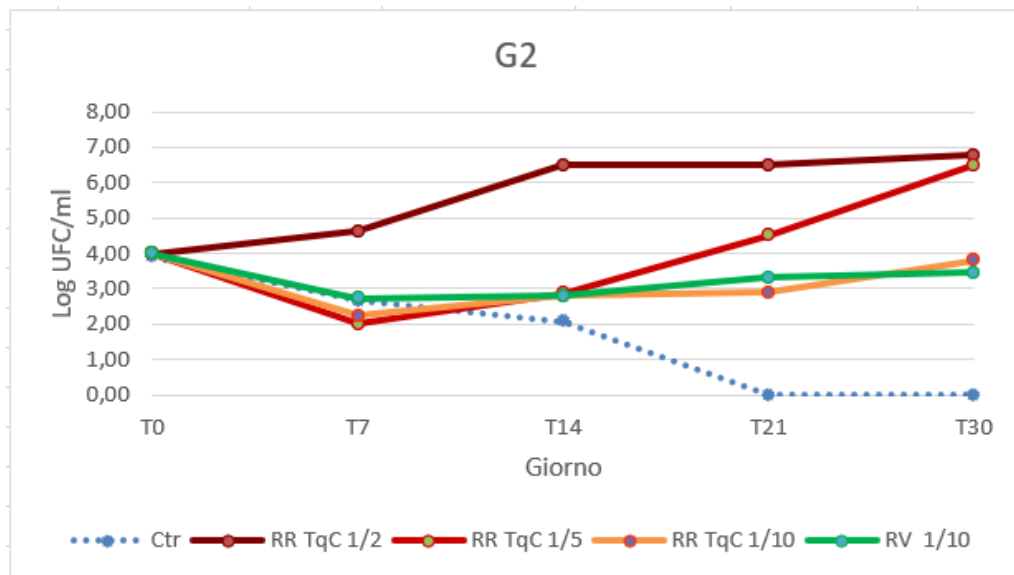


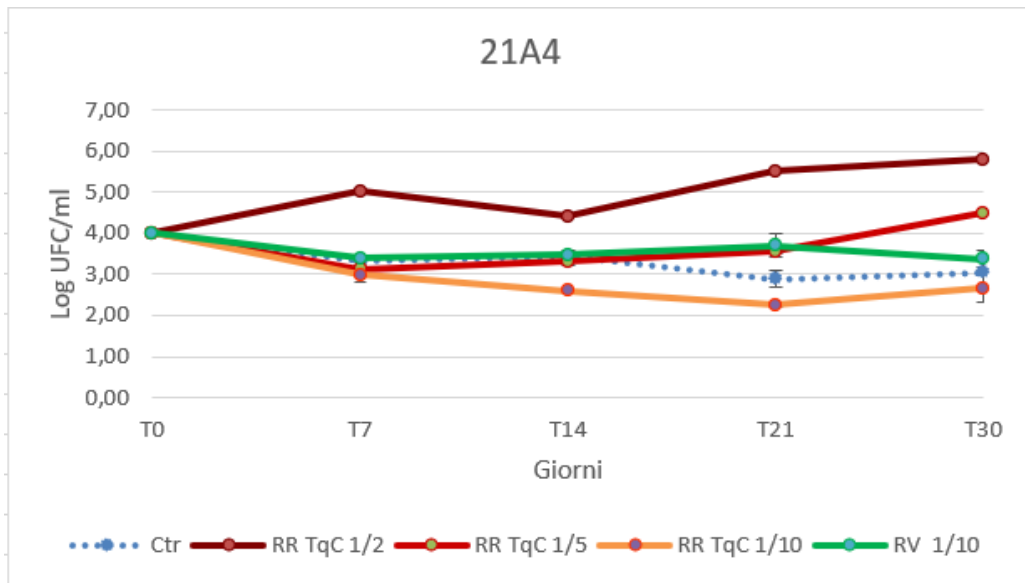
Figura 18: Cinetica dei lieviti *Brettanomyces* in presenza delle frazioni di RR e RV ad attività antimicrobica. (A) relativa al ceppo C2.3.



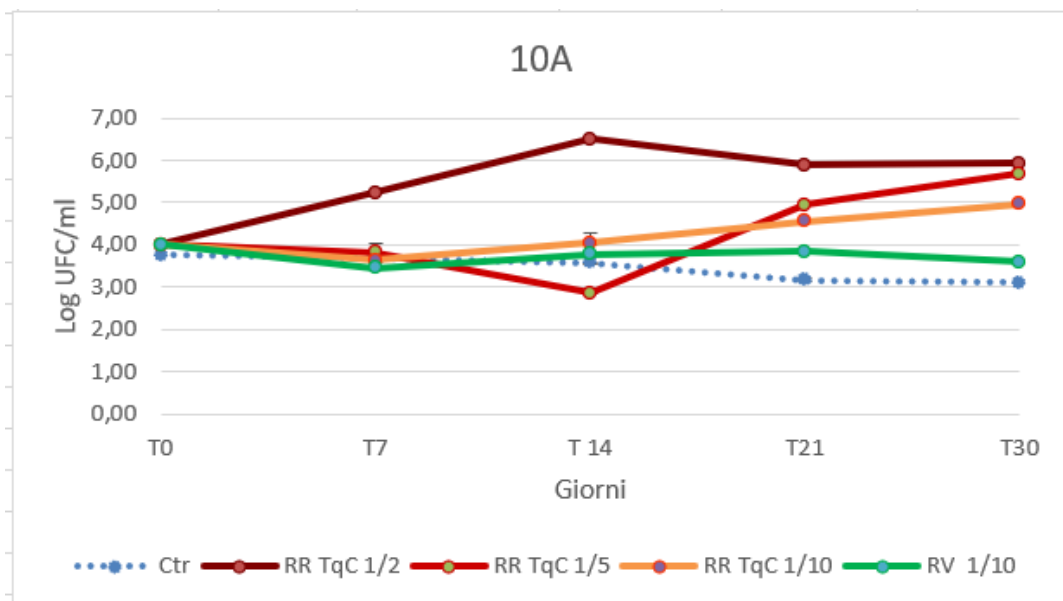
(B) relativa al ceppo 6706. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



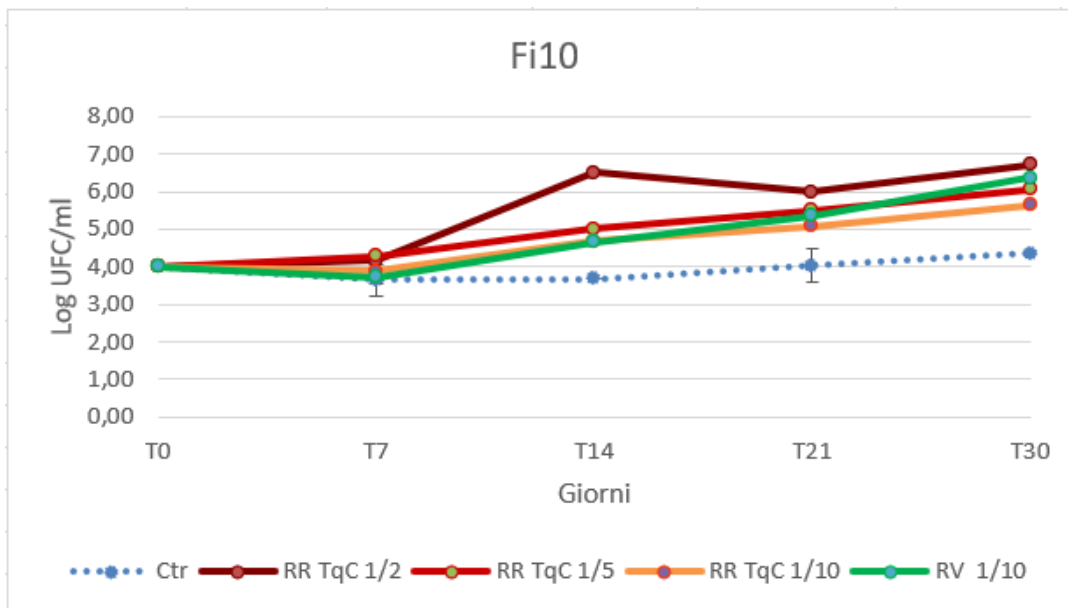
(C): relativa al ceppo G2. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



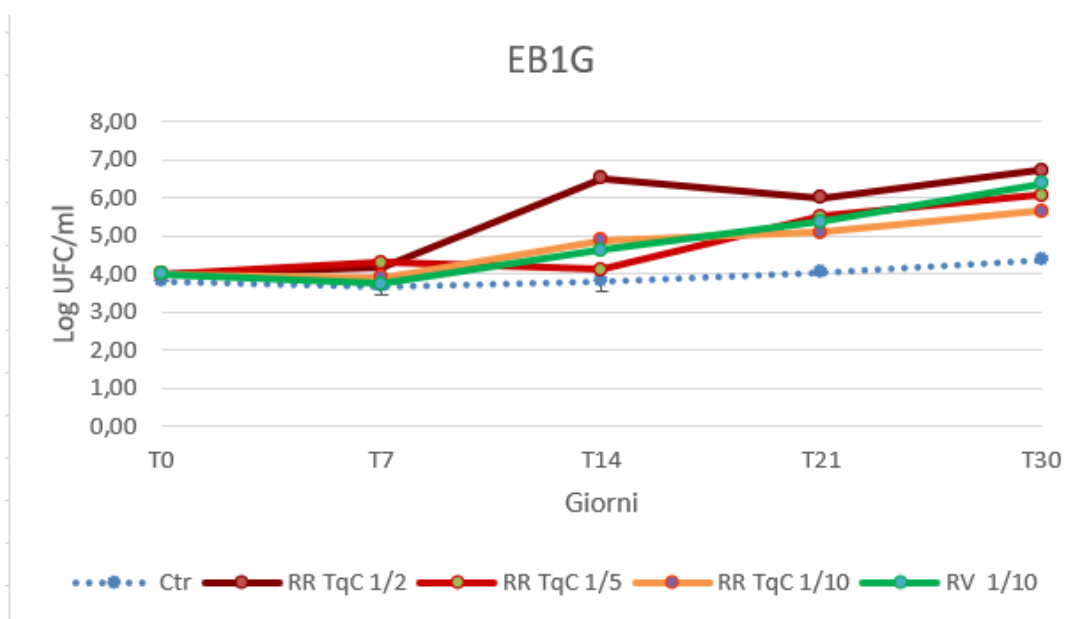
(D): relativa al ceppo 21A4. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



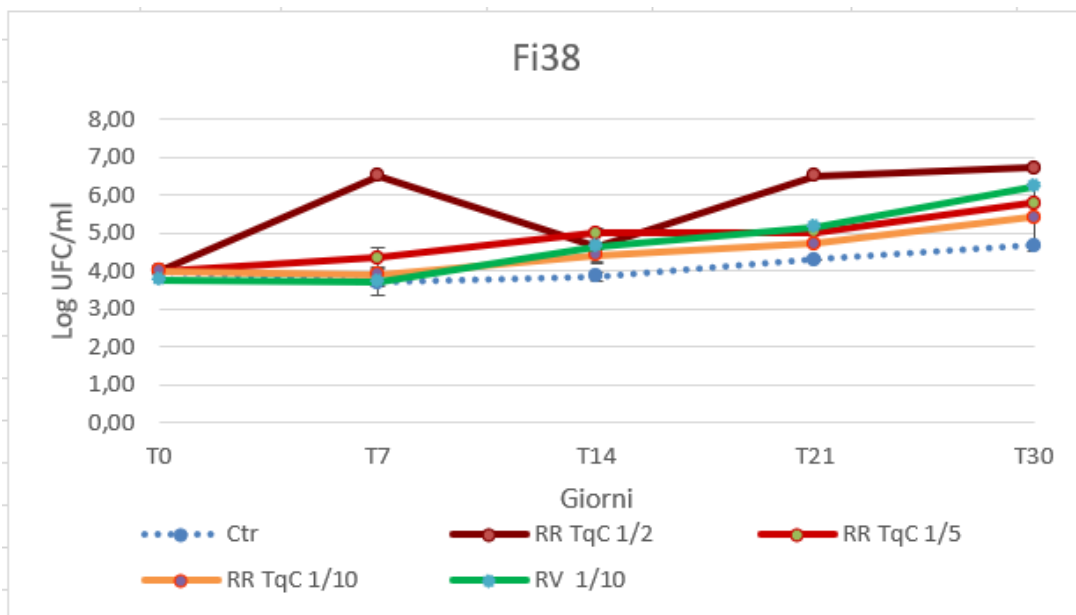
(E): relativa al ceppo 10A. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



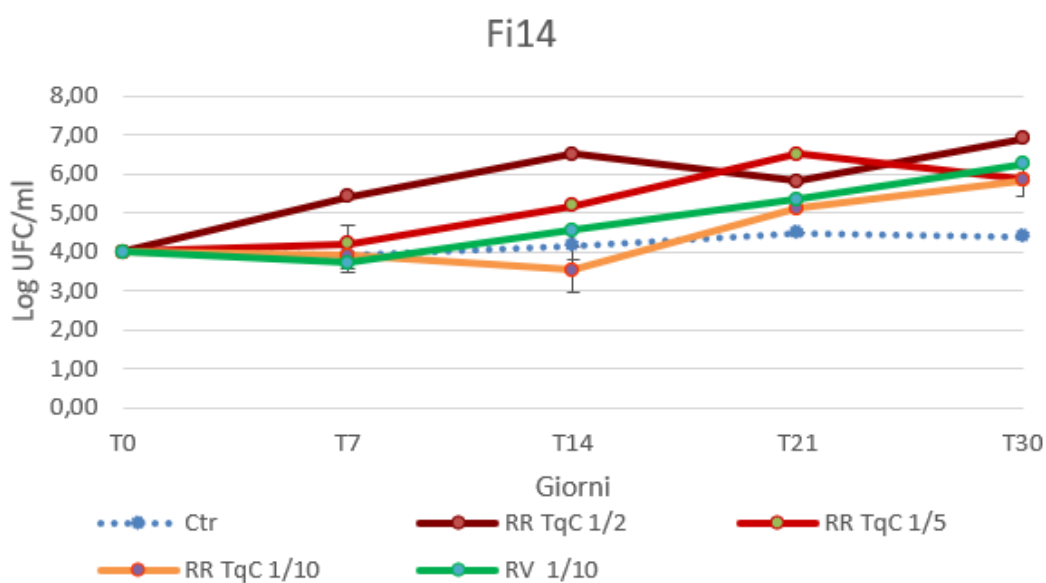
(F): relativa al ceppo Fi10. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



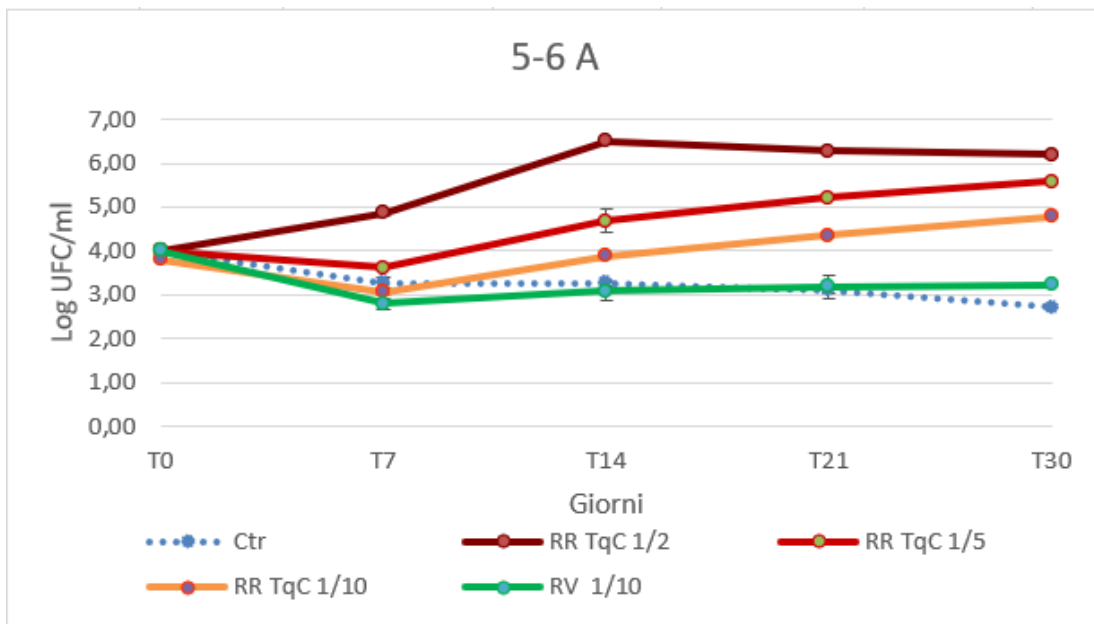
(G): relativa al ceppo EB1G. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



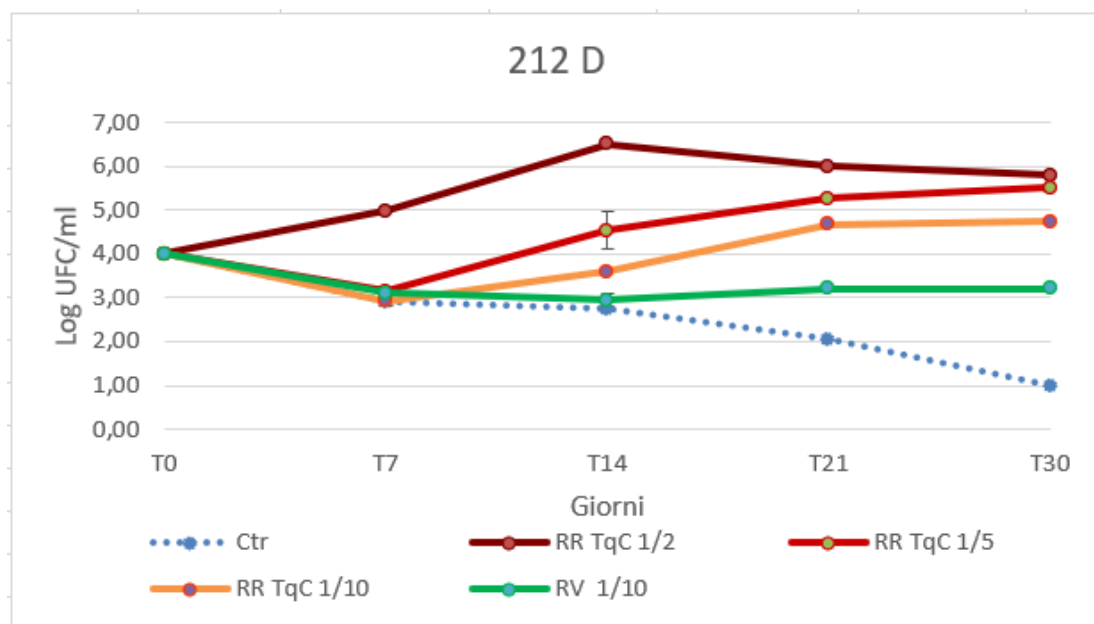
(H): relativa al ceppo Fi38. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



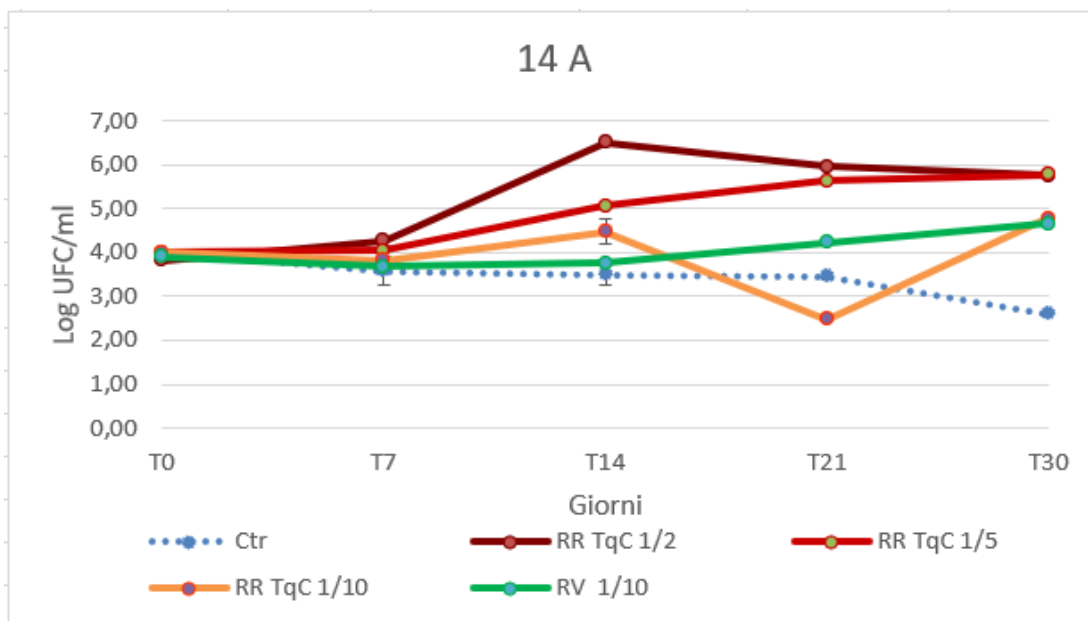
(I): relativa al ceppo Fi14. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



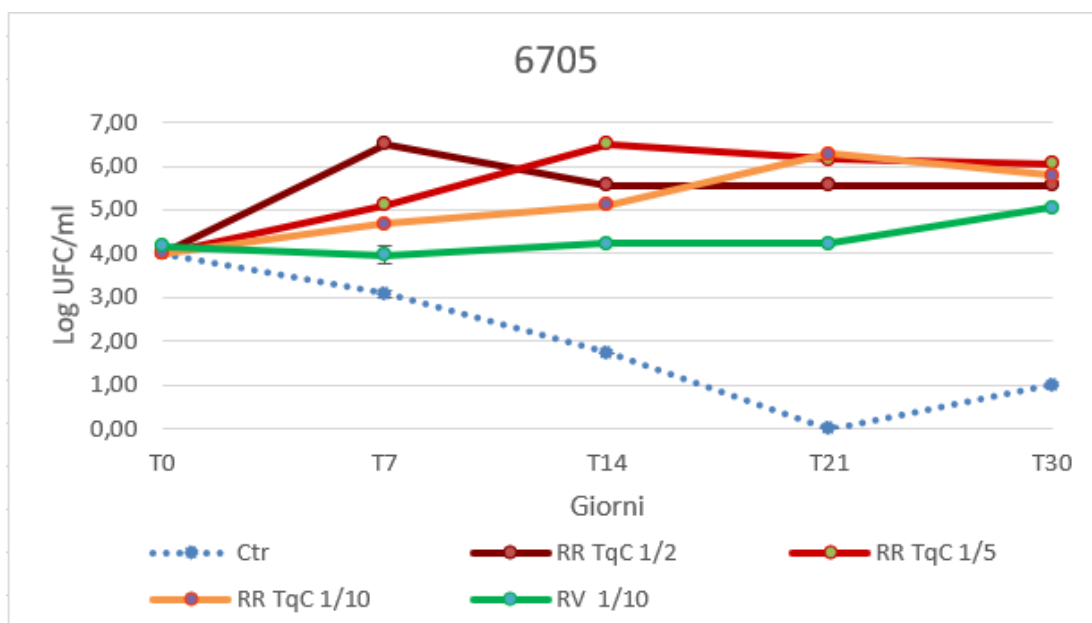
(L): relativa al ceppo 5-6A. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



(M): relativa al ceppo 212D. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



(N): relativa al ceppo 14A. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.



(O): relativa al ceppo 6705. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.

Riguardo ai ceppi di *B. bruxellensis*: G2, Fi10, EB1G, Fi38, 212D, 6705, 5-6A, la presenza del principio tossico non ha mostrato contenimento nel loro sviluppo rispetto alla tesi di controllo (vino con inoculo del ceppo senza l'aggiunta di alcuna frazione di Rooibos), già a partire dal controllo effettuato dopo sette giorni di incubazione. Tale situazione si è mantenuta fino al 30° giorno, ossia per tutto il periodo di monitoraggio, durante il quale la tesi di controllo è risultata a concentrazione microbica inferiore rispetto a tutte le altre tesi.

Questo potrebbe essere dovuto alla presenza, negli infusi, non solo di molecole inibenti, ma anche di nutrienti.

Situazione diversa è stata osservata per i ceppi: 10A, Fi14, C2.3, 6706, 21A4, 14A.

Per questi, alcune frazioni sono state in grado di ridurre lo sviluppo del lievito *Brettanomyces* rispetto alla tesi di controllo, seppur in maniera ceppo specifica, ad eccezione dei ceppi: 10A (figura 18 E) e Fi14 (figura 18 I).

Per questi due ceppi, lo sviluppo è stato contenuto fino al 14° giorno, a partire dal quale la tesi di controllo è risultata a concentrazione microbica inferiore rispetto alle altre.

Per il ceppo C2.3, invece, l'unica frazione ad azione inibente è risultata essere la RR TqC 1:10 (figura 18 A), la quale ha ridotto completamente i lieviti a partire dal 7° giorno fino alla fine del monitoraggio.

Riguardo al ceppo 6706, entrambe le frazioni hanno mostrato azione inibente nei confronti di tale lievito, nello specifico, le frazioni: RR TqC 1:10 e RV 1:10. In questo caso, la riduzione della concentrazione del lievito spoilage è stata ridotta completamente a partire dal 7° giorno fino al 14°; tale trend è stato mantenuto per la frazione RR TqC 1:10, al contrario, l'azione inibente della frazione RV 1:10, si è persa nel lungo termine (dopo 30 giorni) (figura 18 B).

Per quanto riguarda il ceppo *B. bruxellensis* 21A4, anche in questo caso, la frazione inibente è risultata essere la RR TqC 1:10. Tale azione è stata osservata a partire dal 14° giorno e si è mantenuta fino al trentesimo, con una riduzione di circa 1 unità logaritmica rispetto alla tesi di controllo (figura 18 D).

In maniera simile a quest'ultimo, il ceppo 14A, conferma come unica frazione inibente la RR TqC 1:10, con una riduzione della concentrazione microbiologica di circa 1 grado logaritmico rispetto alla tesi di controllo dopo 21 giorni, azione che però viene persa dopo 30 giorni (figura 18 N).

In conclusione si può affermare che, in linea generale, i risultati hanno mostrato che la miglior frazione da poter utilizzare per il contenimento dello sviluppo

dei lieviti *Brettanomyces* è la RR TqC in rapporto 1:10, seppur in maniera ceppo dipendente.

Questa concentrazione sembra essere la migliore rispetto alle altre, in quanto probabilmente fornisce al lievito spoilage il bilanciamento più adeguato tra la frazione tossica ed eventuali nutrienti presenti nell'infuso.

4.6 VALUTAZIONE DELLA QUANTITA' TOTALE DI POLIFENOLI ALL'INTERNO DELL'INFUSO ROOIBOS

È stata valutata la quantità totale di polifenoli all'interno delle frazioni di RR e RV sottoposte a tagli molecolari in serie attraverso il reattivo di Folin-Ciocalteu.

Le tabelle e grafici sottostanti mostrano le concentrazioni di ciascuna frazione ottenute attraverso saggio TPC.

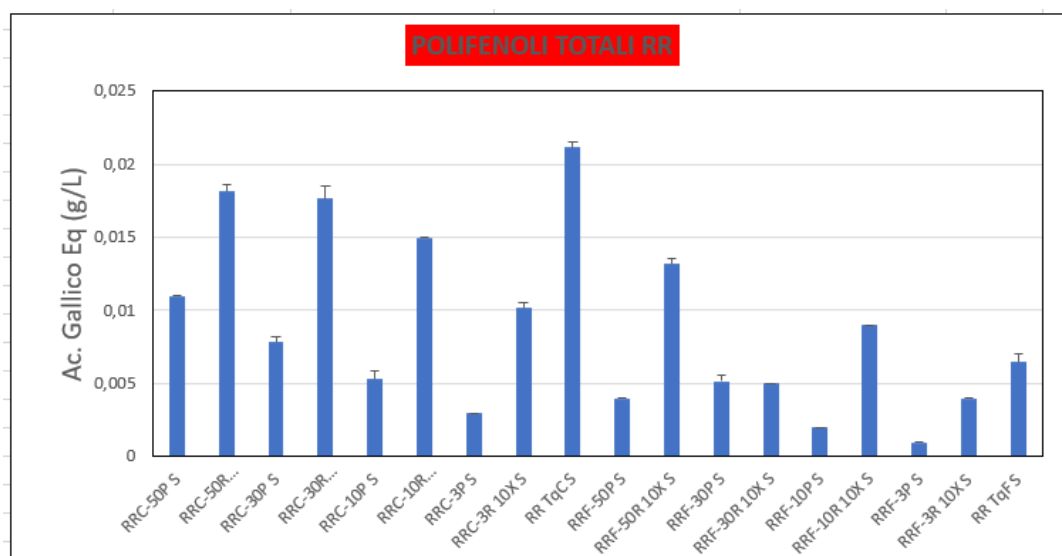


Figura 19: Contenuto di polifenoli totali all'interno di frazioni di RR sottoposte a tagli molecolari in serie. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.

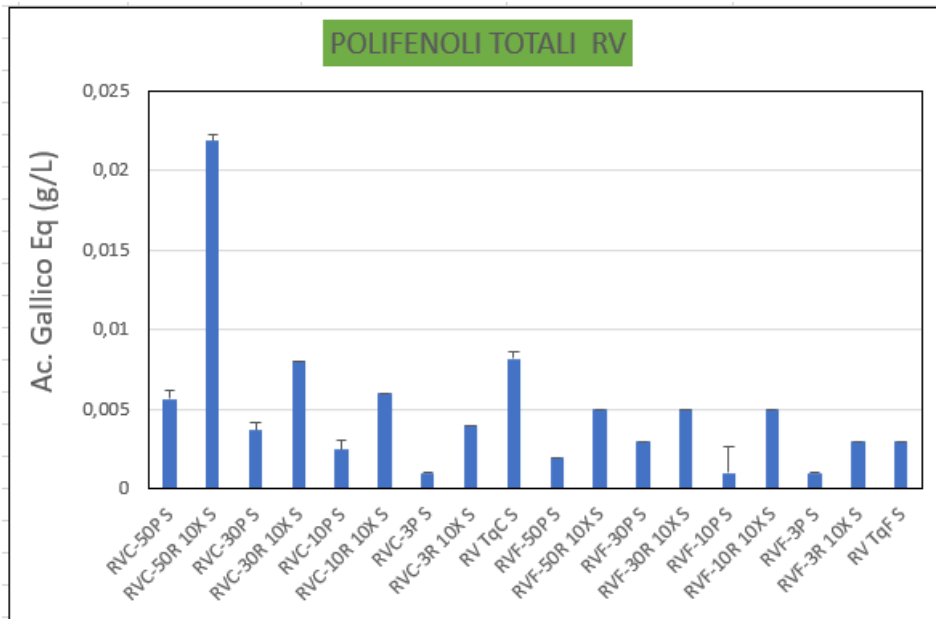


Figura 20: Contenuto di polifenoli all'interno di frazioni di RV sottoposte a tagli molecolari in serie. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.

Questi risultati mostrano che entrambi i tipi di infusi hanno una buona concentrazione di polifenoli e che quindi, posseggono ottima capacità antiossidante (Losada-Barreiro 2017).

In particolare, le frazioni che hanno mostrato una maggiore concentrazione rispetto alle altre, sono state:

- RR TqC, contenente una quantità di polifenoli pari a 0,021 g/L
- RVC-50R 10X S, contenente una quantità di polifenoli pari a 0,022 g/L

In seguito, è stata valutata la quantità di polifenoli presente all'interno delle frazioni di RR e RV eseguite con tagli molecolari in serie, che hanno mostrato una maggiore inibizione contro i lieviti *Brettanomyces*. In particolare, sono state saggiate le frazioni RR TqC e RVF-30R 10X S.

Per effettuare la prova, le due frazioni di Rooibos, sono state aggiunte ai ceppi di *B. bruxellensis* che hanno mostrato una riduzione nelle conte vitali osservate nelle quattro settimane.

I risultati del contenuto totale di polifenoli sono riportati nel grafico sottostante.

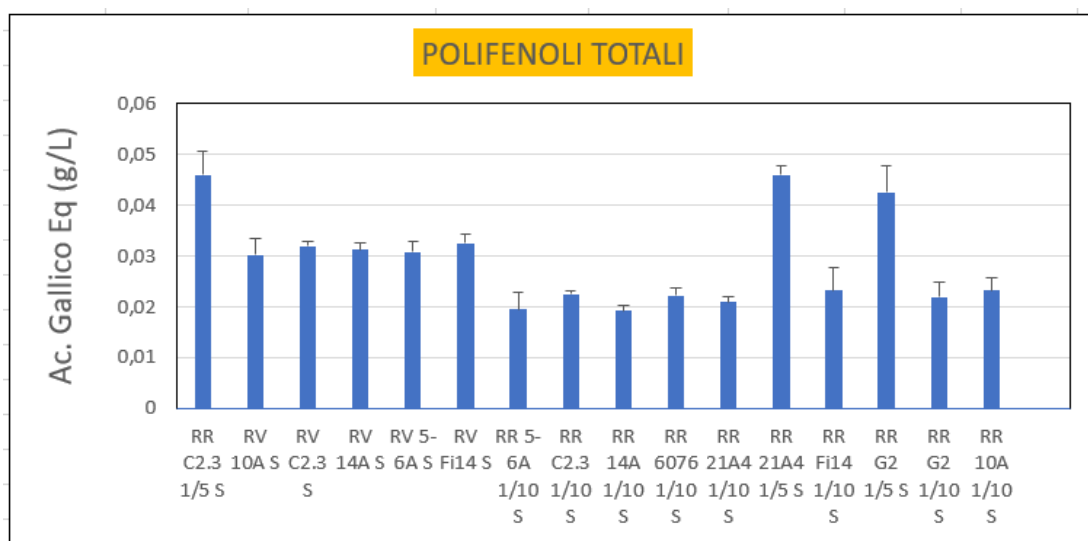


Figura 21: Determinazione quantitativa di polifenoli nel vino sintetico contaminato da *B. bruxellensis* con aggiunta di frazioni di Rooibos. I dati sono rappresentati come valori medi \pm deviazione standard.

In conclusione, dall'osservazione finale dei risultati, le frazioni di RR che hanno mostrato una maggiore quantità di polifenoli sono state quelle contenenti i ceppi 21A4 e C2.3, in rapporto 1:5, con una concentrazione pari a 0,046 g/L. Al contrario, il RV ha mostrato, in generale, una concentrazione minore di polifenoli.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

È noto che i lieviti *Brettanomyces/Dekkera* sono microrganismi che alterano le proprietà organolettiche del vino, dando aromi e sapori sgradevoli per il consumatore.

Attualmente le procedure più utilizzate ed efficaci prevedono l'utilizzo di SO₂, la sanificazione dei vasi vinari e la filtrazione del vino contaminato, procedure che spesso possono incidere negativamente sulla qualità del prodotto finale. Per questo motivo, le aziende vinicole sono alla continua ricerca di nuovi approcci biologici per debellare questi lieviti spoilage.

In questo studio sono state analizzate le proprietà degli infusi di Rooibos, Verde e Rosso, per valutare la possibilità di utilizzarlo come agente inibente dei lieviti spoilage del vino.

L'attività antimicrobica degli infusi di RR e RV, sottoposti a tagli molecolari è stata confermata in un primo momento sul ceppo sensibile di riferimento: *S. cerevisiae* (ceppo 6500) mediante Well-test, osservando aloni d'inibizione. Al contrario, questi infusi, non hanno mostrato alcuna attività inibente nei confronti di *B. bruxellensis*.

In seguito, sulla base dei risultati osservati con il Well-test, sono state scelte due frazioni, RR TqC e RVF-30R 10X S, per valutare il loro potere d'azione nel contenimento dello sviluppo dei lieviti *Brettanomyces* adattati su vino sintetico.

Inoltre, si è valutata la quantità totale dei polifenoli delle frazioni di RR e RV e, successivamente, il contenuto totale di polifenoli presenti nel vino sintetico contenente le due frazioni di Rooibos scelte e vari ceppi di *B. bruxellensis*, in particolare è stata osservata la relazione esistente tra i ceppi che hanno avuto una decrescita osservata attraverso le conte vitali e la quantità di polifenoli presenti nelle frazioni che hanno inibito la crescita dei *B. bruxellensis*.

Dai risultati emersi si evince che l'utilizzo degli infusi di questa pianta hanno di per sé una buona capacità antimicrobica e un'ottima quantità di polifenoli; tuttavia, i dati mostrano che il Rooibos, da solo, non è in grado di contrastare l'azione di questi lieviti spoilage.

Nonostante ciò, i risultati potranno essere utilizzati come punto di partenza per ulteriori indagini indirizzate alla riduzione dell'utilizzo dell'anidride solforosa, sostituendola, anche in maniera parziale, con sostanze di origine naturale (quali il Rooibos e l'Honeybush) per attuare un metodo più naturale nella conservazione dei vini.

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA

- **Abderrahim, M., Arribas, S.M., Condezo-Hoyos, L.** A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods, *Talanta*. 152, 82-9 (2016).
- **Agarbati A, Canonico L, Marini E, Zannini E, Ciani M, Comitini F.** Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods*. 2020; 9(3):287. <https://doi.org/10.3390/foods9030287>
- **Baiano A, Terracone C.** I composti fenolici negli alimenti – classificazione, distribuzione, metodi di estrazione ed analisi. Aracne editrice. Disponibile al link: <http://www.aracneeditrice.it/pdf/9788854832473.pdf>. Ultimo accesso: Luglio 2019
- **Beltrán-Debón R, Rull A, Rodríguez-Sanabria F, Iswaldi I, Herranz-López M, Aragonès G, Camps J, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, Micol V, Segura-Carretero A, Joven J.** Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in

- hyperlipidemic mice. *Phytomedicine*. 2011 Mar 15;18(5):414-24. doi: 10.1016/j.phymed.2010.11.008. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21211952.
- **Carrieri, M., Scapellato, M.L., Salamon, F., Gori, G., Trevisan, A., Battista Bartolucci, G.** Assessment of exposure to oak wood dust using gallic acid as a chemical marker, *Int Arch Occup Environ Health*. 89, 115-21 (2016).
 - **Chatonnet P. (1993).** Volatile phenols: organoleptic influences and prevention methods. *Vineyards and Wines*.
 - **Cillie Francois (2017)** Alternative anti-oxidants and preservatives in wine the viability of rooibos and honeybush-wood
 - **De Wet (2015)** Rooibos honeybush wine making
 - **Delfini C., Cersosimo M., Del Prete V., Strano M., Gaetano G., Pagliara A., Ambrò S.,** Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: Efficacy of lysozyme in unclarified grape must, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (pag. 1861-1866), 2004.
 - **Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V.** Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*. 2017 Feb 14;22(2):292. doi: 10.3390/molecules22020292. PMID: 28216567; PMCID: PMC6155685.

- **Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007)** Wine Microbiology Practical Applications and Procedures. Second edition. Ed. Boston, MA: Springer Science+Business Media, LL.
- **Hernández A, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Serradilla MJ, Villalobos MC, Martín A, Córdoba MG.** Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *Int J Food Microbiol.* 2018 Dec 2;286:98-110. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30056262.
- **Joubert, E., de Beer, D.** Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical, *South African Journal of Botany.* 77, 869-886 (2011).
- **Joubert E, Gelderblom WC, Louw A, de Beer D.** South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*--a review. *J Ethnopharmacol.* 2008 Oct 28;119(3):376-412. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.014. Epub 2008 Jun 22. PMID: 18621121.
- **Kurtzman C.P., Fell J.W., 2000.** The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, fourth edition. pp.114, 118, 174-177, 450-453.
- **Li L, Sun B.** Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(4):563-579. doi: 10.1080/10408398.2017.1381071. Epub 2017 Oct 20. PMID: 28933917.

- **Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C.** Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem.* 2017 Jun 16;133:379-402. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.061. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28415050.
- **Nordqvist, C. (2016)** Vino: benefici per la salute e rischi per la salute, *Notizie mediche oggi*, Aprile.
- **Owen, J. (2015)** Estratti di frutta e sansa: attività biologica, potenziali applicazioni ed effetti benefici sulla salute, Nova Science Publishers, New York.
- **Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, Sethi G, Perumal E.** Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 2018 Jul;17:297-314. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.002. Epub 2018 May 7. PMID: 29775961; PMCID: PMC6007815.
- **Singleton, V.L., Rossi, J.A.** Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic- phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture.* 16, 144- 158 (1965).
- **Tosi E., Azzolini M., Cristofolletti M., Zapparoli G.,** Il lisozima ritarda nei rossi e blocca nei bianchi la malolattica, *L'informatore agrario* n° 22 (pag. 55-58), 2008.

- **Valero E, Tronchoni J, Morales P, Gonzalez R.** Autophagy is required for sulfur dioxide tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol.* 2020 Mar;13(2):599-604. doi: 10.1111/1751-7915.13495. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31638329; PMCID: PMC7017813.
- **Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C.** The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients.* 2018 Nov 2;10(11):1618. doi: 10.3390/nu10111618. PMID: 30400131; PMCID: PMC6266803.
- **Yang Y, Zhang T.** Antimicrobial Activities of Tea Polyphenol on Phytopathogens: A Review. *Molecules.* 2019 Feb 25;24(4):816. doi: 10.3390/molecules24040816. PMID: 30823535; PMCID: PMC6413138.
- **Zambonelli C. (1998)** *Microbiologia e biotecnologia dei vini.* Edagricole-Edizioni Agricole.

CAPITOLO 7

SITOGRAFIA

- <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto4283-01-1.pdf>
- efsa.europa.eu/it/press/news/160414a
- https://www.cucina-naturale.it/alimentazione_salute/rooibos-una-tazza-di-salute
- <https://www.ideegreen.it/rooibos-proprieta-benefici-84300.html>
- https://www.cvev.it/Archivio/Biblioteca/Tesi/TB14_2055_G_Fazio.pdf
- <https://www.thetablemountainfund.org.za/a-glass-of-rooibos-red-please-sas-first-indigenously-wooded-wine/>