



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

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

**UTILIZZO DI LIEVITI BIOATTIVI CONTRO  
MICROORGANISMI ALTERATIVI: DAL VIGNETO ALLA  
CANTINA PER LA PRODUZIONE DI VINO VERDICCHIO  
BIOLOGICO**

*USE OF BIOACTIVE YEASTS AGAINST SPOILAGE  
MICROORGANISMS: FROM THE VINEYARD TO THE WINERY  
FOR THE PRODUCTION OF ORGANIC VERDICCHIO WINE*

Tesi di Laurea Magistrale  
di:  
Giulia Lorenzoni

Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa  
Francesca Comitini

Correlatore:  
Edoardo Galli

**Sessione Straordinaria**  
**Anno Accademico 2020/2021**

# INDICE

<b>CAPITOLO PRIMO: INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Settore vitivinicolo delle Marche e importanza del vino Verdicchio.....	1
1.2 Lieviti autoctoni sulla bacca d'uva.....	4
1.2.1. Ruolo ecologico e in vinificazione.....	6
1.3 Lieviti bioattivi .....	8
1.3.1. <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	11
1.3.2. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	14
1.3.3. <i>Tetrapisispora phaffii</i> .....	16
1.4 <i>Botrytis cinerea</i> : caratteristiche e modalità di controllo.....	18
1.4.1. Controllo chimico e biologico.....	22
1.5 Disciplinare di produzione del vino Verdicchio DOC.....	26
1.6 Produzione di vino Verdicchio biologico.....	28
<b>CAPITOLO SECONDO: SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPITOLO TERZO: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>33</b>
3.1 Microrganismi impiegati.....	33
3.2 Terreni di coltura.....	34
3.3 Trattamento del vigneto.....	35
3.3.1. Monitoraggio della popolazione epifitica.....	36
3.3.2. Monitoraggio della crescita di <i>B. cinerea</i> sugli acini in post-raccolta.....	37
3.3.3. Valutazione delle piante rispetto <i>B. cinerea</i> e marciume acido.....	37

3.4	Allestimento prime micro-fermentazioni per la valutazione del controllo della flora indesiderata.....	37
3.5	Allestimento seconde micro-fermentazioni per la valutazione del possibile miglioramento del profilo aromatico del vino finale.....	40
3.6	Monitoraggio delle micro-fermentazioni.....	41
3.7	Analisi microbiologiche.....	41
3.8	Analisi chimiche.....	43
3.8.1.	Acidità volatile.....	43
3.8.2.	Analisi dei principali composti volatili .....	45
<b>CAPITOLO QUARTO: RISULTATI.....</b>		<b>47</b>
4.1	Valutazione dell'efficacia del trattamento.....	47
4.1.1	Sopravvivenza dei lieviti bioattivi applicati come fito-trattamenti a maturazione...	47
4.1.2	Efficacia dei trattamenti in post-raccolta (shelf-life a temperatura ambiente).....	50
4.1.3	Valutazione dell'efficacia dei trattamenti in campo.....	53
4.2	Valutazione dell'efficacia dei lieviti come biocontrollo sulla flora indesiderata in micro-fermentazione mista sequenziale.....	54
4.2.1	Valutazione dell'andamento fermentativo.....	54
4.2.2	Monitoraggio della popolazione microbica durante le micro-fermentazioni.....	56
4.2.3	Valutazione dell'acidità volatile.....	60
4.3	Valutazione dell'efficacia di <i>Torulaspora delbrueckii</i> nel miglioramento del profilo aromatico del vino finale, in micro-fermentazione mista sequenziale.....	61
4.3.1	Valutazione dell'andamento fermentativo.....	61
4.3.2	Monitoraggio della popolazione microbica durante le micro-fermentazioni.....	62

4.3.3 Valutazione dell'acidità volatile e analisi dei composti volatili.....	64
<b>CAPITOLO QUINTO: CONCLUSIONI.....</b>	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>
<b><i>RINGRAZIAMENTI</i></b>	

# Capitolo primo

## INTRUDUZIONE

### *1.1 Settore vitivinicolo delle Marche e importanza del vino Verdicchio*

Le Marche sono una regione dalla grande vocazione vitivinicola, già storicamente appurata con documenti ed opere antiche che attestano come questo settore sia da sempre un punto di forza dell'agricoltura e dell'economia marchigiana.

L'ambiente variabile delle Marche si suddivide in tre fasce longitudinali, con caratteristiche climatiche pressoché omogenee all'interno di ogni fascia. La parte più ad ovest, quella più interna, è rappresentata da un ambiente montuoso a ridosso della catena Appenninica centrale, seguito poi ad est dalla fascia pre-Appenninica. Questa particolare conformazione del territorio conferisce un clima tipicamente continentale, con grandi escursioni termiche. Il restante territorio rappresenta la fascia collinare, che si estende fino alla costa, a ridosso del Mar Adriatico. L'ambiente collinare è più del 68% del territorio marchigiano e grazie all'adeguatezza del terreno e del clima mediterraneo, con una buona esposizione al sole ed una ventilazione non eccessiva, ne fanno una zona prediletta per la viticoltura.

Tra i vitigni storici delle Marche, uno dei più importanti è il Verdicchio, coltivato da sempre in questi territori. I primi documenti che parlano ufficialmente di Verdicchio risalgono alla metà del 1500 e da allora è sempre stato protagonista indiscusso dell'enologia della regione marchigiana.

La zona di produzione del Verdicchio è la Vallesina, che sembra essere una sorta di paradosso geografico delle Marche. È la sola che corre parallela alla linea di costa e risente contemporaneamente sia dell'aria fresca delle montagne sia dei venti salmastri dell'Adriatico. Ne derivano due tipologie di Verdicchio: il “Verdicchio dei Castelli di Jesi” e il “Verdicchio di Matelica”. Il primo viene prodotto in una zona di 25 comuni, chiamati appunto “Castelli di Jesi”, tra le provincie di Ancona e Macerata; il secondo viene prodotto nella zona di Matelica, piccolo borgo pre-appenninico, in un territorio di 8 comuni, 6 in provincia di Macerata e 2 in quella di Ancona (Fig.1).



*Fig.1: Zona di produzione del Verdicchio dei Castelli di Jesi (a.) e del Verdicchio di Matelica (b.)  
(www.imtdoc.it)*

La sua storia fa risalire il nome alla sfumatura verde che gli acini mantengono anche una volta maturati.

Nel 1953, ad opera della cantina Fazi Battaglia, venne creata la bottiglia dalla caratteristica forma ad anfora, ideata dall'architetto Antonio Maiocchi, a cui ancora ad oggi è associata,

che porta il Verdicchio alla popolarità. Negli anni '70 e '80 inizia un nuovo percorso di qualità, basato su un equilibrio tra tradizione e tecniche innovative per quanto riguarda la potatura, le rese, i tempi della vendemmia, il lavoro in cantina e le tecniche di vinificazione. Un'opera che, ad oggi, ha permesso al Verdicchio di conquistare numerosi riconoscimenti. In primis il riconoscimento di vino a Denominazione di Origine Controllata (DOC), per il Verdicchio di Matelica nel 1967, primo vino DOC delle Marche, e per il Verdicchio dei Castelli di Jesi nel 1968. Recentemente nel 2014 il Verdicchio è stato il vino bianco fermo più premiato dalle guide italiane e nel 2016 il “vino bianco più conosciuto dal pubblico italiano” (*dato certificato dall'osservatorio di settore Wine Monitor-Nomisma*). È stato premiato con la medaglia di platino ai Decanter World Wine Award 2018, uno dei concorsi enologici più autorevoli al mondo, ed è risultato il vino bianco fermo italiano più venduto al mondo (*dati 2018 Nomisma Wine-Monitor presentati in occasione dei 50 anni della Doc Verdicchio dei Castelli di Jesi*).

Il valore economico del vino Verdicchio è in costante crescita; negli ultimi 10 anni, secondo l'Istat, l'export è cresciuto del 56%, in particolare nei mercati extra europei, in primis verso gli Stati Uniti, seguiti da Cina, Norvegia, Svizzera e Russia, ma anche Germania e Regno Unito.

Il Verdicchio dei Castelli di Jesi e il Verdicchio di Matelica chiudono il 2020 con un incremento esponenziale dell'imbottigliato, segnalato da *Valoritalia* (Organismo di controllo delle due DOC) rispettivamente a +36,9% e +14,8%, grazie all'export, ma anche alla crescita del mercato interno, sia nella vendita diretta che nell'e-commerce.

## ***1.2 Lieviti autoctoni sulla bacca d'uva***

La bacca d'uva è sede di una complessa comunità microbica detta microbiota, che seppure stabile, è molto eterogenea poiché coesistono numerose specie di batteri, lieviti e funghi filamentosi.

La popolazione del microbiota è in costante variazione in base al grado di maturazione della bacca, al clima, al vitigno e alle pratiche colturali (Agarbati et al., 2019). Inoltre è stato rilevato che la biodiversità può variare notevolmente anche all'interno della stessa pianta, tra un grappolo e l'altro, in funzione dell'integrità dell'acino, che, se danneggiato, provoca la fuoriuscita di succo zuccherino che concorre alla moltiplicazione dei microorganismi, in particolare dei lieviti (Barata et al., 2008; Barata et al., 2012).

La variazione del microbiota parte nel terreno del vigneto, alla buccia della bacca matura e continua fino alla produzione del mosto e alla sua fermentazione. Inoltre, anche la tipologia di pratiche colturali influenza in modo sostanziale la diversità microbica, favorendo, nel caso della coltivazione biodinamica ed organica, un aumento di biodiversità, al contrario della viticoltura convenzionale che porta a comunità microbiche meno variabili (Milanovic et al., 2013).

Tra i vari microrganismi presenti sulla bacca d'uva i funghi sono sicuramente la componente microbica più rappresentata, mentre i lieviti sono rilevanti perché coinvolti nella produzione di vino e perché influenzano, con il loro metabolismo e la produzione di particolari molecole, la qualità, l'aroma e la particolarità di specifici vini.

Riguardo la composizione della flora microbica sulla bacca d'uva diversi studi hanno evidenziato, per quanto riguarda il regno dei *Fungi*, la presenza costante di alcuni *phyla*:



*Basidiomycota*, seguiti da *Ascomycota*, *Zygomycota* e *Chytridiomycota*. Molto più variabili sono i generi associati ai suddetti *phyla*: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicilium*, *Cladosporium*, *Lewia*, *Davidiella*, *Erysiphe*, *Botrytis*, per i funghi filamentosi; *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Lachanacea*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora*, per i lieviti; *Aureobasidium* per i lievito-simili (Morgan et al., 2017).

Ulteriori studi hanno confermato tali taxa, aggiungendo delle distinzioni particolari in base allo stato dell'acino, cioè se questo è sano o danneggiato.

I Basidiomiceti ossidativi, come *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium* e *Rhodotorula*, sono presenti su bacche integre, così come *Aureobasidium pullulans*. Diversa è la situazione per le bacche danneggiate, cioè, la cui polpa risulta esposta: in questo caso si rinvencono più frequentemente Ascomiceti ossidativi come *Candida*, *Pichia* e *Metschnikowia*, e Ascomiceti fermentativi come *Hanseniaspora* (Setati et al., 2012).

Particolare è la situazione per il lievito di maggiore interesse vinario: *Saccharomyces cerevisiae*. Questo lievito si rinviene raramente sulle bacche di uva e, quando presente, è in concentrazioni molto basse, meno di 10-100 UFC/g per acino, contro le quantità molto maggiori degli altri lieviti:  $10^2$ - $10^3$  UFC/g, per acini non maturi, fino a  $10^6$  UFC/g in bacche mature (Ciani et al., 2006).

Da un punto di vista ecologico l'esigua presenza di *S. cerevisiae* sulla bacca dell'uva è spiegata come una bassa affinità tra questo habitat e le esigenze fisiologiche del lievito (Martini, 1993).

### ***1.2.1 Ruolo ecologico e in vinificazione***

La fermentazione del mosto è il processo alla base della produzione di vino. Può avvenire spontaneamente, grazie al microbiota fermentante presente, oppure può essere avviata mediante l'utilizzo di lieviti selezionati (LSA, Lievito Secco Attivo, tipicamente un ceppo di *S. cerevisiae*), inoculati nel mosto successivamente alla soppressione della microflora residente, tramite metodi chimici o meccanici, come l'utilizzo di anidride solforosa, il calore, la filtrazione o la chiarificazione.

La fermentazione spontanea è il metodo naturale storicamente più comune. I lieviti che partecipano a questa fermentazione sono quelli naturalmente presenti sulla bacca d'uva, al momento della raccolta, e specifici di un certo vitigno e di un certo ambiente. Per queste ragioni la fermentazione spontanea può portare a caratteristiche molto variabili per il vino finale, a vantaggio della peculiarità del prodotto finito, ma può costituire anche una difficoltà per il vinificatore, che non riesce a controllare facilmente le attività delle varie specie presenti. Infatti, i lieviti che si avvicendano durante la fermentazione spontanea possono apportare aromi particolari al vino oppure, semplicemente, fermentare il mosto senza particolari cambiamenti chimici. Tuttavia, a volte, possono portare a qualità non desiderate nel prodotto finale.

La fermentazione spontanea procede con una successione di microrganismi, prevalentemente lieviti, che si susseguono man mano che le condizioni del mosto cambiano. Il fattore principale che determina questa successione è la concentrazione alcolica, dal momento che inizialmente si rinvengono preferenzialmente lieviti poco tolleranti all'alcol. I primi a fermentare sono i lieviti apiculati, non-*Saccharomyces*, in particolare *Kloekera*, *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*. I primi due producono, tra l'altro,

molto acido acetico, etilacetato ed acetoino, mentre *Metschnikowia* è un debole fermentante. Successivamente, quando la percentuale di etanolo aumenta, si presentano *Candida*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, insieme a concentrazioni crescenti di *Saccharomyces*. *Torulaspota delbrueckii* è un lievito molto importante nella fermentazione spontanea, in quanto permette di avere una purezza notevole e una bassa produzione di composti secondari. *Candida stellata*, invece, è in grado di produrre glicerolo, acido succinico, acetaldeide ed acetoino, con una bassa produzione di acido acetico, prodotto copiosamente, invece, dallo *Zygosaccharomyces*.

A fine fermentazione, quando la concentrazione di etanolo raggiunge valori molto elevati (superiori all'8%), l'unica specie dominante è *S. cerevisiae*.

Contestualmente a questi lieviti, anche altri possono essere presenti, in quantità diverse e sempre in base alla concentrazione di alcol e altri composti, prodotti dai lieviti precedentemente attivi. Tra questi, sono di notevole rilevanza, per l'apporto di caratteristiche organolettiche desiderate o meno, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, così come varie altre specie attribuibili ai principali generi già elencati (Martini, 1993; Ciani et al., 2006; Ciani et al., 2010; Piao et al., 2015).

### ***1.3 Lieviti bioattivi***

Negli ultimi trent'anni sono stati condotti molti studi relativi all'isolamento e all'impiego di microrganismi nella lotta biologica, come agenti di controllo biologico (BCA), in alternativa all'uso di prodotti chimici di sintesi, in particolare riferito alla fase di post-raccolta dei prodotti agricoli. Infatti il trasporto e lo stoccaggio sono fasi molto delicate, tra la coltivazione e la trasformazione del prodotto, nelle quali molti patogeni possono causare danni alle derrate, portando se non contenuti, a grandi perdite in termini quantitativi ed economici (Sharma et al., 2009).

Per limitare questi danni vengono utilizzati comunemente pesticidi chimici, che operano un forte controllo sui patogeni, ma costituiscono un problema per i residui di tali sostanze, che possono rimanere nei prodotti e nell'ambiente.

I maggiori rischi associati al danneggiamento dei prodotti dopo la raccolta sono da attribuirsi allo sviluppo di microrganismi patogeni, in particolare funghi filamentosi, come i generi *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium* e *Mucor*. Alcune di queste muffe, oltre ad infettare i vegetali, producono come metaboliti secondari delle micotossine potenzialmente oncogene, come la Patulina, la Citrinina, le Ocratossine e le Chaetoglobosine.

Con la crescente consapevolezza ambientale e sulla salute da parte dei consumatori, e grazie a regole più stringenti sull'utilizzo dei pesticidi sintetici, è aumentata la necessità di formulare pesticidi organici, biologici, che sfruttino le naturali interazioni di alcuni microrganismi con i patogeni.

Il potenziale utilizzo di antagonisti microbici per controllare i patogeni nel post-raccolta fu studiato per la prima volta nel 1985 da Wilson e Pusey, e ad oggi diversi studi e revisioni hanno offerto linee guida per l'isolamento e la selezione di agenti di biocontrollo post-raccolta (Droby et al., 2016).

Diversi gruppi di organismi, in particolare batteri e lieviti, sono stati testati per le loro capacità di controllo biologico. Tra i batteri il più noto è *Bacillus subtilis*, capace di inibire la crescita di molti funghi, oltre al suo utilizzo, in passato, come insetticida naturale. L'utilizzo dei batteri può presentare, tuttavia, lo svantaggio della produzione di tossine e metaboliti tossici. Al contrario, i lieviti generalmente non producono tali sostanze o, per lo meno, non risulta che la produzione di antibiotici sia un meccanismo di antagonismo preponderante.

Molti altri aspetti positivi sono attribuibili all'utilizzo dei lieviti per il controllo dei patogeni, considerando, inoltre, l'ingente mole di dati già noti sul loro conto, essendo utilizzati per la produzione di alimenti fermentati. Possiedono grandi capacità di resistenza e resilienza in condizioni di stress abiotici: temperature e pH estremi, umidità non ottimale, stress ossidativo, mancanza di nutrienti, oltre all'intrinseca capacità di resistere ad alcuni composti chimici utilizzati attualmente come fungicidi o in aggiunta ad essi.

I lieviti finora identificati come bioattivi sono stati isolati da vari ecosistemi e matrici, prevalentemente dalla superficie degli stessi frutti ed ortaggi dei quali si intendono controllare i patogeni.

È essenziale conoscere i meccanismi con i quali i lieviti esplicano la loro attività di contenimento ed inibizione del patogeno, oltre a verificarne la compatibilità con la flora residente sui prodotti da trattare.

I lieviti bioattivi possono mostrare un'ampia gamma di modalità d'azione e di sostanze secrete in relazione a diversi ospiti e patogeni e, a volte, modalità diverse possono agire simultaneamente, rendendo difficile stabilire quale singolo meccanismo abbia contribuito a una specifica azione antimicotica.

I lieviti bioattivi agiscono principalmente per competizione per i nutrienti e lo spazio, andando, ad esempio, ad occupare le ferite e le ammaccature dei frutti e rendendo, quindi, impossibile lo sviluppo dei funghi filamentosi. Tuttavia, sono allo studio anche altri meccanismi come la produzione di enzimi litici, come la  $\beta$ -(1-3)-glucanasi di *Pichia guilliermondii* o la serina proteasi alcalina di *Aureobasidium pullulans*, o il sequestro di ferro tramite siderofori.

Oltre alla produzione propria di composti inibenti sui patogeni, i lieviti antagonisti possono agire stimolando la produzione di ROS da parte dell'ospite, come meccanismo di difesa delle piante, o l'espressione delle proteine PR (Pathogenesis-Related) e della via di segnalazione MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), che va a sovrastare l'espressione di geni relativi al metabolismo e alla produzione di energia (Di Francesco et al., 2016).

Le ricerche sui lieviti bioattivi sono proseguite anche nella direzione di un aumento della loro efficacia. Infatti, da diversi lavori, è risultato come l'associazione dei lieviti antagonisti, con particolari sostanze, incrementi le loro potenzialità fungicide. Aggiungendo ai terreni di coltura specifici composti nocivi per il metabolismo dei lieviti, così come provocare shock termici o esporli a condizioni potenzialmente letali, induce una maggiore tolleranza a quei determinati stress, cosa che influisce positivamente anche sulla loro capacità di biocontrollo.

L'efficacia del trattamento può essere incrementata anche associando due o più lieviti con meccanismi d'azione e/o spettri d'ospite diversi, in maniera tale da ampliare il target e l'abilità di controllo.

I lieviti, grazie alla loro nota resistenza ai fungicidi, possono essere anche combinati con varie sostanze chimiche, alcune delle quali già in uso. Questo sembrerebbe determinare un incremento dell'attività inibitoria sui patogeni, oltre ad una diminuzione delle quantità di composti chimici utilizzate (Droby et al., 2009; Sharma et al., 2009; Di Francesco et al., 2016).

### ***1.3.1 Aureobasidium pullulans***

*Aureobasidium pullulans* (Fig.2a,b.) è un fungo lievitifforme molto diffuso e ben adattato nella fillosfera e nella carposfera di colture di frutta e verdura. È una delle specie di lievito predominanti isolate dagli acini d'uva, in tutte le fasi di maturazione, e da altri tessuti della vite, sia in piante sane che malate.

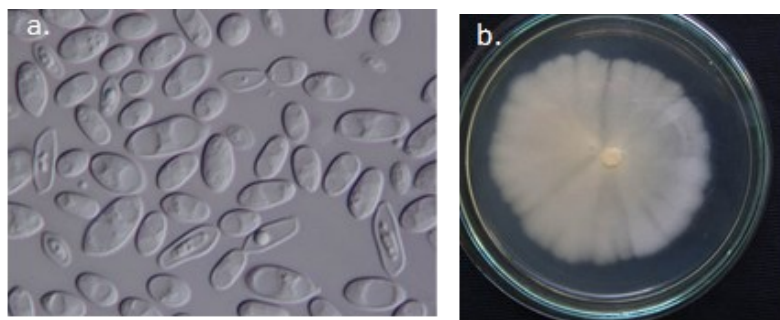


Fig.2a: *A. pullulans*; 2b: *A. pullulans*, crescita su PDA (Thambugala et al., 2014)

Questo ha portato ad indagare per molti anni circa le capacità di biocontrollo di *A. pullulans* per importanti malattie sia in campo (malattie dell'apparato fogliare, radicale e dei tessuti interni) che nel post-raccolta.

Da numerosi studi si è dimostrato un possibile agente di biocontrollo per importanti malattie come la muffa grigia della *Botrytis* (su uva, fragole, mele e kiwi), il marciume dei grappoli d'uva causato da specie di *Aspergillus*, e contro infezioni da *Penicillium expansum*, *Pezizula malicorticis* e *Rhizopus stolonifer* in diversi tipi di frutti. Per questo ad oggi l'attività di biocontrollo di *A. pullulans* contro i patogeni, soprattutto nel post-raccolta, è una delle sue principali applicazioni in agricoltura (Scheda et al., 1999; Bozoudi et al., 2018).

Una vasta gamma di prodotti è stata isolata, caratterizzata e testata per varie funzioni, biologiche e non biologiche. *A. pullulans* produce composti antimicrobici (antibatterici e antimicotici, come le aureobasidine), enzimi (amilasi, cellulasi, pectinasi, lipasi, xilanasi, proteasi, laccasi e mannanasi), polisaccaridi extracellulari (il pullulano, un omopolisaccaride che forma un film impermeabile all'ossigeno), siderofori (molecole che legano e sequestrano il ferro, non rendendolo più disponibile per l'utilizzo da parte degli altri microrganismi), poliesteri e oli pesanti nel mezzo di coltura (le liamocine che sono antimicrobici e agenti antitumorali).

La produzione di tutti questi composti richiede quantità significative di fonti di carbonio e azoto, nonché altri micronutrienti, che vengono rapidamente esauriti nell'ambiente, creando quindi un habitat meno favorevole o addirittura ostile per i patogeni delle piante.

L'azione di biocontrollo di *A. pullulans* è sicuramente attribuibile in primis alla competizione per i nutrienti e lo spazio. Essendo un fungo a crescita rapida compete con i patogeni per i nutrienti, in particolare gli aminoacidi, e per lo spazio, colonizzando le microlesioni presenti sul frutto ed agendo da scudo naturale contro l'ingresso del patogeno. Inoltre produce abbondanti quantità di polisaccaridi che, una volta secreti,



hanno un'azione di inibizione sia diretta (occupanti spazio) che indiretta (inibitori dell'attaccamento, inibitori della crescita, ecc.) sulla crescita dei patogeni.

*A. pullulans* inoltre produce composti organici volatili (VOC) che potrebbero svolgere un ruolo essenziale nell'attività antagonista contro i patogeni post-raccolta. Composti come il 2-feniletanolo, 1-butanol-3-metile, 1-butanol-2-metile e 1-propanol-2-metile, appartenenti al gruppo degli alcoli, sono prodotti da *A. pullulans* entro 3-4 giorni dalla crescita. L'alcol 2-feniletilico è stato determinato come il più attivo, responsabile della riduzione della crescita vegetativa e della sporulazione, e anche della riduzione della produzione di ocratossina A (OTA) e dell'espressione del gene per la sua biosintesi. Inoltre può anche degradare e disintossicare l'ocratossina A, trasformandola in OTA $\alpha$  sulle uve, prevenendo quindi la contaminazione del vino.

*A. pullulans* secerne gli enzimi chitinasi e glucanasi, tra i più importanti nell'attività di biocontrollo perché hanno la capacità di idrolizzare le muffe. Inoltre può essere considerato anche un microrganismo di interesse enologico perché facilmente controllabile e senza la capacità di alterare il vino durante la vinificazione. Infatti *A. pullulans* emette componenti aromatici tipici e ben noti del vino rosso, cioè acido 2-metilbutanoico, 3-metil-1-butanol ed etil ottanoato. Inoltre produce  $\beta$ -glucosidasi e pectinasi, coinvolte nella produzione di aromi, mentre le glucanasi, xilanasi, proteasi e le pectinasi, vengono sfruttate per migliorare la chiarificazione e la lavorazione del vino. Quindi sarebbe necessario approfondire ulteriormente i prodotti e i meccanismi d'azione di *A. pullulans* per esplorare nuove funzioni e possibili impieghi nel settore vitivinicolo (Bozoudi et al., 2018).

### 1.3.2 *Metschnikowia pulcherrima*

*M. pulcherrima* (Fig.3) è un lievito non-*Saccharomyces* con una distribuzione ecologica molto ampia, ritrovato comunemente sull'uva, altri frutti, fiori, nettari e altre piante.

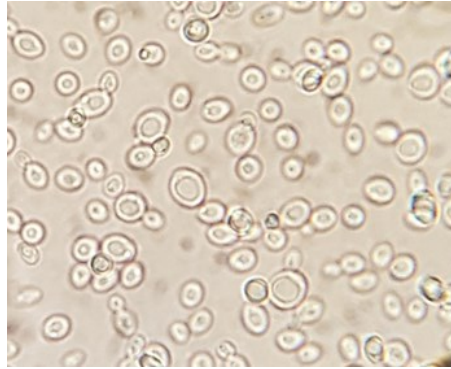


Fig.3: *M. pulcherrima*

*M. pulcherrima* può essere utilizzato come agente di controllo biologico grazie alla sua capacità di produrre un composto antimicrobico naturale, la pulcherrimina, un pigmento rosso-marrone che si accumula nel terreno di coltura e appare chiaramente visibile, attorno alle colonie di *M. pulcherrima* su piastra (Fig.4).



Fig.4: *M. pulcherrima* (Kantor et al., 2015)

Questa peculiare attività antimicrobica è dovuta all' esaurimento del ferro nel mezzo di coltura per precipitazione degli ioni ferro<sup>III</sup> causata dal legame con l'acido pulcherriminico, precursore della pulcherrimina secreta da *M. pulcherrima*. In questo modo l'ambiente diventa inospitale per altri microrganismi che necessitano di ferro per il loro sviluppo.

La pulcherrimina ha dimostrato un'efficace attività inibitoria nei confronti di diversi lieviti (*Candida tropicalis* e *Candida albicans*, oltre al *Brettanomyces/Dekkera*, generi *Hanseniaspora* e *Pichia*) e funghi (*Botrytis cinerea*, oltre a *Penicillium*, *Alternaria* e *Monilia spp.*). Tuttavia, *Saccharomyces cerevisiae* non viene influenzato da questa attività antimicrobica.

Inoltre *M. pulcherrima* è una delle specie di lievito non-*Saccharomyces* in grado di produrre più enzimi idrolitici extracellulari (pectinasi, proteasi, glucanasi, lichenasi,  $\beta$ -glucosidasi, cellulasi, xilanasi, amilasi, solfito reductasi, lipasi e  $\beta$ -lasi).

La sua elevata attività glucosidasica, che porta al rilascio di composti aromatici volatili, e proteolitica lo rende un partner di fermentazione molto interessante per *S. cerevisiae*.

Pertanto, l'uso di *M. pulcherrima* come starter selezionato in fermentazioni sequenziali o miste con *S. cerevisiae*, con il duplice scopo di migliorare il profilo aromatico e contrastare la microflora deteriorante, potrebbe essere di grande interesse nell'enologia moderna (Oro et al., 2014; Morata et al., 2019).

### 1.3.3 *Tetrapisispora phaffii*

*Tetrapisispora phaffii* (precedentemente noto come *Kluyveromyces phaffii*) è un lievito classificato come lievito killer (Fig.5).

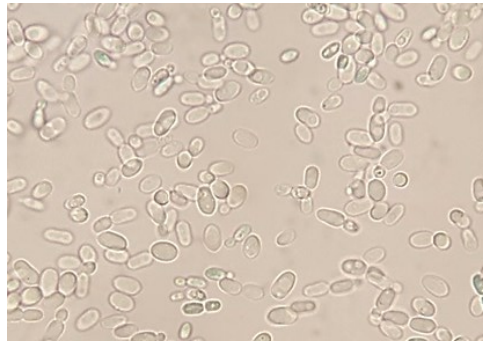


Fig.5: *Tetrapisispora phaffii*

Il carattere killer dei lieviti è stato inizialmente scoperto in alcuni ceppi di *S. cerevisiae* ed è associato alla secrezione di proteine note come tossine killer che possono uccidere le cellule bersaglio sensibili in un processo mediato da recettore, senza contatto diretto tra le cellule. L'unicità di questo fenomeno è legata non solo all'immunità dei lieviti killer alla loro tossina ma anche dalla loro suscettibilità alle tossine secrete da altri ceppi killer.

Attualmente i lieviti killer e le loro tossine sono impiegati nell'industria alimentare e nella produzione di mangimi, per combattere la microflora e i patogeni contaminanti, per controllare i lieviti selvaggi alterativi nelle industrie di vinificazione e fermentazione, per il controllo di funghi patogeni nelle piante, e in campo medico per sviluppare nuovi antimicotici per il trattamento delle infezioni fungine umane e animali.

In enologia, i lieviti killer appartenenti alla specie *S. cerevisiae* sono attualmente impiegati come "starter"; tuttavia il loro limite consiste nel fatto che la tossina killer di *S. cerevisiae* ha un ristretto spettro d'azione e non ha alcun effetto sui lieviti selvaggi presenti nel mosto (prevalentemente generi *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Pichia*,

*Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces*), che sono i principali bersagli degli agenti antimicrobici in vinificazione.

*T. phaffii* produce una tossina killer, una glicoproteina con massa molecolare di 33 kDa, nota come Kpkt. Questa riconosce i glucani ramificati  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 come bersaglio sulla parete cellulare delle cellule sensibili. La sequenza amminoacidica NH<sub>2</sub>-terminale di questa tossina killer condivide un'elevata omologia con le proteine appartenenti alla famiglia degli enzimi litici  $\beta$ -glucanasi (93% di identità con la  $\beta$ -1,3-glucanasi di *S. cerevisiae* e l'80% di identità con la  $\beta$ -1,3-glucano transferasi di *Candida albicans*). Queste due proteine sono coinvolte nel collegamento delle catene  $\beta$ -1,3-glucano di nuova sintesi alle catene esistenti, e nel loro collegamento attraverso il legame  $\beta$ -1,6. Studi hanno dimostrato che la caratteristica killer di Kpkt è dovuta proprio a questa attività  $\beta$ -glucanasica, che provoca l'idrolisi dei  $\beta$ -glucani all'interno della parete cellulare dei lieviti sensibili, portando quindi a cambiamenti ultrastrutturali della parete cellulare. Questo produce un alto livello di rugosità della parete e cambiamenti nella morfologia delle cellule sensibili (Fig.6)

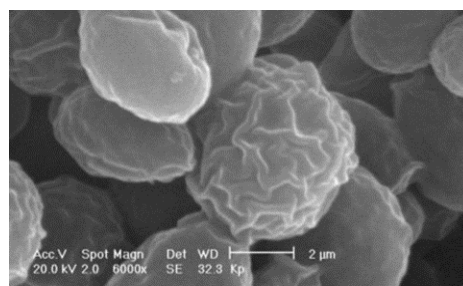


Fig.6: ceppo sensibile di *S. cerevisiae* trattato con Kpkt (Comitini et al., 2009)

Tuttavia, Kpkt non ha alcuna azione sulla membrana plasmatica. Si è visto infatti che la modalità d'azione di Kpkt è diretta esclusivamente verso la parete cellulare e che la sua

attività citocida *in vivo* è significativamente superiore a quella di una  $\beta$ -glucanasi commerciale, come la laminarinasi.

Sia l'elevata attività citocida specifica che la selettività di Kpkt differenziano la  $\beta$ -glucanasi di *T. phaffii* da altre  $\beta$ -glucanasi microbiche che non mostrano un'azione killer.

Numerosi studi hanno dimostrato l'azione di Kpkt contro lieviti enologici del genere *Hansenispora / Kloeckera*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* tra cui *Dekkera / Brettanomyces sp.*

Inoltre Kpkt mantiene l'attività killer in condizioni di vinificazione per un massimo di due settimane, quindi *T. phaffii* è un ottimo candidato per il controllo biologico della proliferazione indesiderata di lieviti apiculati durante le prime fasi della fermentazione, per ridurre o eliminare la necessità di aggiungere anidride solforosa SO<sub>2</sub> (Comitini et al., 2009; Carboni et al., 2021).

#### ***1.4 Botrytis cinerea: caratteristiche e modalità di controllo***

*B. cinerea* è un fungo Ascomicete della famiglia delle *Sclerotiniaceae*. È un parassita di molte piante, frutti e ortaggi, diffuso in tutto il mondo. In viticoltura è noto come “muffa grigia” della vite o semplicemente *Botrite*. Nella produzione di alcuni vini passiti liquorosi, viene addirittura ricercata e prende il nome di “marciume nobile”, determinato da particolari condizioni ambientali e di crescita della muffa. In altri casi, molto comuni, l'infezione da *Botrytis* può accompagnarsi a quella da parte di altre muffe e batteri: in questo caso, sulla bacca d'uva si assiste al cosiddetto “marciume acido”.

*B. cinerea* è costituita da un micelio grigio-olivastro (da cui il nome “cinerea”), regolarmente settato. Produce i conidi, cioè spore asessuali germinative, oppure gli sclerozi, cioè forme di resistenza, per superare le condizioni climatiche avverse.

Il ciclo biologico e il metabolismo di *B. cinerea* seguono lo sviluppo della bacca, con una maggiore disseminazione ed attività in contemporanea al periodo tra la fioritura e la maturazione dell’uva. Il ciclo della muffa si arresta poi con l’arrivo dei primi freddi, circa novembre, quando produce gli sclerozi o sverna in forma di micelio, protetta dalle strutture della pianta.

In viticoltura si distinguono diversi tipi di marciume, nei quali è determinante la modalità di sviluppo di *B. cinerea*.

Il “marciume grigio” è tra i più frequenti e dannosi, dovuto ad uno sviluppo eterogeneo della muffa sul grappolo, con crescita interna, ma soprattutto esterna alle bacche. È favorito dall’elevata umidità prolungata nel tempo. Le uve bottrizzate che presentano marciume grigio sono pressoché inutilizzabili, se non dopo ripetuti processi di pastorizzazione e stabilizzazione del mosto mediante anidride solforosa, non garantendo comunque un vino esente da off-flavour.

*B. cinerea* può svilupparsi come “marciume nobile” solo in presenza di precise condizioni ambientali. È infatti indispensabile un’alternanza di brevi periodi umidi e caldi, a periodi più lunghi caldi e secchi: questo limita lo sviluppo del fungo all’epidermide della bacca e non permette una crescita in profondità. Di conseguenza, anche il metabolismo rallenta, tanto da non provocare l’accumulo di troppi acidi o di enzimi degradativi. Inoltre, con questo andamento, anche la pianta stessa ha il tempo di adattarsi e produrre sostanze di difesa, tra le quali composti fenolici ed antifungini, come le fitoalessine, che contribuiscono

ulteriormente a controllare la diffusione del fungo. In risposta *B. cinerea* produce composti fitotossici ed enzimi litici che agiscono solo in superficie, donando alla bacca una colorazione bruna. La crescita esterna favorisce la produzione di acido gluconico e, mentre le cellule dell'epicarpo perdono funzionalità in seguito all'infezione, la bacca si disidrata, bloccando la crescita della muffa e concentrando nella polpa gli zuccheri, che daranno caratteristiche particolarmente dolci ai vini prodotti con queste uve botritizzate (ad esempio il Vin Santo).

La linea che separa la formazione di marciume nobile e marciume grigio è molto sottile, è quindi imprescindibile il controllo del microclima per produrre vini con marciume nobile, ma hanno un ruolo preponderante anche le cultivar di vite: l'insorgenza del marciume grigio è prevalente, infatti, in quelle varietà i cui grappoli hanno acini molto impaccati e buccia sottile (Fig.7).



*Fig.7: Marciume grigio*



Infine possiamo avere il “marciume acido” o comune, nel quale l’infezione da *Botrytis* può accompagnarsi a quella da parte di altre muffe e batteri. La prima ad infettare gli acini è proprio *B. cinerea*, producendo lesioni sulla cuticola, sia direttamente con i propri enzimi, sia sotto la spinta del micelio in via di sviluppo. Sulla bacca d’uva si assiste poi ad una successione di microrganismi che penetrano nella bacca e producono grandi quantità di acidi organici, che abbassano progressivamente il pH del mesocarpo.

Via via che il marciume progredisce, si rilevano popolazioni microbiche varie: batteri lattici ed acetici (in particolare *Gluconobacter*), diverse muffe, lieviti come *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Endomycopsis* e *Hanseniaspora* (tutti bassi produttori di etanolo, ma forti ossidanti). In queste condizioni le bacche vengono infestate da drosofile ed altri insetti, rendendo, a questo punto, l’uva inutilizzabile (Vercesi et al., 1991; Gény et al., 2003; Vannini & Chilosi, 2013).

Il controllo dell’infezione da *Botrytis*, attualmente, viene effettuato impiegando prevalentemente antibiotici chimici, con conseguenze nocive sull’ambiente e sulla flora microbica, necessaria per i processi successivi alla raccolta (ad esempio, nel caso dell’uva, sui lieviti indispensabili per la fermentazione).

Esistono tuttavia alternative all’uso di pesticidi chimici, utilizzando altri microrganismi antagonisti di *Botrytis*.

#### ***1.4.1 Controllo chimico e biologico***

*B. cinerea* è un fungo con un ampio spettro d'ospite e, per via delle poche esigenze nutrizionali e delle condizioni ambientali ottimali facilmente raggiungibili, può potenzialmente disseminare le proprie spore ampiamente e rapidamente.

Per tale motivo si impiegano e si formulano sempre più specifiche e potenti tecniche in grado di eliminare, o almeno limitare, il danno provocato da *B. cinerea* e da altre specie del genere *Botrytis*.

Le sostanze che controllano lo sviluppo dei funghi possono essere fungicide o fungistatiche, a seconda se, rispettivamente, uccidano o blocchino lo sviluppo del patogeno. Generalmente sono impiegate preventivamente, più spesso in pre-raccolta, mentre sono pochi i fungicidi attualmente in grado di curare l'infezione già in atto.

Gli antibiotritici più in uso sono sostanze chimiche, per lo più sintetiche, che agiscono a vari livelli del ciclo vitale e del metabolismo di *Botrytis*. Questi fungicidi chimici sono distinti in due categorie: nella prima si trovano gli antibiotritici meno recenti, cioè le prime sostanze utilizzate per il controllo del fungo, che vanno ad agire con meccanismi diversi su più fronti; i secondi, che comprendono gli ultimi formulati, sono, invece, specifici e attivi solo su una particolare via metabolica.

Tra i primi antibiotritici formulati, che agiscono con meccanismi d'azione multipli, troviamo i comuni composti a base di rame e zolfo, ma anche cloronitrili, ftalimidi, sulfamidici e ditiocarbamati. Questi composti hanno target differenti, alcuni dei quali ancora non del tutto compresi, ma in generale interferiscono con le principali attività enzimatiche di *Botrytis*.

Gli antibiotritici più recenti sono formulati invece per ostacolare specifiche vie metaboliche della muffa. Tra questi troviamo alcuni farmaci in grado di danneggiarne il citoscheletro e impedire quindi la divisione cellulare e tutte le varie funzioni di trasporto e segnale del fungo. Altre sostanze impiegate vanno ad interferire con l'osmoregolazione e con le vie di trasduzione dei segnali, come ad esempio gli analoghi strutturali della pirrolitina, un composto antifungino naturale. Le anilino pirimidine inibiscono, invece, la biosintesi degli aminoacidi, mentre altre molecole bloccano la sintesi dell'ergosterolo, componente specifico delle membrane cellulari dei funghi. Infine vi sono molti fungicidi in grado di bloccare la respirazione cellulare a livello dei mitocondri, impedendo la produzione di ATP, quindi di energia per le attività cellulari di *Botrytis*. Il più noto degli inibitori della respirazione cellulare, attualmente in uso, è il *Boscalid*<sup>®</sup>, affiancato più recentemente da analoghi delle strobilurine, metaboliti secondari prodotti da alcuni basidiomiceti, come *Strobilurus tenacellus*.

L'ampio utilizzo di questi antibiotritici sintetici ha però avuto come conseguenza l'incremento delle resistenze da parte di *Botrytis* ad entrambe le categorie di fungicidi, in particolare per quelli con target unici. I meccanismi di resistenza di questa muffa sono dovuti sia a capacità acquisite, sia per via di un'attività intrinseca di detossificazione.

I ceppi di *Botrytis* MDR (Multi Drug Resistant) sono determinati prevalentemente dalla sovraespressione di alcuni geni relativi al trasporto di membrana, dovuta a mutazioni o mediante incroci tra ceppi resistenti e sensibili.

La detossificazione delle sostanze antifungine, invece, si realizza mediante alcuni complessi enzimatici: glutatione-S-transferasi, citocromo P450, idrolasi o esterasi.

In tutti i casi l'aumento della resistenza è principalmente dovuto all'uso smodato e prolungato di un certo fungicida, che consente la selezione di ceppi via via multi-resistenti. Per contrastare l'insorgenza di resistenze è quindi indispensabile limitare le quantità ed il periodo di utilizzo di determinati antibiotici, oppure la combinazione di questi con altre sostanze o con pesticidi biologici.

Per questi motivi si sta valutando ed incentivando l'impiego di BCA (Biological Control Agents), cioè prodotti basati su microrganismi antagonisti della muffa.

Contro *Botrytis* sono diversi i microrganismi con alto potere di controllo, che agiscono con diversi meccanismi e ne limitano la crescita in pre- e post-raccolta, minimizzando, inoltre, il problema delle resistenze. I principali microrganismi specificatamente impiegati contro *Botrytis* sono prevalentemente funghi (i primi utilizzati sono stati *Trichoderma harzianum* e *Ulocladium sp.*) e lieviti, come *A. pullulans*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces chevalieri* e *Trichosporon pullulans*. Ma vengono impiegati anche batteri (come alcune specie di *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia liquefaciens*) e, tra i microrganismi, sono allo studio anche dei Mycovirus.

Oltre ai microrganismi e alla loro attività diretta, anche alcuni agenti biotici e abiotici sono potenzialmente in grado di ostacolare la crescita di *Botrytis*: acido sialico, acido jasmonico, acido  $\beta$ -aminobutirrico; fertilizzanti NPK e a base di calcio; la laminarina, un  $\beta$ -glucano estratto dall'alga marina *Laminaria digitata*; ed ancora il Chitosano ed altre sostanze estratte dalle piante; nonché estratti acquosi dal compost.

I metodi chimici di controllo, tuttavia, rimangono i più utilizzati, con provati effetti sull'ambiente, sui consumatori e sugli operatori che li diffondono.

In particolare, in viticoltura il trattamento dell'uva e delle viti riveste un ruolo preponderante, con l'impiego dell'8% di tutti i fungicidi attualmente in uso. Il problema ricade poi sul successivo processo di vinificazione, con la presenza di residui di sostanze antifungine che si trasferiscono dall'uva al mosto e possono permanere nel vino. Sebbene i processi pre- e post-fermentativi (come la chiarificazione) possano, in parte, ridurre la concentrazione nei limiti imposti dalla normativa europea sulla quantità di residui di agrofarmaci tollerabili nel vino, non vi è mai la totale assenza di residui.

Ciò può determinare anche un effetto nocivo sulla fermentazione del mosto, in quanto i lieviti possono essere influenzati dal residuo antifungino, rallentando la propria attività fermentativa.

Inoltre, diversi studi hanno confrontato la quantità e la diversità della microflora presente in vigneti coltivati con pratiche convenzionali o organiche. I risultati hanno mostrato come i vigneti organici siano popolati da una comunità molto variabile di specie microbiche, ma ognuna poco rappresentata numericamente. Al contrario, i vigneti coltivati convenzionalmente mostrano poche specie microbiche, ognuna in numero molto elevato. In altre parole, le pratiche viticole organiche mostrano una minore influenza sulle comunità microbiche, favorendo una grande biodiversità, formata da molte specie poco abbondanti. Al contrario, l'agricoltura convenzionale seleziona solo le poche specie microbiche resistenti ai fitofarmaci utilizzati, che quindi aumentano numericamente (Elmer & Reglinski, 2006; Fillinger & Walker, 2016).

### ***1.5 Disciplinare di produzione del vino Verdicchio DOC***

Il disciplinare di produzione viene emanato e pubblicato dal Mipaaf, Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. Dal un punto di vista strettamente giuridico è un atto normativo, infatti ha la forma legale del Decreto Ministeriale, che definisce i requisiti produttivi e commerciali fondamentali di un prodotto con Denominazione. Nel caso del vino, stabilisce tutte quelle norme che regolano la produzione vitivinicola internamente alle denominazioni di origine cui si riferiscono: IGT (Indicazione Geografica Tipica), DOC (Denominazione di Origine Controllata) e DOCG (Denominazione di Origine Controllata e Garantita). La severità dei requisiti specificati nella norma cresce passando da IGT, a DOC, a DOCG.

Il disciplinare Contiene norme su tutti gli aspetti della produzione di un vino ed è suddiviso in vari articoli, ognuno dei quali disciplina un aspetto specifico: la denominazione, la base ampelografica (ovvero quali vitigni siano ammessi per produrre una data etichetta e in quale percentuale), la zona di produzione delle uve, le norme per la viticoltura e la vinificazione, le caratteristiche al consumo, le norme per l'etichettatura e il confezionamento.

Il Verdicchio ha due DOC: il Verdicchio dei Castelli di Jesi, DOC dal 1968, e il Verdicchio di Matelica, dal 1967, primo vino DOC delle Marche. Entrambi si fregiano della DOCG nella rispettiva versione Riserva, e di versioni Spumante e Passito per entrambe le due DOC.

Il vitigno usato nelle due zone è sempre lo stesso, cambia però il clima: più ventilato, marino e dolce quello della Valle Esina, più aspro quello di Matelica, un piccolo borgo a ridosso dell'Appennino. Anche le caratteristiche dei suoli sono molto diverse, e contribuiscono alle caratteristiche finali delle uve e del vino finale: alto contenuto di argille e di carbonato di calcio, erodibilità e scarsa permeabilità nei terreni del Verdicchio di Jesi, mentre i suoli di

Matelica sono più pesanti, con calcareniti e rocce pelitiche, rocce calcaree e calcari marnosi. Piccole differenze che permettono al vino di cambiare le sue caratteristiche finali nel giro di pochi chilometri.

Secondo il disciplinare di produzione il vino “Verdicchio dei Castelli di Jesi” DOC deve essere ottenuto da uve del vitigno Verdicchio per un minimo dell’85% e possono concorrere altri vitigni a bacca bianca, idonei alla coltivazione nella Regione Marche, per un massimo del 15%.

La zona di produzione delle uve rientra in un territorio di 23 comuni nella provincia di Ancona e 2 comuni nella provincia di Macerata, storicamente chiamati “Castelli di Jesi”, riportati nel disciplinare.

Le condizioni ambientali e di coltura dei vigneti, i sistemi di impianto e le forme di allevamento (il più diffuso a controspalliera) devono essere quelli tradizionali o comunque atti a non modificare le caratteristiche delle uve e del vino. È vietata la forma di allevamento a pergola detta tendone ed è consentita l’irrigazione di soccorso.

La resa di uva per ettaro deve essere di 14 tonnellate; anche in annate eccezionalmente favorevoli la resa deve essere riportata a tale limite, purché la produzione non superi del 20% tale limite, altrimenti tutta la produzione non avrà diritto alla DOC. Le uve devono assicurare un titolo alcolometrico volumico naturale minimo di 10,50% vol.

Nella vinificazione sono ammesse soltanto le pratiche enologiche tradizionali, leali e costanti, atte a conferire ai vini le loro peculiari caratteristiche. Il vino all’atto dell’immissione al consumo deve rispondere alle seguenti caratteristiche: colore giallo paglierino tenue; odore delicato e caratteristico; sapore asciutto, aromatico e con retrogusto

gradevolmente amarognolo; titolo alcolometrico volumico totale minimo di 11,50% vol, acidità totale di 4,5 g/l ed estratto non riduttore minimo di 14,0 g/l.

Nell'etichetta deve comparire l'annata di produzione. È vietata l'aggiunta di qualsiasi qualificazione non prevista dal disciplinare, mentre è consentito il riferimento a nomi e marchi privati, indicazioni geografiche e toponomastiche aggiuntive riferite alle aree di provenienza delle uve. Il confezionamento è concesso in recipienti aventi le capacità previste dalla vigente normativa.

La Società “*Valoritalia*” è l'Organismo di controllo autorizzato dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali che effettua le verifiche del rispetto delle disposizioni del disciplinare, per i prodotti beneficianti della DOC, mediante controlli combinati (sistematici e a campione) nell'arco di tutta la filiera produttiva (viticoltura, elaborazione e confezionamento).

### ***1.6 Produzione di vino Verdicchio biologico***

Parlando di vino biologico è necessario riferirsi al concetto più generale di agricoltura biologica. Il termine *biologico* è stato usato per la prima volta nel 1979 da Rudolf Steiner, e successivamente nel 1982, grazie all'IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements), furono approvati i primi «Standard di agricoltura biologica per i commerci internazionali e nazionali». Ad oggi l'agricoltura biologica è finanziata e disciplinata a livello europeo, e il primo Regolamento UE in materia risale al 1991.

Il settore del biologico in Italia, compreso il comparto vitivinicolo, ha acquisito un'importanza e un valore economico sempre maggiori negli ultimi anni.



La regione Marche ha una fortissima identità green ed è una tra le regioni a maggior concentrazione bio in vigna. Questo è testimoniato anche dal fatto che ad oggi, facendo riferimento al vino Verdicchio, si hanno molti esempi di “Verdicchio Biologico” prodotti e commercializzati da parte di numerose cantine vinicole marchigiane.

La produzione di Verdicchio biologico, e più in generale di vini biologici in Italia, è regolamentata da specifiche normative europee. Nell’Unione Europea, la produzione e il commercio di prodotti biologici, tra cui il vino, sono disciplinati dal nuovo **Regolamento UE n. 848/2018 del Consiglio e Parlamento Europeo** e dal **Regolamento di esecuzione della Commissione europea n. 1165/2021**, in vigore in tutti gli Stati membri, a decorrere dal 1° gennaio 2022. Il regolamento esecutivo contiene le specifiche disposizioni per la produzione e la designazione di ‘vino biologico’, quindi stabilisce l’utilizzo di determinati prodotti e sostanze, all’interno de settore vitivinicolo biologico.

La normativa regolamenta tutta la filiera di produzione, dalla coltura dell’uva alla vinificazione, fino alla etichettatura e commercializzazione.

Il vino biologico deve essere ottenuto solo da uve biologiche, in vigna valgono quindi i principi dell’agricoltura biologica come prediligere il diserbo meccanico rispetto a quello chimico e preferire i concimi organici (come rame, zolfo e lotta biologica) a quelli chimici di sintesi per la difesa della pianta.

Sono invece imposte delle restrizioni nell’impiego di additivi e nelle pratiche di cantina.

Riguardo la presenza di anidride solforosa, nel vino biologico è consentito un limite massimo di solfiti inferiore a quello dei vini “tradizionali”. Infatti, per il vino biologico vigono le seguenti soglie: 100 mg/l per i vini rossi e 150 mg/l per i vini bianchi e rosati; in pratica 50

mg in meno per ogni categoria, rispetto ai livelli attuali dei vini tradizionali. In tutti gli altri vini con un tenore di zucchero residuo superiore a 2 g/l, il limite massimo di anidride solforosa è ridotto di 30 mg/l rispetto al vino tradizionale corrispondente non biologico.

Nel produrre vino biologico è vietato ricorrere alle tecniche di elettrodialisi per la stabilizzazione tartarica dei vini, concentrazione parziale a freddo, eliminazione dell'anidride solforosa con metodi fisici, scambiatori di cationi e dealcolizzazione parziale dei vini. Sono consentite, ma nei seguenti limiti, il trattamento termico (a temperatura massima di 75°C), la centrifugazione e la filtrazione con dimensione dei pori delle membrane non inferiore a 0,2 µm. Tutte le altre pratiche enologiche sono consentite anche per i vini biologici, con gli stessi eventuali limiti specificati nella normativa tradizionale. Anche nelle operazioni di elaborazione dei vini biologici vanno impiegati prodotti di origine biologica, questo vale anche per quel che riguarda ad esempio i lieviti, le gelatine e i mosti.

Infine l'etichettatura di vino biologico, oltre a doversi conformare alle norme in materia di etichettatura applicabili a tutti i vini, deve inoltre contenere: l'espressione 'vino biologico' sull'etichetta, il logo biologico dell'UE e il numero di codice del competente organismo di certificazione.

## Capitolo secondo

### SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni una sempre maggiore sensibilizzazione dei consumatori ai problemi derivanti dall'inquinamento, e la consapevolezza della qualità degli alimenti nel rispetto della salute umana, hanno senz'altro incoraggiato la diffusione e lo sviluppo dell'agricoltura biologica. Il comparto vitivinicolo non si è certamente sottratto a questo scenario, registrando un forte aumento della domanda di vini biologici.

Per poter ottenere come prodotto finito un vino Verdicchio, vitigno storico e di eccellenza nella regione Marche, biologico e di qualità è indispensabile partire da un mosto e quindi, ancora prima, da uve biologiche di alta qualità.

In linea con la tendenza attuale di estrema tutela del territorio, il mondo della ricerca sta incrementando gli studi per la validazione di prodotti contenenti microrganismi, tra cui lieviti bioattivi, che abbiano un'azione inibente su parassiti e patogeni della vite.

È stata indagata la capacità di controllo biologico di alcuni lieviti *non-Saccharomyces*, che possano svolgere la loro azione, prima, come trattamento biologico alternativo in vigneto e, successivamente, continuare la loro azione durante il processo di fermentazione in cantina, controllando la proliferazione di lieviti alterativi. Questo porterebbe a poter ridurre l'utilizzo di anidride solforosa, prodotto dannoso per la salute umana, che deve rientrare in limiti stringenti, secondo la normativa per la produzione di vino biologico.

In questo lavoro di tesi, è stata testata l'azione inibente di alcuni lieviti, precedentemente selezionati, direttamente in campo contro *Botrytis cinerea*, un fungo filamentoso parassita che colpisce la vite, provocando ingenti danni. Le valutazioni sono state condotte effettuando dei monitoraggi sulla popolazione epifitica, prima e dopo il trattamento, e valutando la crescita di *B. cinerea* su bacche in post-raccolta.

I lieviti risultati più efficaci nel biocontrollo di *B. cinerea* sono stati testati anche per valutare le loro eventuali attitudini fermentative, in micro fermentazioni sequenziali. Lo scopo è stato quello di testare sia la performance fermentativa che la loro capacità di controllo della proliferazione di lieviti apiculati nel mosto, per la produzione finale di vino biologico con bassi livelli di anidride solforosa.

Successivamente sono state allestite delle micro-fermentazioni impiegando *Torulaspora delbrueckii*, un lievito *non-Saccharomyces* di interesse enologico, per saggiare le proprietà di arricchimento del profilo aromatico del vino.

Le valutazioni sono state eseguite mediante controllo dell'andamento fermentativo, monitoraggio della popolazione tramite conte su piastre e poi analisi dell'acidità volatile e delle componenti aromatiche del vino finale al gas-cromatografo.

## Capitolo terzo

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 Microrganismi impiegati

Per questo studio sono stati utilizzati cinque lieviti non-*Saccharomyces* di diversi generi, selezionati in un precedente lavoro di tesi.

Codice	Specie	Origine
Na-32	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Namibia – fiori
48 (Tuscania)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Superficie bacca uva passita
3037 (DBVPG)	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	/
6076 (DBVPG)	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	/
J-401 (DISVA)	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Uva vigneto Verdicchio

Tab.1: Microrganismi impiegati

Sono stati inoltre utilizzati due lieviti *Saccharomyces* come starter per le fermentazioni: un ceppo autoctono (isolato dal vigneto e studiato da un punto di vista genetico) (Agarbaty et al., 2020) Disva **I4** (*S. cerevisiae* nativo) e un ceppo commerciale **Lalvin ICV OKAY®** (starter commerciale).

I lieviti utilizzati sono stati prelevati inizialmente da una collezione conservata in glicerolo a -80°C, poi rinfrescati periodicamente, prima dell'utilizzo, su terreni agarizzati in piastre Petri e conservati a 4°C.

È stata, inoltre, impiegata una specie di fungo filamentoso, *B. cinerea*, fornita dal Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (D3A), dell'Università Politecnica delle Marche (Univpm). Anche *B. cinerea* è stato rinfrescato periodicamente su piastre con l'opportuno terreno di coltura e mantenuto alla luce e a temperatura ambiente. Come controllo commerciale è stato usato il fungicida microbiologico *Botector*<sup>®</sup>.

### **3.2 Terreni di coltura**

I terreni, agarizzati e liquidi, impiegati per le prove eseguite in laboratorio, sono stati preparati seguendo le specifiche quantità, proprie di ogni tipologia.

● **YPD**, sia solido che liquido, per la crescita dei lieviti, costituito dai seguenti composti, disciolti in acqua deionizzata:

- 2% peptone;
- 2% glucosio;
- 1% estratto di lievito;
- 1,8% Agar (nel caso di terreno solido).

● **YPD liquido modificato**, utilizzato per le pre-culture dei lieviti:

- 1,1% peptone;
- 2% glucosio;
- 0,5% estratto di lievito;

● **PDA (Potato Dextrose Agar)**: per la coltura di *B. cinerea*, preparato già pronto in polvere, da solubilizzare in acqua deionizzata in una proporzione di 42g in 1000ml.

● **WL Nutrient Medium**: per il monitoraggio delle conte su piastra; il preparato in polvere va solubilizzato in acqua deionizzata in una proporzione di 80g su 1000ml. Nei casi in cui si

è ritenuto necessario limitare la crescita delle muffe, è stato aggiunto del bifenile al 2% (1ml ogni 100ml di terreno). Il Terreno WL permette la crescita delle principali specie di lievito, e le loro colonie assumono colorazioni e/o morfologia diverse per cui sono facilmente riconoscibili.

Tutti i terreni, dopo la preparazione, sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per circa 30 minuti.

- **Agar Lisina:** il preparato in polvere va solubilizzato in acqua deionizzata in una proporzione di 6,6g in 100ml. Va aggiunto poi 1 ml di potassio lattato al 50% per ogni 100ml di terreno e si porta ad ebollizione, in microonde, fino a sciogliere completamente. È un terreno selettivo che inibisce la crescita del *S. cerevisiae* e consente la crescita degli altri lieviti; la resina infatti non è una fonte di azoto assimilabile dal *S. cerevisiae* che quindi viene invitato nello sviluppo, mentre può essere metabolizzata da quasi tutte le altre specie di lieviti associate alla vinificazione.

### ***3.3 Trattamento in vigneto***

I due ceppi di lieviti bioattivi selezionati per il controllo dello sviluppo di *B. cinerea* (*A. pullulans* Na-32 e *M. pulcherrima* 48), sono stati applicati sulle piante del vigneto come fossero dei fito-trattamenti, sottoforma di soluzioni, secondo il seguente schema: 1) Ap (*A. pullulans* in coltura pura); 2) Mp (*M. pulcherrima* in coltura pura); 3) Mix (Ap:Mp ratio 1:1); 4) Bot (*Botector*<sup>®</sup>), unitamente ad un controllo negativo non trattato (Nt); 4 repliche per ogni soluzione. Le soluzioni sono state preparate con acqua deionizzata (5L) inoculando i lieviti bioattivi ad una concentrazione finale di  $2 \times 10^7$  UFC/ml.

I trattamenti, mediante l'utilizzo di motopompe, sono stati effettuati al momento dell'invasatura dei grappoli (20 Giugno) e a maturazione, prima della vendemmia (18 Settembre). Il vigneto (uve Sangiovese), situato a Camerano (AN) ed è stato concesso all'Univpm dalla *Soc. Coop. Agricola Terre Cortesi Moncaro* (Fig.8).



*Fig.8: Trattamenti in vigneto*

### ***3.3.1 Monitoraggio della popolazione epifitica***

Parallelamente ai trattamenti sono stati effettuati dei campionamenti di uve (Fig.9), per il monitoraggio della popolazione epifitica sulla superficie delle bacche e per verificare la persistenza dei lieviti sugli acini nel tempo. Il monitoraggio è stato svolto effettuando in laboratorio conte vitali su piastra, su terreno WL.



*Fig.9: Campionamenti in vigneto*



### ***3.3.2 Monitoraggio della crescita di B. cinerea sugli acini in post-raccolta***

Sono stati effettuati dei campionamenti in vigneto, per ogni tesi, 24 ore dopo e 10 giorni dopo il secondo trattamento. Gli acini sono stati disposti su griglie in box sterili, lasciati a temperatura ambiente alla luce naturale. Lo sviluppo e la crescita di *B. cinerea* è stata monitorata valutando i parametri di Incidenza percentuale del danno e Indice di McKinney (%).

### ***3.3.3 Valutazione delle piante rispetto B. cinerea e marciume acido***

Un mese dopo la vendemmia (8 Ottobre) sono stati eseguiti dei rilevamenti sulle piante in campo, valutando la presenza di *B. cinerea* e/o marciume acido considerando il danno percentuale e la gravità della malattia. I dati ottenuti sono stati, quindi, elaborati statisticamente.

## ***3.4 Allestimento prime micro-fermentazioni per la valutazione del controllo della flora indesiderata***

Sono state allestite delle micro-fermentazioni per valutare l'attività di biocontrollo dei lieviti selezionati (*T. phaffii*-6076 e *M. pulcherrima*-48).

Per questa prima prova sono stati utilizzati i lieviti *M. pulcherrima* (48), *T. phaffii* (6076), *H. uvarum* (3036), mentre come starter fermentativi sono stati utilizzati I4 (*S. cerevisiae* nativo) e il *S. cerevisiae* Lalvin ICV OKAY® (starter commerciale).

È stato utilizzato un mosto Verdicchi biologico (vendemmia 2017), fornito dalla cantina *Terre Cortesi Moncaro*, con Azoto Prontamente Assimilabile (APA) modificato di 250 mg/L. Per accrescere la presenza di lieviti apiculati nel mosto, questo è stato inoculato con *H. uvarum* (3037) ad una concentrazione finale di  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Sono state allestite le micro-fermentazioni in beute, da 250 ml e precedentemente sterilizzate in autoclave, ognuna contenente 200 ml di mosto. Ogni beuta è provvista di valvola di Müller contenente metabisolfito, per permettere la fuoriuscita di CO<sub>2</sub> ed evitare la contaminazione del sistema (Fig.10). Le beute, dopo gli inoculi dei lieviti, sono state riposte in termostato a 18°C.

Per gli inoculi di ogni lievito sono state effettuate delle pre-culture su YPD liquido modificato in beute poste in agitatore per 48 ore a 150 rpm. Sono state poi centrifugate e calcolata la concentrazione cellulare tramite conta alla camera di Thoma-Zeiss. Sono stati poi effettuati i calcoli per stabilire il volume di inoculo di ogni lievito per ottenere la concentrazione desiderata.

Nelle beute sono stati effettuati inoculi sequenziali di lieviti (tutti ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  UFC/ml) così descritti (ogni tesi effettuata in doppio):

- **Tesi 1:** controllo negativo (mosto senza nessun inoculo aggiuntivo, oltre a quello iniziale di *H. uvarum* di  $1 \times 10^4$  UFC/ml)
- **Tesi 2:** al tempo zero inoculo *T. phaffii* → dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 3:** al tempo zero inoculo *T. phaffii* → dopo 48 ore inoculo **Lalvin ICV OKAY®**
- **Tesi 4:** al tempo zero inoculo *M. pulcherrima* → dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 5:** al tempo zero inoculo *M. pulcherrima* → dopo 48 ore inoculo **Lalvin ICV OKAY®**

- **Tesi 6:** al tempo zero inoculo *T. phaffii* + *M. pulcherrima* (1:1) → dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 7:** al tempo zero inoculo *T. phaffii* + *M. pulcherrima* (1:1) → dopo 48 ore inoculo **Lalvin ICV OKAY®**
- **Tesi 8:** controllo positivo: dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 9:** controllo positivo: dopo 48 ore inoculo **Lalvin ICV OKAY®**

Durante la fermentazione è stato valutato l'andamento fermentativo (espresso come CO<sub>2</sub> svolta); la crescita dei lieviti è stata monitorata tramite conte su piastra, effettuate al tempo zero e poi al tempo 1, al tempo 2 (prima e dopo gli inoculi), al tempo 5, 8 e 14. Al termine della fermentazione ogni campione è stato sottoposto all'analisi dell'acidità volatile.



*Fig.10: Micro-fermentazioni*

### ***3.5 Allestimento seconde micro-fermentazioni per la valutazione del possibile miglioramento del profilo aromatico del vino finale***

Sono state allestite delle micro-fermentazioni per valutare il possibile miglioramento del profilo aromatico del vino, ad opera di *T. delbrueckii* (J401), in fermentazione mista con *M. pulcherrima* (48) e I4, come starter fermentativo.

È stato utilizzato un mosto Verdicchio biologico (vendemmia 2017, cantina *Terre Cortesi Moncaro*), modificato APA 250 mg/L.

Il mosto è stato aliquotato in beute da 250 ml con 200 ml di mosto ognuna, provviste di valvola di Müller contenente metabisolfito e dopo gli inoculi sono state riposte in termostato a 18°C.

Anche in questa seconda prova fermentativa gli inoculi dei lieviti sono stati ottenuti da pre-culture, con lo stesso procedimento descritto per la prima prova fermentativa.

Sono stati effettuati gli inoculi sequenziali dei lieviti *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* e I4 ognuno a concentrazione di  $1 \times 10^6$  UFC/ml (ogni tesi ripetuta in triplo):

- **Tesi 1:** al tempo zero inoculo *M. pulcherrima* → dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 2:** al tempo zero inoculo *M. pulcherrima* + *T. delbrueckii* (1:1) → dopo 48 ore inoculo **I4**
- **Tesi 3:** controllo positivo: dopo 48 ore inoculo **I4**

Durante la fermentazione è stato valutato l'andamento fermentativo; la crescita dei lieviti è stata monitorata tramite conte su piastra, effettuate al tempo zero e poi al tempo 1, al tempo 2 (prima e dopo gli inoculi), al tempo 4, 7 e 14. A fermentazione terminata, per ogni beuta, è stata analizzata l'acidità volatile e l'analisi dei composti volatili.

### 3.6 Monitoraggio delle micro-fermentazioni

L'evoluzione delle fermentazioni (sia per la prima che per la seconda prova di micro-fermentazione) è stata monitorata per via gravimetrica registrando giornalmente la perdita in peso espressa come grammi di CO<sub>2</sub> svolta. Il calo in peso è stato monitorato fino al termine della fermentazione (peso costante per tre giorni consecutivi) e la quantità di CO<sub>2</sub> prodotta è stata utilizzata per esprimere l'andamento fermentativo.

### 3.7 Analisi microbiologiche

Al fine di monitorare la crescita dei ceppi di lievito durante le micro-fermentazioni, in entrambe le prove è stata effettuata la conta vitale su piastra utilizzando due differenti terreni di coltura: WL (per la rilevazione dei lieviti *S. cerevisiae* e per la conta totale dei lieviti) e Agar Lisina (per la conta dei lieviti non-*Saccharomyces*).

Sono state eseguite delle diluizioni seriali, secondo lo schema mostrato in Figura 11.

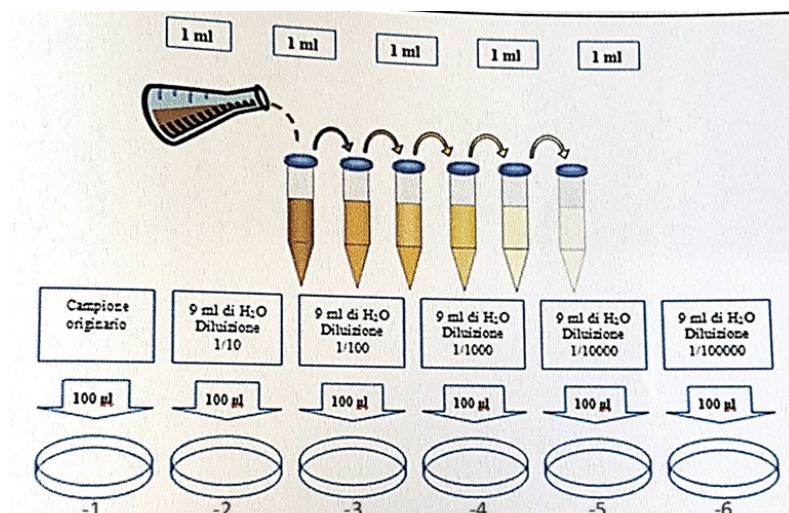


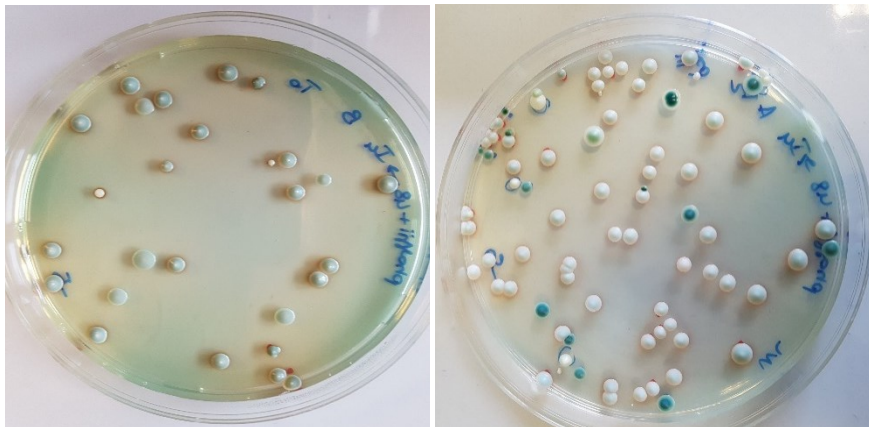
Fig.11: Diluizioni seriali

Per ogni beuta è stato prelevato 1 ml ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile, ottenendo una diluizione 1/10. Dopo aver agitato mediante vortex, è stato prelevato da questa provetta 1ml e posto in un'altra provetta, sempre contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino alla diluizione necessaria.

Successivamente sono stati trasferiti 100 µl di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno adeguato. Quindi, con una bacchetta di vetro ad "L", dopo essere stata immersa in alcol, fatta passare alla fiamma, raffreddata sul bordo della piastra, è stato effettuato lo spatolamento per diffusione cellulare.

Le piastre sono state messe ad incubare a 25°C per due o tre giorni.

Dopo il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute sulle piastre -3, -4 e -5.



*Fig.12: Conte vitali su piastra*

### 3.8 *Analisi chimiche*

#### 3.8.1 *Acidità volatile*

L'acidità volatile in un vino è la quantità di acido acetico presente e viene espressa in g/l di acido acetico. La determinazione è stata effettuata mediante distillazione in corrente di vapore con l'**acidimetro Juffman** (Fig.13).



*Fig.13: Acidimetro Juffman*

Tale apparecchio, che funziona elettricamente e che opera su 5 ml di vino, è composto dalle seguenti parti:

- recipiente per la raccolta del vino esausto e delle acque di lavaggio dopo l'analisi;
- beuta contenente acqua distillata per la generazione del vapore acqueo, scaldata da una piastra elettrica, provvista di un tappo a due fori; attraverso un foro passa il tubo di sicurezza, che serve anche per riempire la beuta, nell'altro foro è inserita una valvola;
- valvola per indirizzare il flusso di vapore o all'esterno (prima che inizi l'analisi) o dentro il palloncino da distillazione in corrente di vapore (durante l'analisi);
- palloncino da distillazione in corrente di vapore, provvisto di bolla di rettifica dei vapori;

- mantello scaldante o piastra elettrica per scaldare il palloncino da distillazione in corrente di vapore;
- refrigerante;
- beuta di raccolta del distillato.

Si aggiunge l'acqua distillata nella beuta generatrice di vapore acqueo per metà o poco più del suo volume e si innesta la corrente elettrica alla piastra per portare ad ebollizione l'acqua. Poi si attiva il refrigerante e sotto si mette il recipiente per la raccolta del distillato (40 ml). Quando l'acqua nella caldaia bolle ed il flusso di vapore esce all'esterno dal tubo di sicurezza, si mette nel palloncino da distillazione in corrente di vapore 5 ml di vino prelevati in modo esatto con una pipetta precedentemente avvinata. Successivamente si chiude con l'apposito tappo il palloncino e si accende il mantello riscaldante per scaldare il vino. Quando si formano le prime gocce di vapore condensato nella bolla di espansione di cui è provvisto il palloncino, si ruota la valvola in modo che il vapore venga convogliato all'interno del palloncino e investa il vino in ebollizione. Si distilla 40 ml di distillato, facendo attenzione che il livello del vino all'interno del palloncino rimanga più o meno costante; se il volume diminuisce, si abbassa il mantello scaldante o addirittura si spegne momentaneamente. Terminata la distillazione, si spegne il mantello scaldante, il palloncino e si riporta la valvola nella posizione di partenza, in modo che il vapore venga di nuovo convogliato all'esterno; poi si aspira il vino esausto e le acque di lavaggio del palloncino nel recipiente di raccolta degli scarti. Alla fine si fa la determinazione dell'acidità volatile attraverso una titolazione acidimetrica utilizzando una soluzione di NaOH N/50 (0,02 N) in una buretta e 3 gocce di fenolftaleina come indicatore aggiunto nel beker del campione in modo tale da effettuare il viraggio del campione in un colore rosa vivo.



### 3.8.2 Analisi dei principali composti volatili

L'estrazione con tecnica SPME è stata usata come tecnica di estrazione alternativa, in quanto più semplice e rapida e risulta essere sensibile alla rilevazione dei composti volatili. Il metodo di microestrazione in fase solida (SPME) applicato non prevede uso di solvente o strumentazione complessa. Si può eseguire in due modi: ad immersione diretta (DI-SPME) o spazio di testa (HS-SPME). Per il nostro studio è stata usata l'HS-SPME con la fibra a tripla fase DVB/CAR/PDMS (Fig.14).

L'estrazione della componente volatile è stata eseguita su 5 ml di vino, inseriti in una vial di vetro e aggiunti 25 µl di standard di estrazione (3-ottanolo) e 1 gr di NaCl. Il campione è stato posto in agitazione per 10 minuti. Dopodiché l'ago è stato inserito nel setto della fiala ed estratta la fibra, per permettere l'assorbimento dei composti volatili il tutto è stato posto in termostato a 40°C per 30 minuti.

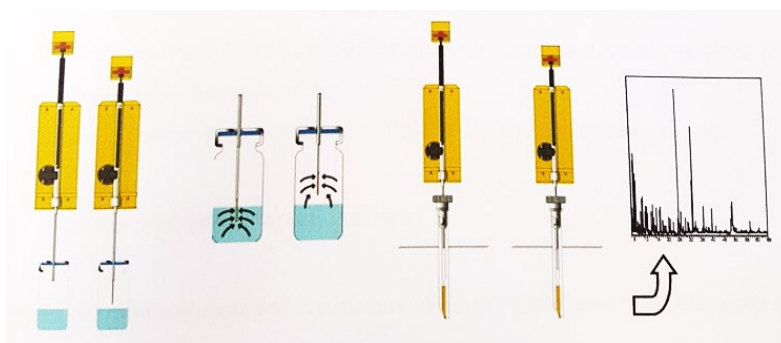


Fig.14: Fasi della microestrazione in fase solida eseguita in spazio di testa (HS-SPME): (da sinistra verso destra) ingresso fibra nel recipiente contenente il campione, le sostanze vengono estratte; rilascio delle sostanze per riscaldamento della fibra, elaborazione dati mediante lettura picchi riportati sul cromatogramma.

Il condizionamento della fibra, è una fase importante del processo di estrazione mediante SPME, e prevede che il campione venga posto in agitazione a 40°C per 30 minuti. Passato questo tempo, la fibra viene ritratta e rimossa dalla fiala contenente il campione.

Con la fibra pronta si passa all'analisi mediante Gas-Cromatografo. Inserendo l'ago nella porta di iniezione, e premendo lo stantuffo, si permette la fuoriuscita della fibra nella zona riscaldata dell'iniettore per desorbire gli analiti sulla colonna. Il tempo di esposizione della fibra nell'iniettore è circa 5 minuti, in modo che tutti gli analiti siano desorbiti. Infine la fibra viene ritratta e l'ago rimosso. Ogni singolo composto volatile è stato preparato, per la determinazione del proprio tempo di ritenzione al gas cromatografo, in una soluzione idroalcolica al 10%: in un matraccio da 10 ml sono stati aggiunti 1 ml di etanolo e 8 ml di H<sub>2</sub>O in modo da ottenere la soluzione idroalcolica alla concentrazione desiderata. 5 ml di questo preparato sono stati inseriti in un'apposita fiala di vetro per SPME, con la stessa procedura riportata sopra. Trascorso il tempo di condizionamento della fibra si è passati all'iniezione al GC e quindi alla determinazione del tempo di ritenzione (RT). Una volta venuti a conoscenza di ogni singolo tempo di ritenzione dei vari composti, si è passati alla preparazione della soluzione standard secondo i seguenti passaggi:

- 1) in un matraccio da 100 ml sono stati aggiunti 10 ml di etanolo e 80 ml di acqua;
- 2) è stato aggiunto lo standard 3-ottanolo per un volume di 500 µl e di ogni composto volatile sono stati aggiunti 100 µl;
- 3) il matraccio è stato portato a volume con i restanti 10 ml di acqua in modo da ottenere una soluzione idroalcolica al 10%;
- 4) la soluzione standard è stata distribuita in diverse vials di vetro da 10 ml;
- 5) 5ml della soluzione standard sono stati inseriti in una fiala di vetro per SPME con la stessa procedura finora descritta;
- 6) trascorso il tempo di condizionamento della fibra si è passati all'iniezioni al GC.

## Capitolo quarto

### RISULTATI

#### *4.1 Valutazione dell'efficacia del trattamento*

I due ceppi di lieviti bioattivi selezionati per il controllo dello sviluppo di *B. cinerea* (*A. pullulans* Na-32 e *M. pulcherrima* 48), sono stati applicati sulle piante del vigneto come fossero dei fito-trattamenti, al momento dell'invasatura dei grappoli (20 Giugno) e a maturazione, pochi giorni prima della raccolta (18 Settembre). Nello specifico, sono stati applicati quattro trattamenti: 1) Ap (*A. pullulans* in coltura pura); 2) Mp (*M. pulcherrima* in coltura pura); 3) Mix (Ap:Mp ratio 1:1); 4) Bot (*Botector*<sup>®</sup>), unitamente ad un controllo negativo non trattato (Nt). I risultati relativi al controllo di *B. cinerea* ottenuti, sono di seguito riportati.

#### *4.1.1 Sopravvivenza dei lieviti bioattivi applicati come fito-trattamenti a maturazione*

Con lo scopo di verificare la colonizzazione e la sopravvivenza dei lieviti applicati in campo al momento della maturazione, sono state eseguite delle conte vitali in piastra per valutare la popolazione epifitica prima e dopo il trattamento.

Il monitoraggio è stato effettuato prima e dopo 24 ore dal trattamento ed i risultati sono riportati nelle figure sottostanti. Ulteriori conte vitali sono state effettuate dopo 10 giorni dal trattamento per confermare la persistenza dei lieviti.

Di fatto, relativamente alle specie applicate (*A. pullulans* e *M. pulcherrima*) non è stato possibile distinguere i ceppi autoctoni da quelli inoculati, tuttavia l'incremento significativo della popolazione dopo il trattamento ha dimostrato la colonizzazione.

Le bacche dell'uva mostravano, prima del trattamento, una concentrazione di ceppi autoctoni di *A. pullulans* pari a  $5 \times 10^3$  UFC/ml. Dopo il trattamento Ap, la concentrazione è aumentata di un ordine di grandezza logaritmico, raggiungendo un valore pari a  $1,5 \times 10^4$  UFC/ml, valore rimasto costante sino al decimo giorno, ad indicare una completa e stabile colonizzazione (Fig.15).

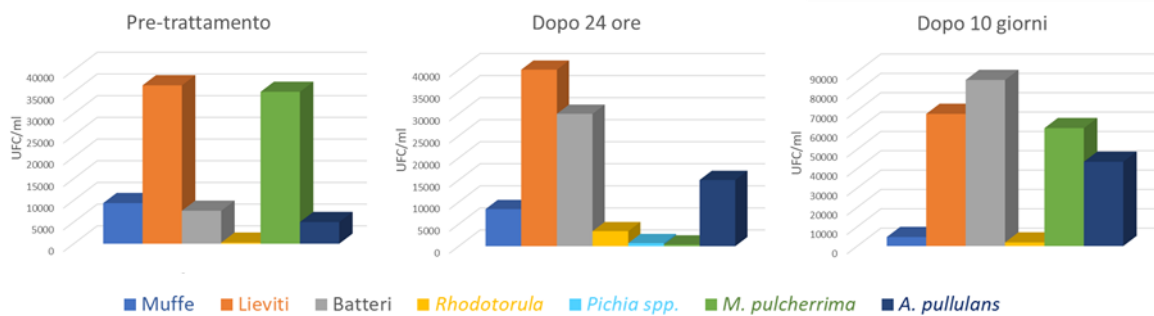


Fig.15: tesi Ap prima del trattamento, dopo 24 ore, e dopo 10 giorni

*M. pulcherrima*, invece, che era presente nelle bacche prima del trattamento con una concentrazione pari a  $7,5 \times 10^2$  UFC/ml, dopo un giorno dal trattamento non è stata rilevata (Fig. 16), sebbene dopo 10 giorni abbia mostrato un livello di colonizzazione pari a  $6,8 \times 10^4$  UFC/ml.

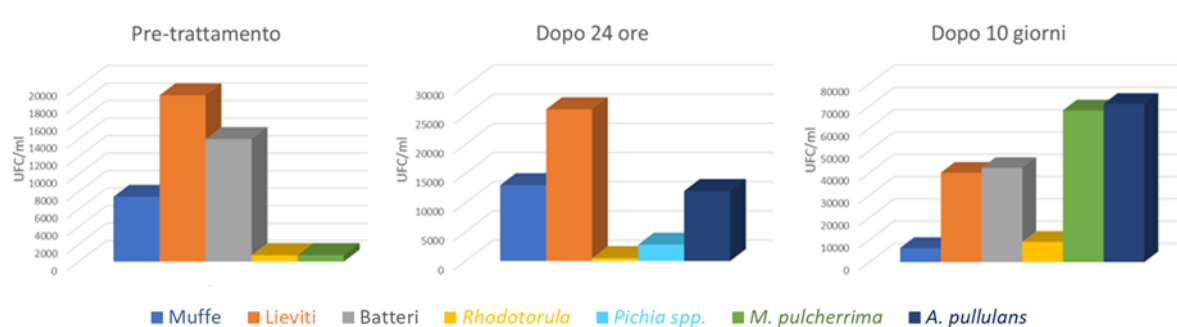


Fig.16: tesi Mp prima del trattamento, dopo 24 ore e dopo 10 giorni

Le uve trattate con la Mix (*A.pullulans* + *M. pulcherrima*) hanno confermato una colonizzazione completa e stabile sia dopo 24 ore che dopo 10 giorni, per *A. pullulans* e una colonizzazione evidente solo al decimo giorno, per *M. pulcherrima* (Fig. 17).

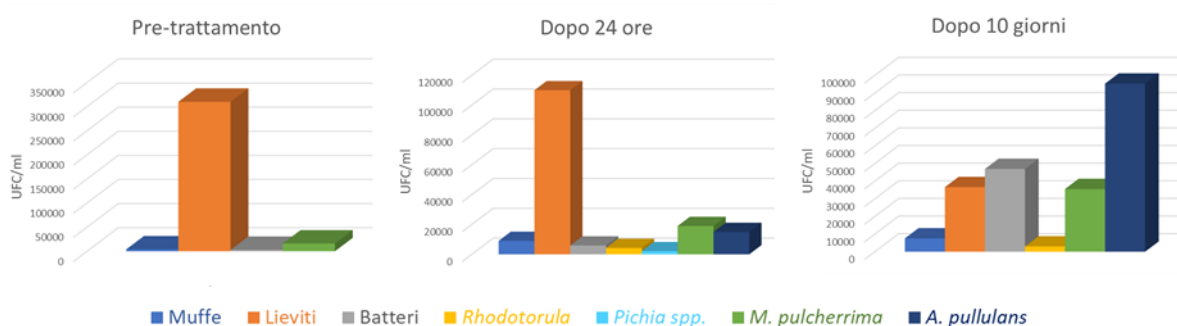


Fig.17: tesi Mix prima del trattamento, dopo 24 ore e dopo 10 giorni

I due ceppi di *A. pullulans* che costituiscono il principio attivo di *Botector*<sup>®</sup> (tesi Bot) hanno, analogamente a quanto detto sopra, confermato un alto e stabile livello di

persistenza (aumento di tre ordini di grandezza logaritmici dopo 24 ore e 5 ordini logaritmici dopo 10 giorni, come evidente in Figura 18).

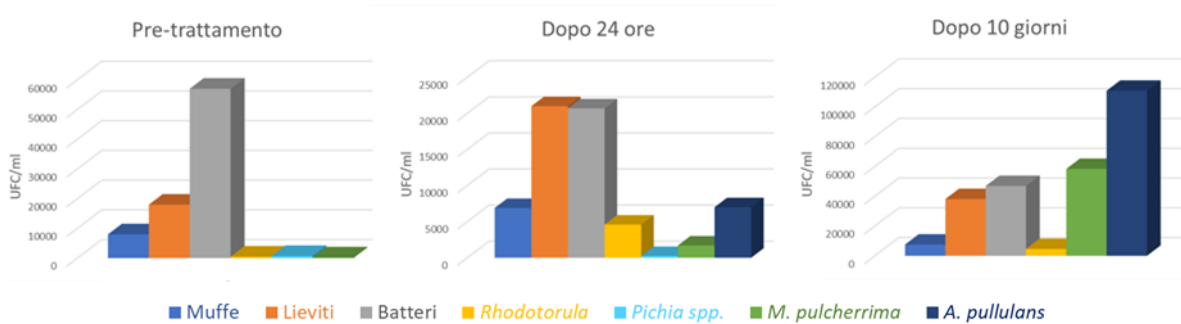


Fig.18: tesi Bot prima del trattamento, dopo 24 ore e dopo 10 giorni

#### 4.1.2 Efficacia dei trattamenti in post-raccolta (shelf-life a temperatura ambiente)

Di seguito al trattamento con i lieviti bioattivi, i campioni di bacche sono stati esaminati dopo 24 ore e dopo 10 giorni dal trattamento di settembre, valutando l'efficacia nei confronti di *B. cinerea* attraverso due parametri: l'incidenza e l'indice di McKinney.

I risultati riguardo all'incidenza del danno per ciascuna tesi sono riportati in Tabella 2.

Come atteso, per ogni trattamento, l'incidenza del danno è aumentata nel tempo in ciascuna tesi (Ap, Mp, Mix, Bot, Nt), ad indicare un incremento progressivo della diffusione dell'infezione.

Nella tesi Nt lo sviluppo di *B. cinerea* è aumentato lentamente e poi è esploso al settimo giorno (T7). Inoltre, il danno che è stato riscontrato sui campioni (percentuale di incidenza) si presenta omogeneo in tutte le ripetizioni effettuate.

*Botector*<sup>®</sup> ha provocato una notevole riduzione dell'incidenza del danno, rispetto al controllo non trattato (tesi Nt), mostrando un reale effetto protettivo verso *B. cinerea*. Tuttavia, all'interno delle repliche, è evidente una forte variabilità, che aumenta con l'aumentare del tempo di valutazione.

Il trattamento contenente *A. pullulans* (Ap) ha controllato la crescita di *B. cinerea* in misura minore rispetto alla tesi Mp (*M. pulcherrima*), tuttavia i valori sono risultati omogenei su tutti i campioni, ad indicare un controllo più esteso.

Diversamente, la tesi Mp ha mostrato un'incidenza del danno più bassa rispetto ad Ap, per ognuno dei tempi di valutazione, seppure, nei pochi acini dove l'infezione non è stata controllata, c'è stata una crescita considerevole della muffa, con un relativo danno di maggiore entità.

La tesi Ap è stata meno efficace nel controllo, ma con prestazioni pressoché omogenee, invece Mp ha mostrato un'attività di inibizione migliore, ma ridotta ad un numero minore di campioni (acini).

A fronte di queste valutazioni, la tesi Mix, costituita da una miscela in parti uguali dei lieviti *A. pullulans* e *M. pulcherrima*, è risultata essere quella con il miglior risultato, unendo gli aspetti positivi di entrambe i lieviti che la costituiscono.

		T3	T4	T5	T6	T7
Tesi	Repliche	Media	Media	Media	Media	Media
<b>Nt</b>	Nt1	3,59	6,41	12,65	14,07	16,73
	Nt2	0,64	1,15	3,54	3,63	7,46
	Nt3	0,87	2,18	3,92	6,21	6,7
	Nt4	0,85	1,61	3,01	3,31	4,2
	Media tesi	<b>1,49</b>	<b>2,84</b>	<b>5,78</b>	<b>6,81</b>	<b>8,77</b>
<b>Bot</b>	Bot1	1,59	2,10	3,91	5,10	6,29
	Bot2	1,03	1,25	1,45	1,76	2,72
	Bot3	0,64	0,70	0,98	2,47	3,01
	Bot4	0,57	1,43	2,70	3,52	6,44
	Media tesi	<b>0,96</b>	<b>1,37</b>	<b>2,26</b>	<b>3,21</b>	<b>4,62</b>
<b>Ap</b>	Ap1	0,59	0,87	0,87	3,24	3,33
	Ap2	1,73	4,29	4,29	8,35	9,91
	Ap3	1,73	2,51	2,51	9,11	11,27
	Ap4	2,12	2,97	2,97	10,13	20,18
	Media tesi	<b>1,54</b>	<b>2,66</b>	<b>5,20</b>	<b>7,71</b>	<b>11,17</b>
<b>Mp</b>	Mp1	1,43	2,23	5,09	6,35	6,55
	Mp2	0,77	1,02	2,95	3,73	5,96
	Mp3	1,88	2,86	4,56	6,48	8,96
	Mp4	1,03	1,83	2,41	3,70	4,98
	Media tesi	<b>1,28</b>	<b>1,99</b>	<b>3,75</b>	<b>5,07</b>	<b>6,61</b>
<b>Mix</b>	Mix1	2,16	3,56	7,39	9,02	9,69
	Mix2	0,59	1,48	4,62	5,22	6,01
	Mix3	1,07	1,72	2,81	4,06	4,65
	Mix4	0,64	1,02	2,88	3,73	4,02
	Media tesi	<b>1,12</b>	<b>1,95</b>	<b>4,43</b>	<b>5,51</b>	<b>6,09</b>

Tab.2: Medie dei valori di Incidenza % per ogni tesi, per ogni replica, nei vari tempi T di osservazione

Anche l'indice di McKinney, che mette in relazione la diffusione dell'infezione di *B. cinerea*, con la gravità del danno provocato agli acini, ha confermato il risultato precedente evidenziando la tesi Mix come la migliore per il controllo del marciume.



#### 4.1.3 Valutazione dell'efficacia dei trattamenti in campo

L'effetto dei trattamenti Ap, Mp, Mix e Bot è stato seguito anche in campo, monitorando i grappoli non raccolti, lasciati sulla pianta, oltre un mese dopo il periodo della vendemmia (8 ottobre 2018).

Sono state valutate le infezioni da marciume grigio (*B. cinerea*) e da marciume acido (causato da vari funghi e batteri) che possono avvenire anche contemporaneamente a maturazione avanzata dell'uva sulla pianta.

I risultati del rilievo fatto in campo dei due tipi di marciume (Tab.3), considerando la diffusione e la gravità delle infezioni, hanno evidenziato quanto segue:

- Ciascun trattamento ha mostrato una gravità significativamente diversa;
- Il trattamento più efficace è stato Ap, con valori significativamente più bassi rispetto al controllo non trattato (Nt) e a tutte le altre tesi;
- Anche i trattamenti Mix e Mp hanno mostrato valori più bassi del non trattato, ma intermedi rispetto alla tesi Ap.

Tesi	Rilievo del marciume grigio			Rilievo del marciume acido		
	Gravità (1-7)	Diffusione (%)	Indice di McKinney (%)	Gravità (1-7)	Diffusione (%)	Indice McKinney (%)
Ap	1,00	0,62	0,09	3,39	91,38	45,19
Mp	1,42	2,95	0,63	3,77	93,82	50,55
Ap+Mp	1,17	2,26	0,41	4,03	96,64	55,71
Bot	1,00	1,21	0,17	3,68	97,33	51,38
Non trattato	1,67	3,39	0,63	3,66	99,72	52,18

Tab.3: Rilievo del marciume grigio e del marciume acido sulle piante

Dunque, considerando le valutazioni in post-raccolta e in campo, i risultati migliori di biocontrollo su *B. cinerea* sono stati ottenuti dalla tesi Mix, in cui è stata rilevata una

riduzione della frequenza del marciume da parte di *A. pillulans* e un migliore controllo dell'infezione da parte di *M. pulcherrima*.

#### ***4.2 Valutazione dell'efficacia dei lieviti come biocontrollo sulla flora indesiderata in micro-fermentazione mista sequenziale***

L'obbiettivo è stato quello di valutare l'effetto bioattivo di *T. phaffii* (lievito killer) e *M. pulcherrima* (azione antimicrobica) contro lieviti alterativi presenti nel mosto, per la produzione finale di vini biologici con un ridotto impiego di anidride solforosa. Sono state quindi allestite delle micro-fermentazioni sequenziali con *T. phaffii* e *M. pulcherrima*, sia separatamente che in mix, e utilizzando come starter per la fermentazione sia I4 (*S. cerevisiae* nativo) che Lalvin ICV OKAY® (starter commerciale).

##### ***4.2.1 Valutazione dell'andamento fermentativo***

La cinetica di fermentazione è stata monitorata e valutata registrando i grammi di CO<sub>2</sub> svolta. Come mostrato in Figura 19, la durata complessiva delle fermentazioni è stata di 34 giorni, tranne che per le Tesi *T.phaffii*→I4, *T.phaffii*→OKAY® e *T.phaffii*+*M.pulcherrima*→OKAY® che hanno terminato la fermentazione al giorno 28. A fine fermentazione tutti i lieviti hanno raggiunto lo stesso livello di CO<sub>2</sub> svolta.

Come previsto, il controllo negativo (mosto inoculato solo con *H. uvarum*), ha avuto un andamento fermentativo irrilevante, in quanto questo lievito non è fermentante e quindi ha prodotto una quantità minima di CO<sub>2</sub> (circa 5-6 grammi).

La micro-fermentazione con solo Lalvin ICV OKAY® (controllo positivo) ha avuto una cinetica fermentativa tipica di un comune starter commerciale.

La micro-fermentazione con I4 in purezza, (controllo positivo), ha mostrato un andamento fermentativo del tutto analogo alla performance dello starter Lalvin ICV OKAY®. Quindi I4 ha avuto una buona performance fermentativa, comparabile a quella di uno starter commerciale.

Tutte le altre tesi hanno avuto una performance fermentativa soddisfacente. *T. phaffii* e *M. pulcherrima*, sia da sole che insieme in mix 1:1, non hanno influenzato negativamente la fermentazione, dimostrando quindi che i due lieviti non sono tra di loro antagonisti.

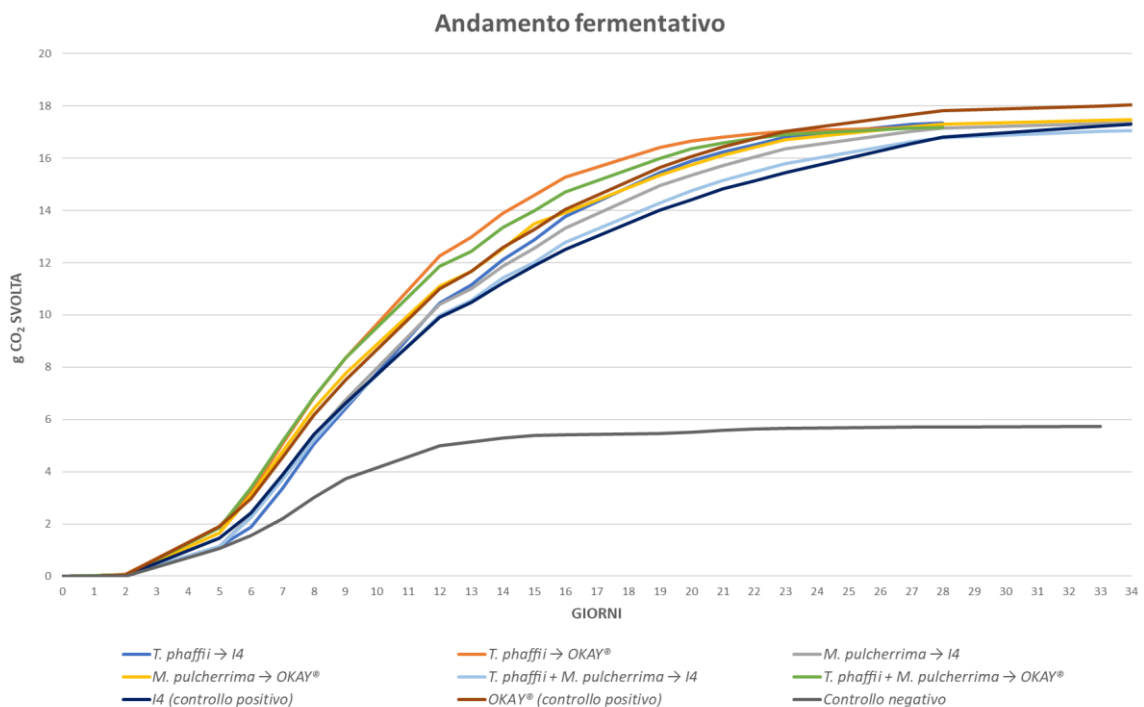


Fig.19: Andamento fermentativo della prima prova di micro-fermentazione

#### 4.2.2 Monitoraggio della popolazione microbica durante le micro-fermentazioni

Il monitoraggio dei ceppi di lievito durante le micro-fermentazioni è stato effettuato mediante conta vitale su piastra.

Per valutare l'effetto bioattivo di *T. phaffii* e di *M. pulcherrima* è stato stabilito in quali Tesi i lieviti non-*Saccharomyces* presenti nel mosto (che comprendevano lieviti del genere *Candida* e *Pichia*, e lieviti non identificati, già presenti nel mosto naturale ad una concentrazione pari a  $10^3$  UFC/ml; e *H. uvarum*, inoculata nel mosto alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  UFC/ml) sono stati inibiti e quindi sono diminuiti più velocemente, in confronto ai due controlli positivi (micro-fermentazione con I4 o OKAY® in purezza) (Fig.20a,b).

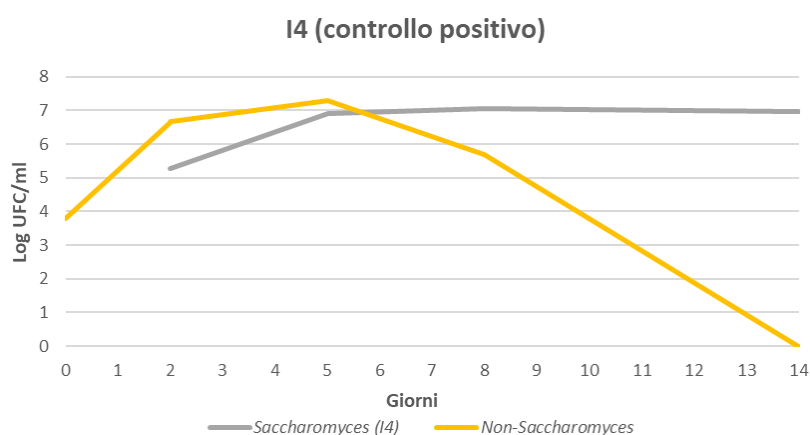


Fig. 20a: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione I4

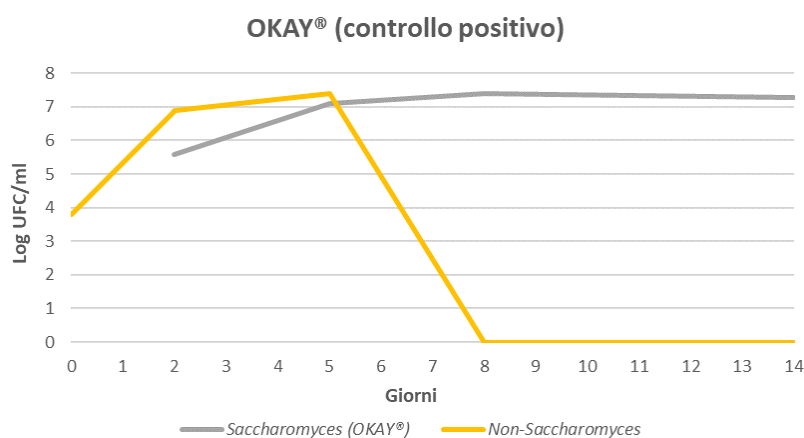


Fig. 20b: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione OKAY®

*T. phaffii*, in micro-fermentazione sequenziale, sia con I4 che con OKAY®, non ha avuto un'azione di biocontrollo soddisfacente sui non-*Saccharomyces*. Questi infatti hanno proliferano fino al 2° giorno, si sono mantenuti costanti fino all' 8° giorno e poi hanno iniziato a decrescere dall' 8° fino al 14° giorno (Fig.21a,b).

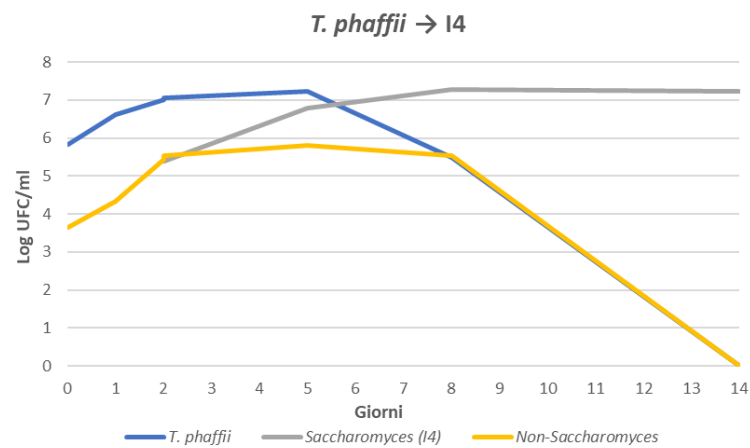


Fig. 21a: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione *T. phaffii* e I4

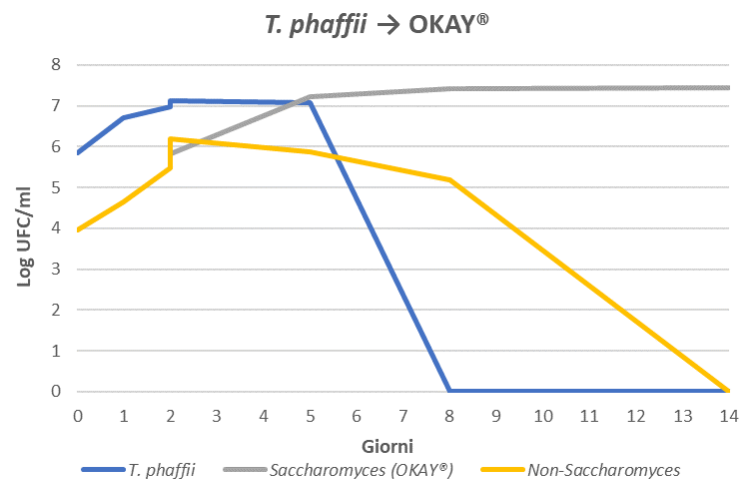


Fig. 21b: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione *T. phaffii* e OKAY®

Per quanto riguarda *M. pulcherrima*, invece, questo lievito ha mostrato un buon effetto di controllo dei ceppi non-*Saccharomyces* fino al 2° giorno. Questi poi hanno un leggero aumento fino al 6° giorno, per poi diminuire rapidamente fino ad azzerarsi all'8° giorno. L'efficacia di biocontrollo di *M. pulcherrima* è stata identica in micro-fermentazione sequenziale sia con I4 che con Lalvin ICV OKAY®, quindi l'azione antimicrobica di *M. pulcherrima* è stata efficace con entrambi gli starter e l'ha portata a predominare sugli altri non-*Saccharomyces* (Fig.22a,b).

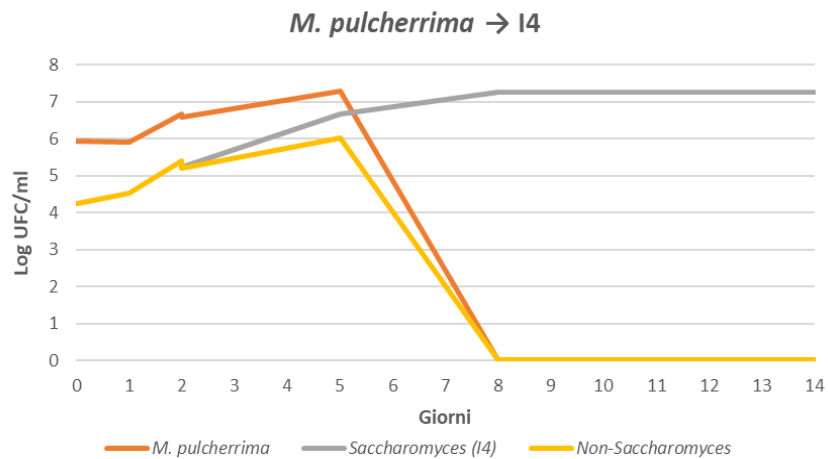


Fig. 22a: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione *M. pulcherrima* e I4

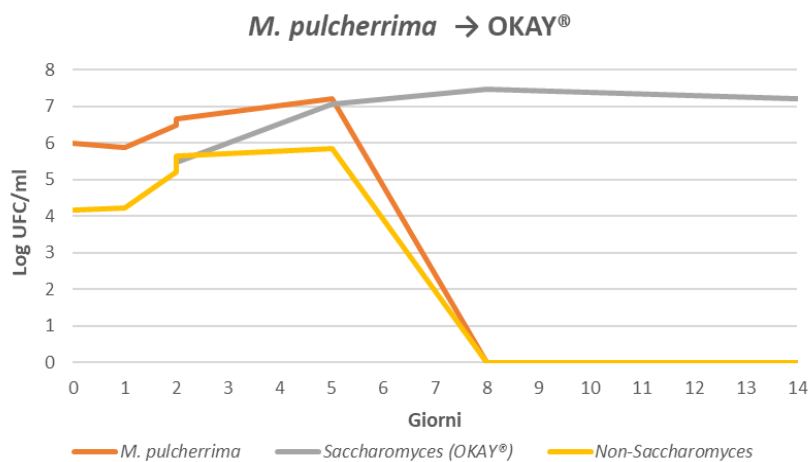


Fig. 22b: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione *M. pulcherrima* e OKAY®

Nelle micro-fermentazioni miste con *T. phaffii* e *M. pulcherrima* (ratio 1:1), è stato riscontrato un biocontrollo sui non-*Saccharomyces* paragonabile a quello delle tesi con solo *M. pulcherrima*. Infatti, *T. phaffii* ha avuto una scarsa azione inibente, e non ha aiutato il biocontrollo di *M. pulcherrima*. Quindi, non c'è stato un effetto sinergico tra i due lieviti, né con I4 né con OKAY®, e *M. pulcherrima* ha mostrato un effetto dominante su *T. phaffii* (Fig.23a,b).

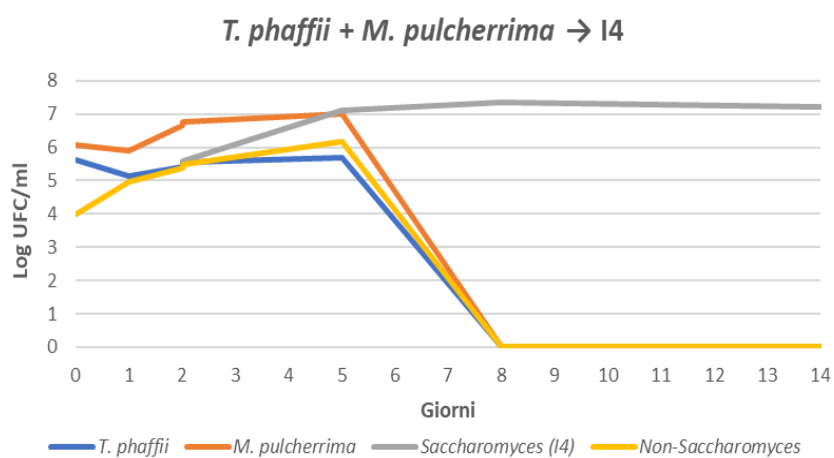


Fig. 23a: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione mista *T. phaffii*, *M. pulcherrima* e I4

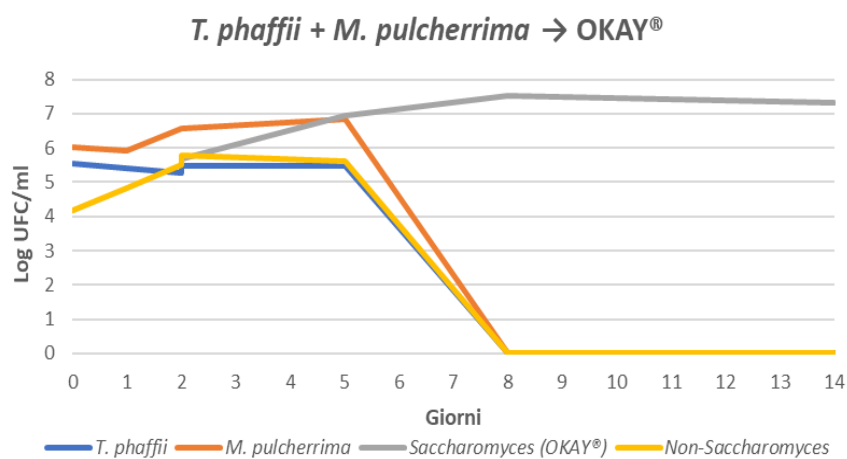


Fig. 23b: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione mista *T. phaffii*, *M. pulcherrima* e OKAY®

Inoltre, in tutte le micro-fermentazioni sequenziali sia I4 che OKAY® non sono stati inibiti dalla presenza dei lieviti bioattivi/killer.

Dunque i risultati migliori sono stati ottenuti nella micro-fermentazione sequenziale di *M.pulcherrima*, con I4, che ha avuto una buona performance fermentativa e una riduzione dei lieviti deterioranti presenti nel succo d'uva naturale.

#### 4.2.3 Valutazione dell'acidità volatile

Dall'analisi a fine fermentazione tutte le tesi hanno avuto dei valori bassi di acidità volatile, tra 0,22 e 0,28 g/L, che rientrano nella norma. Il controllo negativo, in linea con quanto atteso, ha mostrato un valore maggiore rispetto alle altre tesi, dovuto alla presenza di lieviti apiculati, grandi produttori di acido acetico (Fig.24).

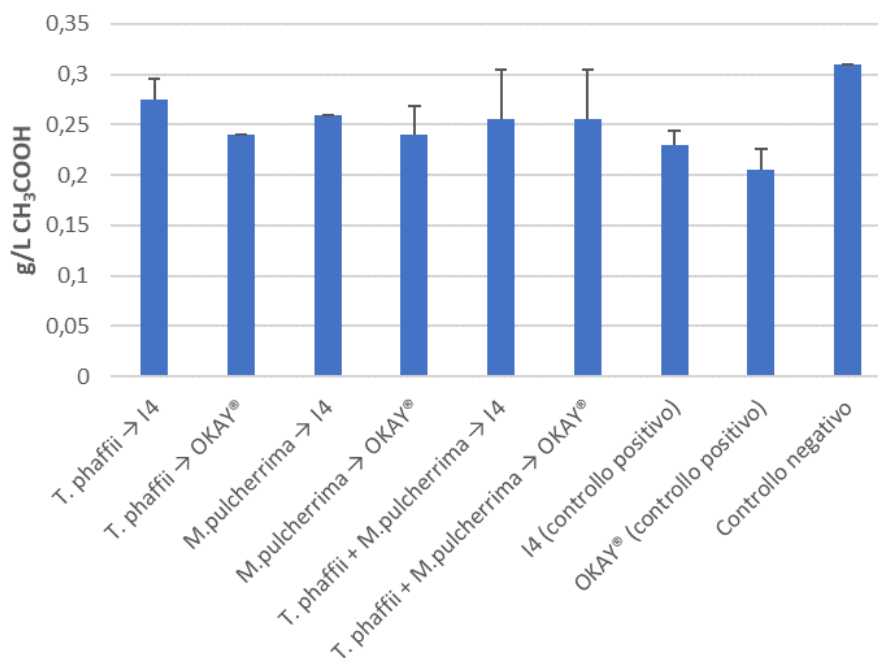


Fig.24: Acidità volatile dei campioni della prima prova di micro-fermentazione



### ***4.3 Valutazione dell'efficacia di *Torulaspora delbrueckii* nel miglioramento del profilo aromatico del vino finale, in micro-fermentazione mista sequenziale***

Stabilita l'efficacia antimicrobica di *M. pulcherrima* (in micro-fermentazione sequenziale con I4) come lievito bioattivo sugli spoilage nel mosto, è stata valutata la possibile azione di incremento del profilo aromatico del vino finale, mediante micro-fermentazioni con *M. pulcherrima* in fermentazione sequenziale con I4, e in fermentazione mista insieme a *Torulaspora delbrueckii*, in rapporto 1:1.

È noto in letteratura che *M. pulcherrima*, oltre all'attività antimicrobica, ha anche un'azione aromatica, aumentando la concentrazione di composti fruttati e floreali nel vino finale (Ruiz et al., 2018; Canonico et al., 2019).

*T. delbrueckii*, invece, è un lievito che non ha attività di biocontrollo, ma è noto in letteratura come lievito aromatico, in quanto porta ad un incremento del flavour sia nel vino che nella birra (Azzolini et al., 2012; Canonico et al., 2016).

Si è voluto quindi verificare il possibile effetto sinergico tra *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* sotto il profilo aromatico, per poter ottenere un vino finale biologico a bassa solforosa, che sia gradevole e con buone caratteristiche aromatiche.

#### ***4.3.1 Valutazione dell'andamento fermentativo***

I lieviti *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* in micro-fermentazione mista non hanno influito negativamente sull'andamento fermentativo. Tutte le micro-fermentazioni, compreso il controllo positivo I4, hanno avuto un andamento nella norma (Fig.25).

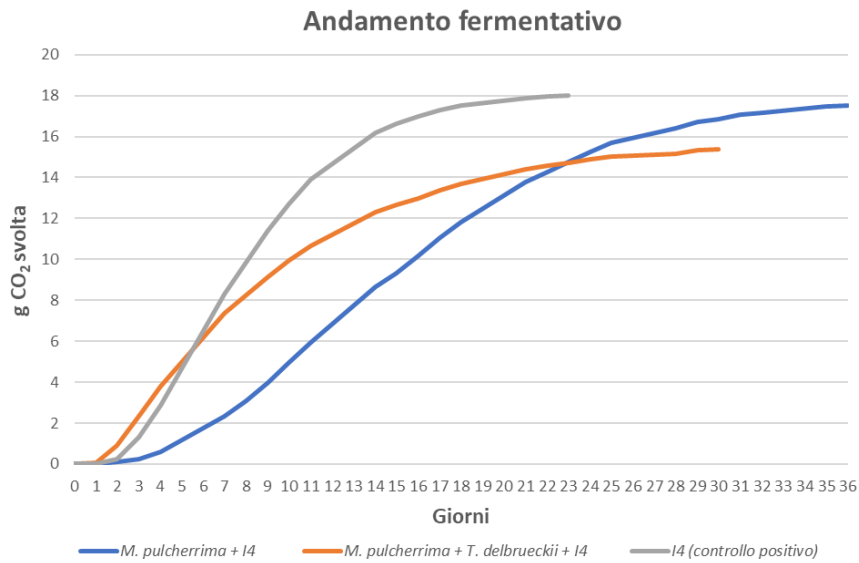


Fig.25: Cinetica fermentativa della seconda prova di micro-fermentazione

#### 4.3.2 Monitoraggio della popolazione microbica durante le micro-fermentazioni

Il monitoraggio dei ceppi di lievito durante le micro-fermentazioni è stato effettuato mediante conta vitale su piastra.

Il lievito *M. pulcherrima* in micro-fermentazione sequenziale con I4 non ha inibito lo starter fermentativo (Fig.26a).

Anche nelle fermentazioni miste, *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii*, con I4 come starter fermentativo, non hanno avuto un'azione inibente su I4 e i lieviti non hanno interferito tra loro (Fig.26b).

Infatti I4 ha avuto una crescita simile sia nelle micro-fermentazioni sequenziali, sia nella fermentazione in purezza (controllo positivo; Fig.26c).

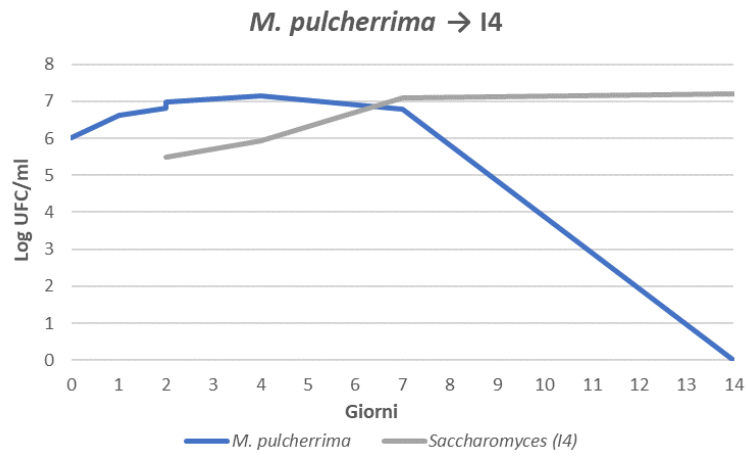


Fig.26a: evoluzione della popolazione microbica, micro-fermentazione M. pulcherrima e I4

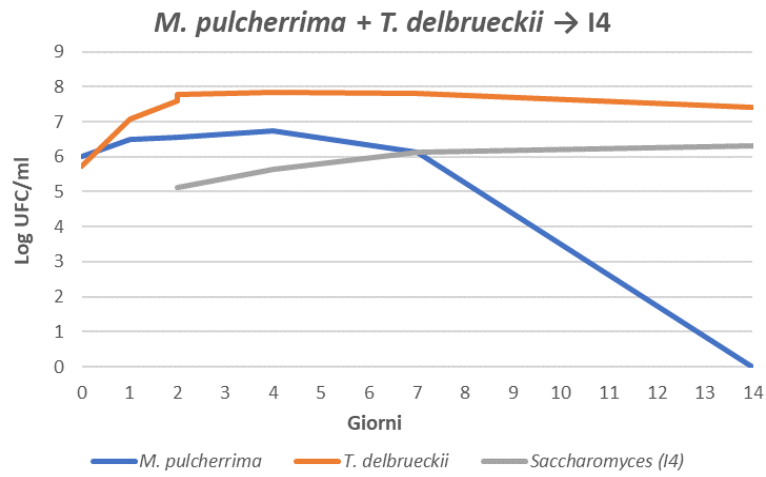


Fig.26b: evoluzione popolazione microbica, micro-fermentazione mista M. pulcherrima, T. delbrueckii e I4

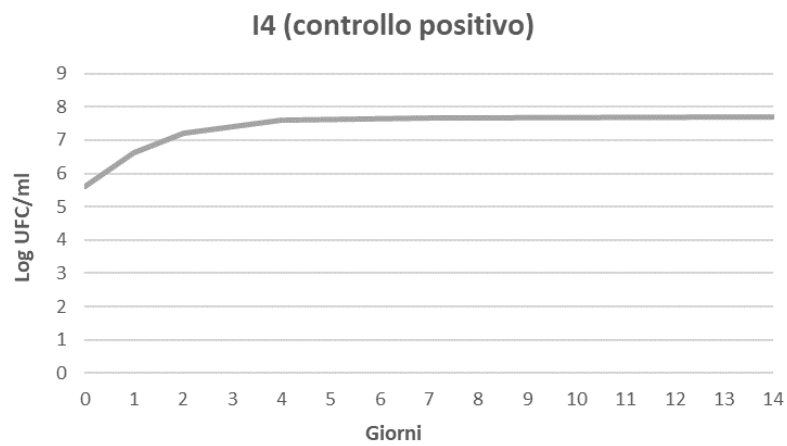


Fig.26c: evoluzione della popolazione microbica, micro-fermentazione I4

### 4.3.3 Valutazione dell'acidità volatile e analisi dei composti volatili

Al termine delle fermentazioni tutti i campioni sono stati sottoposti alla determinazione dell'acidità volatile e all'analisi dei principali composti volatili aromatici.

Per l'acidità volatile, espressa in g/l di acido acetico, sono stati ottenuti valori nella norma per il controllo positivo (I4). La presenza di *M. pulcherrima*, in fermentazione sequenziale con I4, ha portato ad un significativo abbassamento del valore di acidità volatile, che è stato ancora maggiore nella fermentazione mista con *T. delbrueckii* (Fig.27).

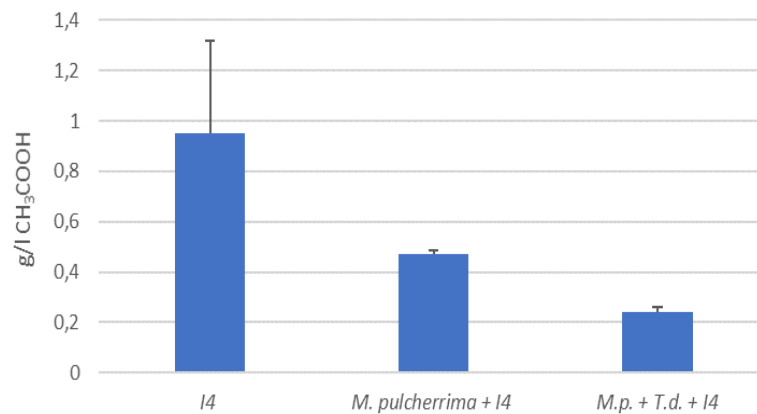


Fig.27: Acidità volatile

Per quanto riguarda invece l'analisi dei composti volatili, per la valutazione dell'impronta aromatica, è stata effettuata al Gas-cromatografo.

*M. pulcherrima*, in micro-fermentazione sequenziale con I4, ha avuto uno scarso effetto di incremento aromatico, mentre c'è stato un notevole incremento nella micro-fermentazione mista con *T. delbrueckii* (con I4). In quest'ultima sono stati rilevati composti volatili a concentrazioni molto più elevate rispetto alle altre fermentazioni,

soprattutto per il 2-feniletanolo (aroma di rosa), l'acetato di isoamile (bouquet di banana), l'etilbutirrato e l'etilesanoato. Inoltre *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* hanno regolato le concentrazioni di altri composti, come linalolo e geraniolo (aroma floreale) (Fig.28).

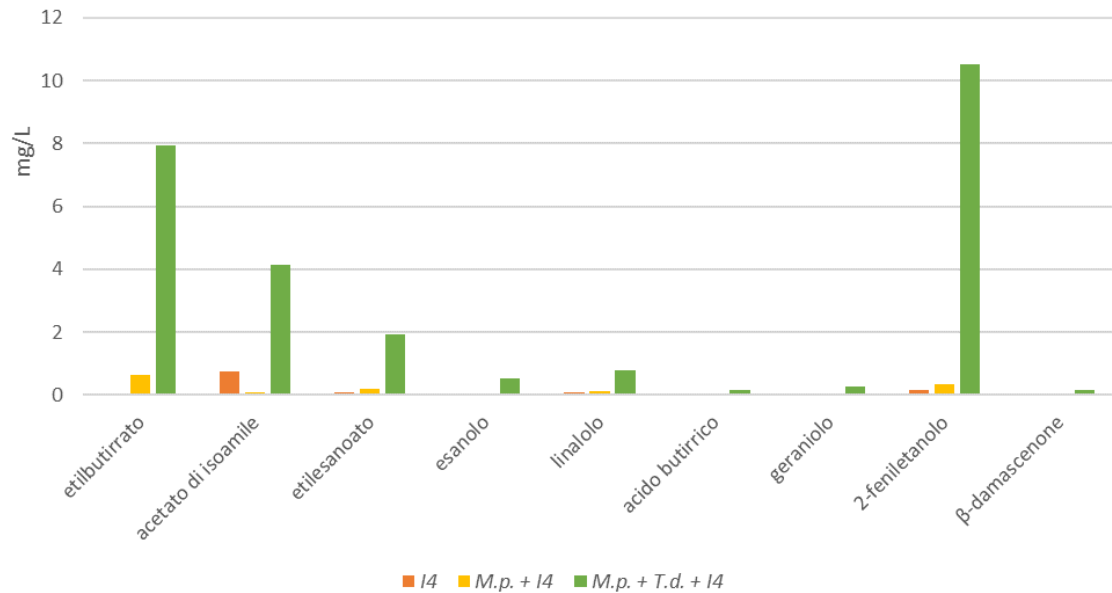


Fig.28: Analisi dei composti volatili aromatici

Questo testimonia un effetto sinergico tra *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* riguardo la capacità di incremento del profilo aromatico.

## Capitolo quinto

### CONCLUSIONI

Per produrre un vino biologico di alta qualità è necessario partire da un mosto di qualità e, quindi, utilizzare uve non danneggiate con lo scopo di limitare la presenza di microrganismi deterioranti, che possono persistere nel processo di vinificazione e conferire al vino odori e/o sapori sgraditi. Solitamente per ovviare a questo problema vengono utilizzati pesticidi e composti chimici ad azione antimicrobica.

In questo studio è stato proposto l'impiego di lieviti bioattivi di tipo non-*Saccharomyces* per il controllo della proliferazione di microrganismi alterativi, sia in campo che durante la fermentazione in cantina, come strategia alternativa all'uso di prodotti chimici di sintesi.

In vigneto sono stati testati i lieviti bioattivi *A. pullulans* e *M. pulcherrima*, impiegati come fito-trattamenti sulle piante, per controllare l'infezione da *B. cinerea*. Da valutazioni in post-raccolta e in campo è emerso che la miscela di *A. pullulans* e *M. pulcherrima* (tesi Mix) ha avuto la migliore efficacia sul controllo dell'infezione di *Botrytis cinerea*. Questo trattamento in vigna permette quindi di poter ottenere uve di alta qualità all'arrivo in cantina.

È stato poi testato l'utilizzo di lieviti bioattivi per il controllo degli spoilage nel mosto durante la fermentazione, in alternativa all'impiego di anidride solforosa, per la produzione di vino Verdicchio biologico. Sono stati utilizzati i lieviti *M. pulcherrima*, già impiegata ed efficace in vigna, e un ceppo killer della specie *T. phaffii* in micro-fermentazioni sequenziali, con I4 (*S. cerevisiae* nativo) e Lalvin ICV OKAY® (starter commerciale) come starter per le fermentazioni.

I risultati hanno mostrato che nelle micro-fermentazioni sequenziali (sia con OKAY® che con I4), *T. phaffii* ha avuto una scarsa efficacia contro i lieviti apiculati, mentre *M. pulcherrima*, ha mostrato un'efficace biocontrollo sui lieviti alterativi. *M. pulcherrima* e *T. phaffii*, in micro-fermentazione mista, non hanno avuto un effetto sinergico tra loro: *T. phaffii* ha mostrato una scarsa attività di biocontrollo mentre *M. pulcherrima* ha avuto un'azione antimicrobica sui lieviti apiculati e ha dominato anche su *T. phaffii*. Quindi, i migliori risultati di biocontrollo sono stati ottenuti da *M. pulcherrima* in fermentazione sequenziale con I4.

Infine, è stata valutata la possibile azione di incremento del profilo aromatico, nel vino Verdicchio biologico, mediante micro-fermentazioni miste di *M. pulcherrima* e *Torulaspora delbrueckii*, con I4 come starter fermentativo. L'analisi delle componenti volatili ha mostrato un incremento delle concentrazioni di  $\beta$ -feniletanolo (aroma di rosa), acetato di isoamile (bouquet di banana), etilbutirrato ed etilesanoato, e una limitazione delle concentrazioni di altri composti come linalolo e geraniolo. Inoltre è stata evidente una diminuzione significativa dell'acidità volatile nella fermentazione mista di *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii*.

Quindi i risultati hanno evidenziato il contributo positivo di *M. pulcherrima* come agente di biocontrollo, sia in campo, sia in fermentazioni sequenziali con *S. cerevisiae*, e l'importante ruolo di *T. delbrueckii* nell'ottenere vini con maggiore complessità aromatica. Pertanto, l'uso di *M. pulcherrima* in combinazione con *T. delbrueckii* potrebbe essere una strategia naturale idonea per ottenere un vino biologico di alta qualità, diminuendo la concentrazione di anidride solforosa.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Agarbati, A., Canonico, L., Mancabelli, L., Milani, C., Ventura, M., Ciani, M., & Comitini, F. (2019). *The influence of fungicide treatments on mycobiota of grapes and its evolution during fermentation evaluated by metagenomic and culture-dependent methods*. *Microorganisms*, 7(5), 114.
- Agarbati, A., Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2020). *Reduction of sulfur compounds through genetic improvement of native *Saccharomyces cerevisiae* useful for organic and sulfite-free wine*. *Foods*, 9(5), 658.
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., & Zapparoli, G. (2012). *Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine*. *European Food Research and Technology*, 235(2), 303-313.
- Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., & Loureiro, V. (2008). *Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts*. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1008-1017.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). *The microbial ecology of wine grape berries*. *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D. (2018). *The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector*. *Fermentation*, 4(4), 85.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). **Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content*. *Food Microbiology*, 56, 45-51.
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2019). **Metschnikowia pulcherrima* selected strain for ethanol reduction in wine: Influence of cell immobilization and aeration condition*. *Foods*, 8(9), 378.
- Carboni, G., Marova, I., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., & Mannazzu, I. (2021). *Evaluation of Recombinant Kpkt Cytotoxicity on HaCaT Cells: Further Steps towards the Biotechnological Exploitation Yeast Killer Toxins*. *Foods*, 10(3), 556.
- Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). *Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*. *International journal of food microbiology*, 108(2), 239-245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). *Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking*. *FEMS yeast research*, 10(2), 123-133.



- Comitini, F., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2009). *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific  $\beta$ -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories*, 8, 55.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. (2009). *Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?*. *Postharvest biology and technology*, 52(2), 137-145.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). *The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products*. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). *Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?*. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 711-717.
- Elmer, P. A. G., & Reglinski, T. (2006). *Biosuppression of Botrytis cinerea in grapes*. *Plant Pathology*, 55(2), 155-177.
- Fillinger, S., & Walker, A. S. (2016). *Chemical control and resistance management of Botrytis diseases*. In: "*Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*" (pp. 189-216). Springer, Cham.
- Gény, L., Darrieumerlou, A., & Donèche, B. (2003). *Conjugated polyamines and hydroxycinnamic acids in grape berries during Botrytis cinerea disease development: differences between 'noble rot' and 'grey mould'*. *Australian journal of grape and wine research*, 9(2), 102-106.
- Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., & Kačániová, M. (2021). *Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by Metschnikowia pulcherrima against various yeast species*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 282-285.
- Martini, A. (1993). *Origin and domestication of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine research*, 4(3), 165-176.
- Milanović, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). *Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments*. *International journal of food microbiology*, 161(3), 240-246.
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J. M., Bañuelos, M. A., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). *Applications of Metschnikowia pulcherrima in wine biotechnology*. *Fermentation*, 5(3), 63.
- Morgan, H. H., Du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). *The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 820.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). *Antimicrobial activity of Metschnikowia pulcherrima on wine yeasts*. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1209-1217.
- Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T., & Hess, M. (2015). *Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes*. *Frontiers in microbiology*, 6, 809.

**Regolamento (UE) 2018/848 del Parlamento europeo e del Consiglio**, del 30 maggio 2018, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio (GU L 150, del 14.6.2018, pag. 1).

**Regolamento di esecuzione (UE) 2021/1165 della Commissione**, del 15 luglio 2021, che autorizza l'utilizzo di taluni prodotti e sostanze nella produzione biologica e stabilisce i relativi elenchi (GU L 253, del 16.7.2021, p. 13–48).

Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., ... & Benito, S. (2018). *Analytical impact of Metschnikowia pulcherrima in the volatile profile of Verdejo white wines*. Applied microbiology and biotechnology, 102(19), 8501-8509.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., & Droby, S. (1999). *Genetic diversity and biocontrol activity of Aureobasidium pullulans isolates against postharvest rots*. Postharvest Biology and Technology, 17(3), 189-199, ISSN 0925-5214.

Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U. C., & Bauer, F. (2012). *The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map*. PLoS One, 7(12), e52609.

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review*. Biological control, 50(3), 205-221.

Thambugala, K. M., Ariyawansa, H. A., Li, Y. M., Boonmee, S., Hongsanan, S., Tian, Q., ... & Hyde, K. D. (2014). *Dothideales*. Fungal Diversity, 68(1), 105-158.

Vannini, A., & Chilosi, G. (2013). *Botrytis infection: grey mould and noble rot*. In: "Sweet, Reinforced and fortified wines: grape biochemistry, technology and vinification", 159-169.

Vercesi, P., Cortesi, F., Zerbetto, A. (1991). *"Biologia ed epidemiologia di Botrytis cinerea Pers. su vite."*

*"Bollettino di legislazione vitivinicola N. 30, Gennaio-Marzo2018"* [www.aivv.it](http://www.aivv.it) - Accademia Italiana della Vite e del Vino.

[www.imtdoc.it](http://www.imtdoc.it) - Istituto Marchigiano di Tutela Vini.

[www.politicheagricole.it](http://www.politicheagricole.it) - Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali.

[www.vinaly.com](http://www.vinaly.com)

## **RINGRAZIAMENTI**

*Per l'elaborazione di questa tesi devo ringraziare, innanzitutto, la relatrice, professoressa Francesca Comitini, il professor Maurizio Ciani e tutto il team del Dipartimento perché tutto quello che ho imparato, sul piano pratico e personale, lo devo a loro. Ringrazio il correlatore, Edoardo, per avermi seguito, supportato ed aiutato nello svolgimento e nel percorso di tesi. Ringrazio Alice e Laura per avermi insegnato da subito come lavorare in autonomia in laboratorio e per essere state sempre, in ogni momento, un punto di riferimento, per me e per tutti; ringrazio inoltre Enrica per il preziosissimo aiuto, soprattutto nei miei tentativi di analisi molecolari.*

*Ringrazio tutti i tesisti che ho incontrato, con i quali ho condiviso ansie, problemi, ma anche risate e tante pause pranzo.*

*Un ringraziamento speciale a Tania, mia collega sin dall'inizio del mio percorso, ed ancora adesso, dopo anni, presente per la fine di questo percorso. Non potevo sperare in una collega di tesi e compagna, di avventure e sventure, migliore! Indimenticabili i nostri viaggi in Panda verso il vigneto e le corse alla stazione per non farle perdere il treno! Siamo riuscite, sin da subito, ad essere complici, bilanciando le ansie di una con la calma dell'altra, come se ci conoscessimo da sempre!*

*Grazie a mia sorella gemella Elisabetta, compagna di vita, e alle mie amiche Teresa e Valentina. Ci siete sempre state, comprendendomi ed aiutandomi nei momenti difficili e portandomi a cena fuori, per rilassarci insieme. So che ci siete e ci sarete sempre, e questo è reciproco! Grazie infine a tutta la mia famiglia, che è sempre stata presente e mi ha aiutato, ad oggi anche da lassù!*