



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

DOTTORATO DI RICERCA IN :  
Viticultura Enologia e Marketing delle imprese vitivinicole  
CICLO XX

## ASPETTI MICROBIOLOGICI LEGATI ALLE PRODUZIONI ENOLOGICHE DEI TERRITORI DELLE D.O.C. DI CONEGLIANO

**Coordinatore** : Prof. Giorgio Ponchia

**Supervisore** : Prof. Viviana Corich

**Dottoranda** : Elena De Bortoli

31 gennaio 2008

## ABSTRACT

With the aim of isolating autochthonous yeasts, 411 samples of grape, coming from the Prosecco DOC area, were picked up during 2004-2005 vintage and small scale fermentations were performed.

All the isolates were the subjected to a *ad-hoc* developed genetic analysis, based on multiplex PCR, to identify yeasts belonging to the *Saccharomyces sensu stricto* group, that is known to include all species with relevant enological properties. A total of 659 isolates were therefore rapidly screened and 308, coming from 31 fermented samples out of 354, were identified as *Saccharomyces sensu stricto*. DNA from these isolates was further analysed to attain strain-specific characterization and mitochondrial DNA restriction analysis was used to highlight the genetic polymorphism of the isolates.

Computer-assisted analysis on similarities of electrophoretic profiles allowed the grouping of the isolates into 38 different clusters.

After phenotypic characterization of the 308 isolates, *Saccharomyces cerevisiae* strains showing interesting enological properties were chosen. In this study, the 66 selected strains were subjected to analyses concerning ethanol resistance, sulphite tolerance and glycosidase activity.

Resistance to ethanol was investigated using a plate test, sulphite tolerance was studied by growing cultures into a synthetic grape must mimicking enological conditions and  $\beta$ -glucosidase activity was detected with a fluorimetric method.

The fermentation attitude of the best performing strain was tested during pilot-scale vinifications.

## RIASSUNTO

In questo lavoro è stato effettuato un capillare campionamento di uve in vigneto durante le vendemmie del 2004 e del 2005 che ha coinvolto tutto il territorio compreso nella DOC Conegliano Valdobbiadene. Ogni grappolo raccolto è stato utilizzato per avviare fermentazioni spontanee con lo scopo di isolare lieviti appartenenti al gruppo di maggiore rilevanza tecnologica *Saccharomyces sensu stricto*. Mediante metodi convenzionali (uso di specifici terreni di crescita) sono stati raccolti 659 lieviti autoctoni. Questi, successivamente sono stati sottoposti ad un'indagine molecolare, (*multiplex* PCR) la quale ha permesso di identificare, tra i lieviti isolati, 308 individui appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. Questi ultimi sono stati sottoposti ad un'ulteriore caratterizzazione genetica, mediante l'analisi di restrizione del DNA mitocondriale, che ha permesso di individuare la presenza di 38 ceppi di lievito diversi. Ulteriori indagini molecolari come analisi dei microsatelliti e delle sequenze interdelta ci hanno permesso di rilevare in alcuni casi differenze a livello di DNA nucleare tra gli isolati con lo stesso profilo del DNA mitocondriale.

Inoltre prove di crescita in mosto sintetico e mosto di uve Prosecco hanno permesso la valutazione dei principali caratteri tecnologici degli lieviti isolati (vigore fermentativo, produzione di schiuma, adesività) e di qualità (produzione di idrogeno solforato).

Per un numero più ristretto di isolati (66) si è proceduto anche all'analisi di altri alcuni caratteri, in particolare sono state messe a punto e applicate metodiche per la determinazione del livello di resistenza all'etanolo e all'anidride solforosa. Inoltre è stata valutata, mediante l'utilizzo di un metodo basato sulla rilevazione di un segnale fluorescente, l'attività  $\beta$ -glucosidasica di ciascun ceppo con lo scopo di stabilire l'eventuale effetto del lievito sulla produzione di aromi primari durante il processo di vinificazione.

Infine le performance enologiche dei ceppi migliori sono state verificate mediante prove di microvinificazione.

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Prosecco.....	3
1.1.1 Territorio.....	3
1.1.2 Ampelografia del Prosecco.....	5
1.1.3 Caratteristiche dell’uva.....	6
1.1.4 Vinificazione del Prosecco.....	7
1.1.5 Le tipologie del Prosecco.....	10
1.1.6 Mercato del Prosecco DOC.....	10
1.2 Caratteristiche dei lieviti vinari.....	12
1.2.1 Caratteristiche generali.....	12
1.2.2 Classificazione.....	13
1.2.2.1 Il gruppo <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	14
1.2.3 Caratteristiche genomiche.....	16
1.2.4 Metabolismo.....	18
1.2.4.1 Metabolismo energetico.....	18
1.2.4.2 Gli aromi secondari.....	19
1.2.4.3 Gli alcoli superiori.....	20
1.2.4.4 Gli esteri.....	23
1.2.4.5 Il lievito e gli aromi varietali o primari .....	23
1.3 Ecologia e selezione dei lieviti vinari.....	24
1.3.1 Origine dei lieviti vinari.....	24
1.3.2 Fermentazione spontanea e fermentazione in purezza.....	29
1.3.3 Lieviti selezionati in enologia.....	31
1.4 Criteri e strategie di selezione applicate ai lieviti enologici.....	34
1.4.1 selezione clonale.....	35
1.4.2 selezione di lieviti ecotipici.....	36
1.4.3 miglioramento genetico dei lieviti.....	37
<b>2. CAMPIONAMENTO E INDAGINI GENETICHE.....</b>	<b>41</b>
2.1 Introduzione.....	43
2.2. Materiali e metodi.....	50
2.2.1 Ceppi di lievito.....	50
2.2.2 Mezzi colturali e condizioni di crescita.....	50
2.2.3 Campionamento e isolamento di lieviti da vigneto.....	51
2.2.3.1 Campionamento.....	51
2.2.3.2 Isolamento.....	52
2.2.3.3 Purificazione e conservazione degli isolati.....	53
2.2.4 Amplificazione di acidi nucleici.....	53
2.2.4.1 Identificazione di <i>Saccharomyces sensu stricto</i> (Multiplex PCR).....	53
2.2.4.2 Condizioni di amplificazione della regione ITS1-5,8S-ITS2 del rDNA.....	54
2.2.4.3 Condizioni di amplificazione delle regioni interdelta.....	55
2.2.4.4 Condizioni di amplificazione delle regioni micro satellite.....	56
2.2.5 Restrizione dei prodotti di amplificazione.....	57
2.2.6 Analisi del DNA mitocondriale.....	58
2.2.6.1 Estrazione del DNA totale.....	58

2.2.6.2	Restrizione del DNA totale.....	58
2.2.7	Elettroforesi di acidi nucleici su gel di agarosio.....	59
2.2.7.1	Analisi dei profili elettroforetici.....	59
2.3.	Risultati.....	60
2.3.1	Campionamento.....	60
2.3.1.1	La raccolta dei grappoli in relazione alla localizzazione geografica.....	61
2.3.1.2	Trattamento dei campioni e isolamento di <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	63
2.3.1.3	Distribuzione geografica dei campioni contenenti <i>S. sensu stricto</i> .....	67
2.3.2	Caratterizzazione ceppo specifica di <i>S. sensu stricto</i> .....	68
2.3.2.1	Analisi di restrizione del DNA mitocondriale.....	68
2.3.2.2	PCR delle regioni interdelta.....	73
2.3.2.3	PCR regioni microsatellite.....	74
2.3.2.4	Identificazione di specie.....	78
<b>2</b>	<b>CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA E DI QUALITA'</b> .....	<b>81</b>
3.1	Introduzione.....	83
3.1.1	Principali caratteri tecnologici.....	83
3.1.2	Principali caratteri di qualità.....	88
3.2	Materiali e metodi.....	96
3.2.1	Ceppi di lievito.....	96
3.2.2	Mezzi culturali e condizioni di crescita.....	96
3.2.2.1	Mezzi di propagazione ordinaria.....	96
3.2.2.2	Mezzi per la determinazione dei caratteri fenotipici dei lieviti.....	97
3.2.3	Prove di fermentazione in mezzo nutritivo sintetico e in mosto naturale.....	99
3.2.3.1	Preparazione di inoculi per prove di fermentazione su mosto sintetico.....	99
3.2.3.2	Preparazione di inoculi per prove di fermentazione su mosto d'uva prosecco.....	99
3.2.3.3	Monitoraggio del calo in peso delle beute.....	99
3.2.3.4	Valutazione del potere schiumogeno.....	99
3.2.3.5	Valutazione della rapidità di sedimentazione.....	99
3.2.3.6	Adesività.....	99
3.2.4	Produzione di idrogeno solforato.....	100
3.2.5	Test di resistenza all'etanolo.....	100
3.2.5.1	Preparazione della brodo coltura.....	100
3.2.5.2	Allestimento del test.....	100
3.2.6	Test di resistenza all'anidride solforosa.....	100
3.2.6.1	Preparazione della brodo coltura.....	100
3.2.6.2	Allestimento del test.....	100
3.2.7	Test per la determinazione dell'attività B-Glucosidica.....	101
3.2.7.1	Condizioni di crescita dei ceppi di lievito.....	101
3.2.7.2	Inoculo.....	101
3.2.7.3	Preparazione delle soluzioni.....	102
3.2.7.4	Preparazione della curva di taratura.....	103
3.2.7.5	Preparazione dei campioni.....	103
3.2.7.6	Allestimento del test in microtiter.....	103

3.2.8 Degustazione.....	104
3.2.9 Analisi canonica discriminante.....	104
3.2.10 Microvinificazioni.....	105
3.2.10.1 Preparazioni inoculo.....	105
3.2.10.2 Microvinificazioni.....	106
3.2.10.3 Analisi chimiche.....	107
3.3 Risultati.....	108
3.3.1 Caratterizzazione fisiologica degli isolati appartenenti al gruppo <i>Saccharomyces sensu stricto</i> : crescita in mosto sintetico.....	108
3.3.2 Analisi canonica discriminante degli isolati <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	114
3.3.3 Caratterizzazione fisiologica in mosto di prosecco degli isolati scelti.....	120
3.3.4 Determinazione della resistenza all'etanolo.....	124
3.3.5 Determinazione della resistenza all'anidride solforosa.....	127
3.3.6 Determinazione dell'attività B-Glucosidasica.....	131
3.3.7 Microvinificazioni.....	136
<b>4 CONCLUSIONI.....</b>	<b>141</b>
<b>5 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>147</b>

## **1. Introduzione**



## 1.1 PROSECCO

### 1.1.1 Il territorio

L'Italia vanta un notevole patrimonio viticolo costituito da centinaia di varietà, 340 delle quali risultano iscritte al Catalogo Nazionale ed ammesse alla coltivazione. Molti di questi vitigni hanno avuto una diffusione molto scarsa, addirittura quasi inesistente, altri sono diventati famosi e costituiscono oggi la base della viticoltura italiana. Tra questi possiamo annoverare anche il Prosecco, che pur se rappresentato da una superficie coltivata modesta ha una posizione di rilievo tra i vitigni bianchi coltivati in Italia (Calò *et al.*, 2000).

Il Prosecco può fregiarsi di una varietà di denominazioni:

- DOC (Denominazione di Origine Controllata) di Conegliano e Valdobbiadene
- DOC del Montello e dei Colli Asolani
- VSAQ (Vino Spumante Aromatico di Qualità) per i vini prodotti con le uve Prosecco che provengono dal Veneto, Friuli Venezia Giulia e Trentino Alto Adige
- IGT (Indicazione Geografica Tipica) del Veneto per i vini prodotti con le uve Prosecco che provengono dal Veneto
- IGT della Marca Trevigiana: per i vini prodotti con le uve Prosecco che provengono dalla provincia di Treviso
- IGT dei Colli Trevigiani: per i vini prodotti con le uve Prosecco che provengono dall'area collinare della provincia di Treviso.

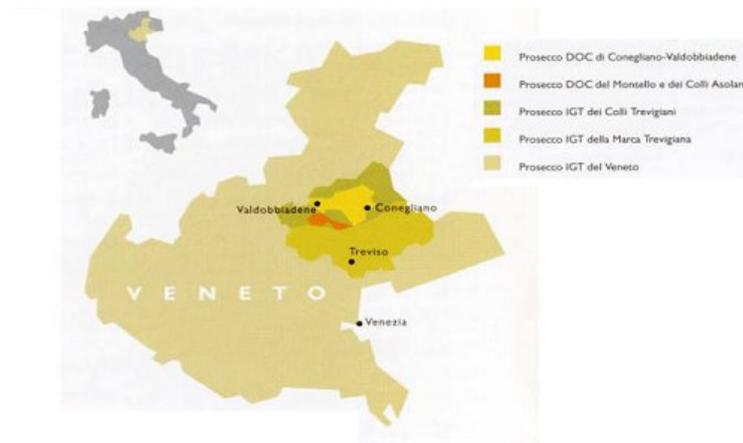
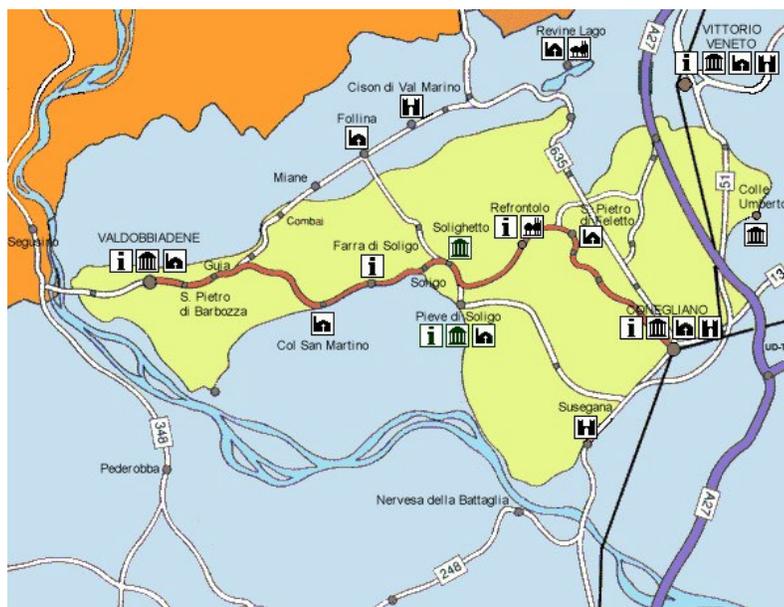


Fig. 1.1.1 Zona di produzione del Prosecco

L'area della DOC di Conegliano e Valdobbiadene comprende 15 comuni: Conegliano, Susegana, San Vendemiano, Colle Umberto, Vittorio Veneto, Cison di Valmarino, S. Pietro di Feletto, Refrontolo, Pieve di Soligo, Farra di Soligo, Miane, Vidor, Follina, Tarzo e Valdobbiadene, e si estende su circa 18000 ettari di superficie agricola. La superficie a vigneto DOC è di 4300 ha, di cui 105 ha relativi alla sottozona di produzione di Prosecco Superiore di Cartizze. I viticoltori iscritti all'Albo dei Vigneti sono stati nella vendemmia 2004 quasi 3100. Le aziende che eseguono la vinificazione sono 462 e quelle che procedono all'imbottigliamento del vino 149. Come si evince da questi pochi dati, il quadro produttivo complessivo è ricco di attori.



**Fig.1.1.2** Zona di coltivazione del Prosecco DOC di Conegliano e Valdobbiadene

### 1.1.2 Ampelografia del Prosecco

Le varietà di Prosecco presenti oggi nel territorio della DOC di Conegliano e Valdobbiadene sono il Prosecco Tondo e il Prosecco Lungo. Di seguito vengono riassunti e confrontati parametri ampelografici-ampelometrici

	<b>PROSECCO TONDO</b>	<b>PROSECCO LUNGO</b>
<b>Taglia</b>	5, 7-Media, grande	5-Media
<b>Lunghezza</b>	5, 7-Media, lunga	5-Media
<b>Compattezza</b>	3, 5-Spargolo, medio	5, 7-Medio, compatto
<b>Forma</b>	Piramidale-allungato (spesso alato)	Tronco-piramidale

**Tab.1.1.1** Caratteri ampelografici differenziali del grappolo del prosecco tondo e lungo (Calò et al., 2000)

	<b>PROSECCO TONDO</b>	<b>PROSECCO LUNGO</b>
<b>Groschezza</b>	3, 5-Piccola, media	5-Media
<b>Uniformità della groschezza</b>	1-Non uniforme	2-Uniforme
<b>Forma</b>	3-Sferica	4-Ellittica corta

**Tab.1.1.2** Caratteri ampelografici differenziali dell'acino del prosecco tondo e lungo (Calò et al., 2000)

I rilievi ampelografici hanno evidenziato l'esistenza di differenze significative relativamente a 22 caratteri fra i biotipi di Prosecco tondo e Prosecco lungo presenti nella DOC di Conegliano e Valdobbiadene. Il Prosecco lungo si differenzia dal Prosecco tondo essenzialmente per avere il germoglio un po' più peloso e più colorato, la foglia leggermente più grande, coriacea e con il seno peziolare meno chiuso, il grappolo leggermente più corto e l'acino di forma ellittica-corta anziché sferica.

L'elaborazione statistica dei valori ampelometrici conferma e rafforza le differenze tra i due vitigni. Si riportano in tabella 1.3 alcuni dati legati al grappolo e all'acino.

	PROSECCO TONDO	PROSECCO LUNGO
<b>Peso grappolo (gr)</b>	230-350	280-360
<b>Peso acino (gr)</b>	1,89-2,20	2,07-3,06
<b>Rapporto lunghezza – larghezza acino</b>	1,00-1,05	1,11-1,15

**Tab.1.1.3** Caratteri ampelometrici differenziali dell'acino del Prosecco tondo e lungo, valori medi (Calò et al., 2000).

Di seguito sono riportate le fotografie dei grappoli.



**Fig. 1.1.3** Prosecco tondo



**Fig. 1.1.4** Prosecco lungo

### 1.1.3 Caratteristiche dell'uva

In tabella 1.4 è riportata la composizione chimica media del succo d'uva di questa varietà.

ZUCCHERI (GLUCOSIO-FRUTTOSIO) (g/l)	pH	ACIDITÀ TOTALE (g/l)	ACIDO MALICO (g/l)	ACIDO TARTARICO (g/l)	APA* (mg/l)
150-240	3,1-3,4	7-9	3,5-4	4-4,5	150-210

**Tab. 1.1.4** Caratteristiche chimiche medie del succo d'uva di Prosecco. \*APA = \*azoto prontamente assimilabile

Caratteristica interessante dell'uva di Prosecco sono le sostanze aromatiche contenute nel grappolo. Recenti studi sulla caratterizzazione di questi composti hanno messo in luce differenze evidenti tra le citate varietà; nello specifico il Prosecco Tondo è quello più ricco di questi composti odorosi in particolare di linalolo, geraniolo, nerolo, trans e cis 8-idrossi linalolo e può essere considerato a tutti gli effetti un'uva aromatica. Mentre il Prosecco lungo pur avendo un alto tenore di geraniolo non lo è (Calò *et al.*, 2000).

#### **1.1.4 Vinificazione del Prosecco**

Ogni vinificazione è una sequenza di operazioni elementari, ciascuna deve essere compiuta con la scopo di facilitare la successiva.

Nell'elaborazione dei vini bianchi, l'estrazione dei mosti e la loro chiarificazione precedono sempre la fermentazione alcolica. E' l'assenza di macerazione durante la fase alcolica delle uve ammostate che distingue la vinificazione in bianco. Il gusto di questo vino dipende, dunque, in larga misura dalle condizioni nelle quali si svolgono le differenti operazioni prefermentative: raccolta, pigiatura, chiarificazione dei mosti (Ribéreau-Gayon, 2003).

In vigneto è assolutamente necessario assicurare la protezione dell'uva fino al giorno della **vendemmia**, ad esempio, contro gli attacchi di muffa grigia e di tignole che possono attaccare il grappolo.

Per la produzione del Prosecco DOC il Disciplinare di Produzione prevede che le uve debbano provenire da vigneti dell'area delimitata per legge, iscritti all'Albo della Camera di Commercio. Le varietà attualmente ammesse sono le uve di Prosecco (minimo 85%) e di Verdiso, Perera, Bianchetta e Prosecco Lungo (massimo del 15%).

Dal 30 giugno 2005 il disciplinare del Prosecco è stato modificato, ampliando il territorio della denominazione di origine, per l'esclusiva produzione delle varietà Pinot Nero, Pinot Bianco, Pinot Grigio e Chardonnay da destinare alla pratica correttiva dello spumante V.S.P.Q.R.D.

La **pressatura** viene fatta con macchine che agiscono sugli acini in modo soffice, così da estrarre solo il mosto fiore che proviene dal cuore dell'acino. Per il Prosecco, da Disciplinare, è ammesso che da 100 Kg di uva si possano ottenere al massimo 70 litri di vino.

Il mosto torbido viene lasciato riposare a 5-10°C in vasche di acciaio per 10-12 ore, la parte limpida del mosto viene separata dal deposito (**sfecchiatura**). Un'estrazione del mosto ben effettuata deve limitare i fenomeni di ossidazione mediante l'aggiunta di SO<sub>2</sub> che è in grado di sequestrare l'O<sub>2</sub> e salvaguardare così il colore e gli aromi del vino (Ribéreau-Gayon, 2003). Per legge nel vino bianco non può superare i 200 mg/l.

Da più di 20 anni la **fermentazione** è condotta sia da lieviti selezionati sottoforma di lieviti secchi attivi (LSA). L'inoculo dei lieviti secchi attivi si effettua in ragione di 10-15 g/hl, ovvero 10<sup>6</sup> cellule/ml di mosto. Le cellule sono preliminarmente attivate per una ventina di minuti in una miscela di acqua e mosto (1:1) a 40°C. Per il Prosecco la fermentazione prosegue per 15-20 giorni alla temperatura costante di 18-20°C (Ribéreau-Gayon, 2003).

Il processo tecnologico noto anche con il termine di **rifermentazione** (presa di spuma), consiste nel riavviare la fermentazione alcolica in una vasca a pressione controllata, l'autoclave, che non permettendo la fuoriuscita di CO<sub>2</sub>, la mantiene disciolta nel vino in modo da garantire, al momento dell'apertura della bottiglia, l'effervescenza tipica dello spumante. Il sistema di spumantizzazione ora descritto prende il nome di metodo Charmat o Martinotti differente dal metodo Classico che prevede la fase di rifermentazione direttamente in bottiglia. Prima di sottoporre il vino alla presa di spuma deve essere reso stabile sia dal punto di vista chimico-fisico che biologico. E' necessaria quindi una chiarificazione, per esempio con l'utilizzo di caseinato di potassio o bentonite, in grado di assicurare la stabilità proteica. Si procede poi alla refrigerazione alla temperatura di -4°C per alcuni giorni aggiungendo come coadiuvante per la precipitazione 40 g/hl di bitartrato di potassio micronizzato che funge da germe di cristallizzazione. Infine il vino verrà filtrato a 1 µm, con l'utilizzo di un filtro tangenziale e conservato attorno agli 8-10°C.

Generalmente il vino base ha una gradazione alcolica pari a 10,5-11° circa, con una acidità totale 6,5-7 g/l, un basso contenuto di acidità volatile 0,15 g/l e un contenuto di anidride solforosa non superiore a 40-60 mg/l circa.

Per la presa di spuma bisogna scegliere la quantità di zucchero, necessaria per riavviare la fermentazione alcolica, da aggiungere al prodotto e preparare la massa di lievito attivo scelto per l'inoculo. La pressione finale di un buon spumante, si

aggira attorno alle 5 atm. Per inoculare il lievito (anche se in forma liofilizzata) è necessario l'utilizzo di un *piéd de cuve* che ha lo scopo non di propagare il lievito quanto di adattarlo lentamente alla concentrazione d'alcol del vino base. Anche in questo caso si utilizzano lieviti secchi selezionati (10 g/hl), questi vengono reidratati in acqua alla temperatura di 40°C per 15 minuti con l'aggiunta di vino base e MCR (Mosto Concentrato e Rettificato) all'1%. Il giorno successivo al *piéd de cuve* viene aggiunto un volume uguale di vino base e ancora MCR. Questa operazione viene ripetuta fino a quando non si ottiene un volume di inoculo adatto alla massa totale di vino da spumantizzare. Di solito la preparazione del *piéd de cuve* dura 4 giorni e si considera conclusa quando si ha un quantitativo pari al 10% della massa totale di vino. Durante la preparazione del *piéd de cuve* si può ossigenare la massa per favorire la moltiplicazione cellulare ed aggiungere attivanti di fermentazione 10 g/hl a base di azoto. Dopo il quarto giorno si procede a caricare la massa nell'autoclave con all'interno il vino base già zuccherato. Il processo per il raggiungimento di 5 atm di pressione, si protrae per circa 10 giorni in questo periodo la temperatura viene mantenuta attorno ai 14-16°C. Nei primi giorni sono effettuate periodiche agitazioni dell'intera massa 10 volte al giorno per 15 minuti nei primi due e poi a scalare (De Rosa, 1964; 1993).

Il processo di **stabilizzazione** del vino spumante prevede che raggiunte le 5 atm di pressione la fermentazione viene bloccata portando la temperatura a -4°C, in tal modo viene bloccata l'attività dei lieviti. Dopo 20 giorni si procede al primo travaso con la separazione dello spumante dalle fecce, poi inizia la stabilizzazione tartarica con l'aggiunta circa 30 g/hl di bitartrato di potassio. Dopo 7-8 giorni lo spumante passa alla fase di **filtrazione** per eliminare gran parte delle cellule microbiche presenti allo scopo di diminuire la possibilità di rifermentazione indesiderate in bottiglia causate da lieviti o batteri (De Rosa, 1993).

Si procede poi alla solfitazione portando il livello di SO<sub>2</sub> pari a 110-120 mg/l e all'**imbottigliamento**. Quest'ultima operazione viene condotta sotto pressione e a una temperatura di 4°C e prevede l'uso di bottiglie più pesanti e resistenti viste le caratteristiche del prodotto (De Rosa, 1964;1993).

### 1.1.5 Le tipologie del Prosecco

Il Disciplinare di Produzione, impone alcune caratteristiche al vino, in particolare la acidità totale minima (5 g/l) e l'estratto secco minimo (15 g/l). Prevede inoltre una serie di tipologie di prodotto .

- **PROSECCO TRANQUILLO** (grado alcolico superiore a 10,5 %)
- **PROSECCO FRIZZANTE** (grado alcolico superiore a 10,5 %, pressione 1-2,5 atm)
- **PROSECCO SPUMANTE** (grado alcolico deve essere superiore a 11% e la pressione superiore alle 3 atm). Questo prodotto si presenta in due versioni *extra dry* e *brut*; il primo conserva dai 12 ai 20 g/l di zucchero, il secondo dagli 8 ai 15 g/l di zucchero.

- **PROSECCO SUPERIORE DI CARTIZZE**

Prende il nome dall'area geografica in cui è prodotto, Cartizze. Questo vino viene spumantizzato e prodotto nella versione *dry*, (residuo zuccherino 17-35 g/l), il grado alcolico deve essere superiore a 11,5% (Rorato, 2002).

Il Disciplinare di Produzione prevede anche la possibilità di produrre Prosecco superiore di Cartizze tranquillo e frizzante entrambi devono possedere un grado alcolico superiore a 11%.

### 1.1.6 Mercato del Prosecco DOC

Nello sviluppo dell'area un ruolo centrale è stato giocato da tre fattori: l'ambiente, l'uomo, e la presenza di centri di ricerca e formazione, primi fra tutti l'Istituto Sperimentale per la Viticoltura e la Scuola Enologica divenuta anche la sede di riferimento per gli studi universitari in Enologia e Viticoltura di tutta la regione.

Nell' area del Prosecco di Conegliano e Valdobbiadene si è sentita l'esigenza di "fare sistema", lavorando per il riconoscimento a Distretto Produttivo, grazie alla LR 8/03 della Regione Veneto. Nell'ottica di mantenersi ed accrescersi il Distretto del Prosecco DOC ha sentito l'esigenza di sviluppare azioni promozionali e di

istituire un Centro di Studi di Distretto con i compiti di analizzare, elaborare, interpretare l'evoluzioni territoriale e le prospettive dei mercati (Vettorello, 2005). Grazie all'attenta analisi del Centro di Studi di Distretto

DOC CONEGLIANO VALDOBBIADENE

2006

**Situazione generale:**

Anno di nascita della DOC	1969
Comuni compresi nella DOC	15
Superficie iscritta all'albo vigneti	4500 Ha
Superficie iscritta a "Superiore di Cartizze"	106,8 Ha
<i>Addetti nel settore dell'area DOC:</i>	
➤ n° viticoltori	2800
➤ n° vinificatori	460
➤ n° enologi	250
➤ n° addetti settore enologico	1500
Case spumantistiche	153

**Caratteristiche dell'annata:**

Bottiglie totali prodotte	49.200.000
Bottiglie di spumante prodotte	40.200.000
Bottiglie di spumante Superiore di Cartizze	1.300.000
Bottiglie di frizzante prodotte	8.500.000
Bottiglie di tranquillo	500.000
Bottiglie totali esportate	15.500.000
Bottiglie di spumante esportate	11.500.000
Valore del prodotto al consumo	Euro 330.000.000

**Tab 1.1.5** Le bottiglie esportate nel 2006 si attestavano sui 15,5 milioni di bottiglie, di cui 11,5 milioni di bottiglie di spumante. La stima del valore al consumo del prodotto per l'intera produzione risulta pari a 330 milioni di euro.

Grazie ai dati del Consorzio di Tutela DOC Conegliano Valdobbiadene si può riassumere brevemente la situazione odierna del Prosecco riferita alla situazione del mercato dell'annata solare 2006 (tabella 1.1.5). Il quadro complessivo della realtà produttiva evidenzia la presenza di più di 5000 operatori, ripartiti tra viticoltori, vignaioli, enologi, ed impiegati con diverse mansioni. La produzione per l'anno 2006 è di 49,2 milioni di bottiglie, di cui 40,2 milioni di spumante, pari all'81,5%. In questo ambito la produzione di Spumante superiore di Cartizze si attesta a 1,3 milioni di bottiglie. La produzione di frizzante risulta pari a 8,5 milioni di bottiglie, mentre quella del tranquillo a 500.000 bottiglie.

## **1.2 CARATTERISTICHE DEI LIEVITI VINARI**

### **1.2.1 Caratteristiche generali**

I lieviti unicellulari appartengono al gruppo dei funghi e si moltiplicano per gemmazione o scissione; hanno forma sferica, ovale o ellittica, spesso molto allungata; talvolta si presentano sotto forma di ife filamentose (pseudomicelio). Le loro dimensioni si aggirano sui 5-30  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 1-5  $\mu\text{m}$  di larghezza. I lieviti si riproducono per via vegetativa o per via sessuata; nel primo caso ci può essere gemmazione (polare o multilaterale) oppure scissione binaria. Quando invece le condizioni ambientali non sono ottimali, come nel caso di carenza di nutrienti, i lieviti vanno incontro ad un processo meiotico e formano un asco che contiene mediamente 4 ascospore, cellule aploidi in uno stato quiescente. In questo modo viene assicurata la sopravvivenza per tutto il periodo critico; solo a condizioni ottimali ristabilite, le cellule aploidi vengono rilasciate ed iniziano a moltiplicarsi finché due cellule con "mating type" diverso non si attraggono e si accoppiano.

In *Saccharomyces cerevisiae* sono stati identificati due mating type opposti,  $\alpha$  e **a**. Il riconoscimento avviene tramite specifiche molecole segnale diffusibili (fattori di accoppiamento) e recettori proteici di superficie. La cellula diploide che ne deriva, chiamata **a/ $\alpha$** , si riproduce per gemmazione e può formare spore in caso di necessità.

Proprio in base al tipo di processo riproduttivo questi organismi vengono suddivisi in due grandi gruppi: i lieviti sporigeni che si riproducono sessualmente e i lieviti asporigeni per i quali non è nota la riproduzione gamica.

### 1.2.2 Classificazione

Le classificazioni dei lieviti, fino al 1984 curate dagli autori olandesi, sono state precedute da monografie sui lieviti sporigeni e asporigeni (anni '30 e '40), successivamente raccolte nel volume “*The Yeast: a taxonomic study*” del 1952 a cura di Lodder e Kreger-van Rij. Sono seguite un'edizione del 1970 curata da Lodder, una revisione del 1984 aggiornata da Kreger-van Rij e l'ultima del 1998 di Kurtzman e Fell, in cui le specie riconosciute sono passate da 500 a 700 circa e i generi da 60 a 100.

La continua evoluzione della tassonomia determina la necessità di riconsiderare le classificazioni, quindi l'appartenenza all'una o all'altra classe non è definitivamente assegnata. I confini tra i vari generi sono stati più volte modificati inserendone di nuovi per poi tornare sulle posizioni originarie; il numero di specie si è alternativamente ampliato fino a diverse decine, per poi ridursi drasticamente. Di conseguenza, ci sono dei nomi di specie che sono stati riconosciuti, poi depennati, poi ricomparsi, talvolta anche come varietà di altri generi, oppure con un significato del tutto diverso dal precedente.

Anche quest'ultima classificazione pertanto, è da considerarsi provvisoria, soprattutto a livello di specie: alcune sono state assimilate con altre o soppresse, e ne sono state create di nuove.

Tutto questo è indubbiamente fonte di confusione per gli studiosi e i tecnici.

Attualmente i funghi costituiscono il Regno *Eumycotes* ripartito in 4 divisioni in base alla modalità di riproduzione sessuale:

I - *Mastigomycota*

II - *Zygomycota*

III - *Ascomycota*

IV - *Basidiomycota*

Nella classificazione di Kurtzman e Fell i lieviti si trovano sia fra gli Ascomiceti (con gameti racchiusi in un corpo fruttifero denominato asco) che fra i Basidiomiceti (con spore esterne al corpo fruttifero detto basidio). I lieviti asporigeni (anamorfici) fino al 1984 erano classificati fra i Deuteromiceti (funghi imperfetti, cioè privi di una fase sessuale nota) in attesa di un' adeguata

sistemazione. Il gruppo dei deuteromiceti è stato poi soppresso, ed i generi che lo componevano sono stati inseriti in parte fra gli ascomiceti in parte fra i basidiomiceti.

#### **1.2.2.2 Il gruppo *Saccharomyces sensu stricto***

I lieviti che sono in grado di trasformare in modo ottimale i mosti e che in genere dominano la microflora naturale quando è avviata la fermentazione alcolica, appartengono principalmente al genere *Saccharomyces*.

Questo genere, scarsamente rappresentato sulla bacca, comprende i lieviti più vigorosi e alcol-tolleranti, quelli che più di tutti meritano il nome di “fermenti alcolici”.

Nel corso degli ultimi anni il genere è stato oggetto di continue revisioni dal punto di vista tassonomico. Da circa trent'anni le specie vengono suddivise, in modo non formale, in due gruppi, i *Saccharomyces sensu lato* e i *Saccharomyces sensu stricto*.

Il primo è costituito da microrganismi con caratteristiche proprie del genere, ma che hanno habitat particolari e scarso vigore fermentativo. Il secondo da tutte quelle specie con elevato interesse tecnologico.

In particolare i lieviti appartenenti al gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* sono attualmente rappresentati da quattro specie distinguibili a due a due per i seguenti caratteri:

- *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* hanno capacità di svilupparsi oltre i 37°C, con temperatura ottimale superiore ai 30°C, e di trasportare attivamente il fruttosio. Essi non si sviluppano al di sotto dei 10°C.
- *S. bayanus* e *S. pastorianus* non sviluppano a 37°C, ma solo a temperature inferiori ai 30°C e mancano del trasporto attivo del fruttosio. Questi lieviti vengono anche denominati criotolleranti, essendo in grado di crescere fino ai 5-6°C (Zambonelli, 2003).

Le cellule vegetative sono tonde, ovali o cilindriche e si riproducono per gemmazione; esse possono formare pseudoife quasi mai settate. Gli aschi derivano direttamente dalle cellule vegetative, generalmente diploidi, mediante un processo meiotico.

Recentemente al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* sono state aggiunte altre tre specie: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* (Naumov *et al.*, 2000a). Questi lieviti sono simili agli altri per caratteristiche fenotipiche, in particolare la capacità

di fermentazione, e genotipiche. Sono stati isolati il primo in Brasile e gli altri in Giappone.

La classificazione odierna del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* è frutto di un lungo lavoro tassonomico che ha previsto grosse revisioni dovute al fatto che le 7 specie sono caratterizzate da elevate affinità genetiche. Recenti acquisizioni nel campo della genomica del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* hanno messo in evidenza considerevoli riarrangiamenti genetici avvenuti tra gli individui appartenenti alle 4 specie principali. Alcune delle specie esistenti, infatti, non sono altro che individui ibridi. In particolare il ceppo tipo *S. bayanus* NRRL Y-12624<sup>T</sup> sembra essere il prodotto di ibridazione ottenuto da *S. cerevisiae* e l'antico *S. uvarum* (Nguyen *et al.*, 2000); mentre *S. pastorianus* si è generato dalla fusione di *S. cerevisiae* con *S. bayanus* (Casaregola *et al.*, 2001). Questi fatti portano a pensare che il gruppo di *S. sensu stricto* debba essere considerato come un continuo di strutture genomiche piuttosto che un gruppo di specie separate (De Barros *et al.*, 2002).

#### ***Saccharomyces bayanus***

E' una specie la cui definizione è così complessa e contraddittoria da mettere in dubbio la sua stessa esistenza. Fino al 1984 la specie *cerevisiae* e *bayanus* var. *uvarum* erano considerate molto affini dal punto di vista tassonomico e differivano unicamente per la capacità del primo e l'incapacità del secondo di fermentare il galattosio; in realtà il loro significato tassonomico è attualmente cambiato.

Recentemente, dopo uno studio molecolare approfondito basato su analisi del cariotipo del *S. cerevisiae*, sulla struttura dell'rDNA e la cross-fertilità, è stata confermata la distinzione tra *S. bayanus* e *S. cerevisiae*, senza però escludere la possibilità che tra i due si possa verificare ibridizzazione (Naumov, 2000b).

*S. bayanus* var. *uvarum* è un ceppo criotollerante ed acidificante poiché produce alti livelli di acido succinico e malico.

#### ***Saccharomyces paradoxus***

Questo lievito è fenotipicamente molto simile al *S. cerevisiae*, forse tra le forme più diffuse in natura, ma scarsamente utilizzato in enologia.

#### ***Saccharomyces pastorianus***

E' una specie rappresentativa dei lieviti freddo-fermentanti isolata dalle birre Lager. Alcuni Autori dubitano della validità della specie ed ipotizzano che i ceppi ad essa appartenenti siano in realtà degli ibridi interspecifici naturali. A questo

lievito, molto importante nei birrifici, non è attribuita nessuna importanza enologica.

### ***Saccharomyces cerevisiae***

E' la specie di riferimento del genere *Saccharomyces* ed è utilizzato come modello per studi genetici e molecolari di base. E' il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato, grazie alla collaborazione fra numerosi laboratori di ricerca (Mewes *et al.*, 1997).

*Saccharomyces cerevisiae* è sicuramente il lievito più studiato in assoluto, innanzitutto perché è il maggior responsabile di processi di fermentazione di prodotti da sempre alla base dell'alimentazione umana, quali il pane, il vino, la birra. E' il lievito più importante a livello enologico per le sue caratteristiche di vigore fermentativo, di potere alcoligeno, di resistenza agli antisettici e di adattabilità alle più varie condizioni. All'interno dei *S. sensu stricto* è sicuramente il più studiato nonostante numerose ricerche si stiano concentrando attorno alla specie *S. bayanus*, presente anch'esso nei mosti e dotato di caratteristiche peculiari quali la criotolleranza e la produzione di alti quantitativi di glicerolo (Naumov *et al.*, 2001).

### **1.2.3 Caratteristiche genomiche**

*S. cerevisiae* ha un genoma abbastanza piccolo, un gran numero di cromosomi, poche sequenze ripetute di DNA e pochi introni. I ceppi aploidi contengono approssimativamente 12-13 megabasi di DNA nucleare, distribuito in 16 cromosomi lineari le cui dimensioni variano da 250 a 2000 kb (Barre *et al.*, 1992). Il genoma ha un contenuto in guanina e citosina del 39-41 %, risulta privo di introni e contiene poche sequenze ripetute. Generalmente i ceppi *S. cerevisiae* utilizzati in laboratorio sono aploidi o diploidi ed hanno un profilo elettroforetico dei cromosomi costante. I ceppi di lievito vinari invece sono diploidi, aneuploidi, occasionalmente poliploidi, non è ancora chiaro se la poliploidia conferisca un vantaggio effettivo ai ceppi che ne sono portatori. Mostrano un elevato grado di polimorfismo di lunghezza dei cromosomi e non sembrano rimanere geneticamente stabili (Pretorius, 2000; Querol *et al.*, 2003).

I mitocondri di *S. cerevisiae* possiedono un genoma fra i più grandi rispetto ai mitocondri di tutti gli altri organismi. La sequenza nucleotidica del DNA mitocondriale del ceppo FY1679 è stata determinata (Foury *et al.*, 1998); il

genoma mitocondriale di questo ceppo è una molecola circolare di 85779 bp, avente un contenuto medio in guanina e citosina del 17,1%. In generale, il DNA mitocondriale di *Saccharomyces cerevisiae*, presente in copie multiple all'interno dell'organello, è caratterizzato da una bassa densità genica e da un elevato contenuto in AT%. In realtà la composizione nucleotidica del genoma mitocondriale è piuttosto eterogenea: mentre, infatti, il contenuto in guanina e citosina all'interno dei geni è approssimativamente del 30%, le regioni intergeniche sono composte da sequenze quasi ininterrotte dei nucleotidi adenina e timina. Esso codifica per poche ma essenziali componenti mitocondriali. La sua replicazione avviene durante tutto il ciclo cellulare; la DNA polimerasi mitocondriale manca di attività di proofreading, causando un alto tasso di mutazione che determina un'evoluzione estremamente rapida di tale genoma (Foury *et al.*, 1998; Pretorius *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Sono noti in *S. cerevisiae* alcuni elementi genetici extracromosomici ereditati in modo non-Mendeliano presenti nel nucleo (trasposoni e il plasmide 2  $\mu$ m), nei mitocondri e nel citoplasma ("viral-like particles" e "prion-like particles" come  $\psi$ ,  $\eta$  e URE3). Il genoma di *S. cerevisiae* contiene approssimativamente 35-55 copie di retrotrasposoni (Ty elements) in grado di spostarsi tramite un intermedio a RNA da una parte all'altra del genoma. Il plasmide 2  $\mu$ m invece risiede nel nucleo, è lungo 6,3 kb ed è presente in 50-100 copie in ciascuna cellula.

I lieviti non rimangono geneticamente costanti, infatti il mantenimento dell'identità genetica di un ceppo in una coltura pura è complesso. Il termine "coltura pura" indica una popolazione che deriva da una singola cellula, ma questo non implica che tutte le cellule della coltura siano geneticamente omogenee (Snow, 1983). Anche in condizioni di crescita controllata un ceppo di lievito mostra dei lenti cambiamenti dopo alcune generazioni. Questo può essere dovuto a diversi processi come mutazioni spontanee, traslocazioni cromosomiche promosse dai Ty elements (Longo e Vézinhét, 1993; Rachidi e Blondin, 2000), crossing-over mitotici (Aguilera *et al.*, 2000) e conversione genica (Puig *et al.*, 2000).

Il genoma di *S. cerevisiae* conta circa 14 milioni di coppie di basi (bp), distribuite in 16 cromosomi lineari; ciascun cromosoma è una singola molecola di DNA di lunghezza compresa fra le 200 e le 2000 kilobasi. Il genoma ha un contenuto in guanina e citosina del 39-41 %, risulta privo di introni e contiene poche sequenze

ripetute. Il sequenziamento completo di tale genoma ha rivelato la presenza di circa 6000 geni, la maggior parte dei quali è presente in singola copia (nel genoma aploide); i geni per l'RNA ribosomale, invece, sono altamente ripetuti (circa 100 copie). Il DNA nucleare contiene anche trasposoni, noti come elementi Ty (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 2000).

Mentre la maggior parte dei ceppi di laboratorio sono aploidi o diploidi, i ceppi ad uso industriale sono principalmente diploidi o aneuploidi e, occasionalmente, poliploidi. Non è ancora chiaro se la poliploidia conferisca un vantaggio effettivo ai ceppi che ne sono portatori (Pretorius *et al.*, 2000).

## **1.2.4 Metabolismo**

### **1.2.4.1 Metabolismo energetico dei lieviti**

La maggior parte dei lieviti sono dotati sia di attività fermentativa che di attività respiratoria, si possono perciò sviluppare sia in condizioni aerobiche sia di anaerobiosi. I lieviti sono in grado di crescere bene a pH acidi e sono osmotolleranti, condizioni fondamentali che rendono il mosto d'uva, caratterizzato da un pH compreso tra 3 e 4,5 e elevata concentrazione di zuccheri (150-250 g/l) l'ambiente di sviluppo ideale.

I lieviti necessitano di una fonte energetica costituita preferibilmente da zuccheri a 6 atomi di carbonio come glucosio, fruttosio (entrambi presenti abbondantemente in mosto e vinaccia), mannosio, quest'ultimo fermentato più lentamente rispetto agli altri due; il galattosio è metabolizzato solo da alcuni ceppi; i disaccaridi saccarosio, maltosio, lattosio e melibiosio sono fermentati da quei lieviti che sintetizzano i corrispondenti enzimi idrolitici. Lo stesso discorso vale per il raffiniosio, un trisaccaride composto da una molecola di fruttosio ed una di melibiosio. I polisaccaridi, salvo poche eccezioni, non vengono utilizzati.

La demolizione del glucosio avviene attraverso la glicolisi, in presenza di ossigeno il processo continua dapprima con la decarbossilazione del piruvato ad acetato (non libero ma legato al coenzima A), che viene poi demolito ossidativamente con il ciclo di Krebs; a basse concentrazioni di ossigeno o ad elevate quantità di zuccheri (condizioni che si verificano contemporaneamente nei mosti) viene portata a termine la fermentazione alcolica tramite la decarbossilazione dell'acido piruvico ad acetaldeide (da parte dell'enzima

piruvato decarbossilasi) e quindi la riduzione di quest'ultima ad alcol etilico (attuata dall'alcol deidrogenasi) per permettere la riossidazione del NAD.

Nel mosto a causa dell'alta concentrazione di zuccheri il processo attuato per produrre energia è la fermentazione alcolica indipendentemente dalla concentrazione dell'ossigeno disciolto. Infatti quando la concentrazione di zuccheri è superiore a 9 g/l si verifica un fenomeno di inibizione da glucosio regolato geneticamente (effetto Crabtree) che porta le seguenti conseguenze a livello cellulare: degenerazione dei mitocondri (i pochi rimasti perdono le creste), diminuzione di steroli ed acidi grassi, repressione degli enzimi coinvolti nel ciclo di Krebs e i costituenti della catena respiratoria (in particolare l'enzima piruvato deidrogenasi, mentre piruvato decarbossilasi e alcol deidrogenasi sono notevolmente attivati dalle alte concentrazioni di zuccheri).

I lieviti come *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* che accumulano etanolo anche in presenza di ossigeno sono chiamati Crabtree-positivi, mentre i lieviti che degradano gli zuccheri a CO<sub>2</sub> come *Kluyveromyces lactis* e *Candida albicans* sono detti Crabtree-negativi.

La trasformazione dei carboidrati a sei atomi di carbonio in composti a due atomi di carbonio non è la strategia più efficace per ricavare energia, infatti dopo la degradazione del glucosio e l'accumulo di etanolo il metabolismo dei lieviti Crabtree-positivi cambia. L'etanolo prodotto durante la fermentazione viene degradato in presenza di ossigeno, questo cambio di metabolismo è chiamato "diauxic shift" (Pronk et al., 1996).

#### **1.2.4.2 Gli aromi secondari**

L'attività metabolica del lievito produce una serie di composti che trasformano l'ambiente in cui questo organismo si sviluppa. Alcune delle sostanze prodotte, in quanto volatili, hanno valenza aromatica. Vengono infatti percepite al naso e, quando ingerite, mediante il retro olfatto forniscono sensazioni che possono essere positive o negative. Il metabolismo del lievito inoltre, utilizzando gli zuccheri presenti e degradando o sintetizzando acidi organici, è in grado di contribuire alla formazione del sapore complesso che viene percepito assaggiando il prodotto dell'attività fermentativa, un vino o un distillato.

I principali aromi secondari derivano dalla più importante attività che il lievito svolge in un mosto o nella vinaccia: la fermentazione alcolica.

Durante la fermentazione alcolica il lievito produce altri composti oltre all'alcol etilico e all'anidride carbonica, noti come sottoprodotti della fermentazione. I più

importanti sono rappresentati da glicerina e acido succinico; vi sono inoltre acido acetico, aldeide acetica (odore di frutta matura), acido piruvico, acetoino (odore di burro) e 2,3-butandiolo.

Per i lieviti l'etanolo, tecnologicamente il più importante prodotto della fermentazione alcolica, rappresenta un prodotto di scarto in quanto serve solamente a riossidare il NADH<sub>2</sub>, prodotto nelle prime fasi della fermentazione, a NAD. Quando si verifica un blocco a livello di acido piruvico o acetaldeide, determinato ad esempio dall'uso di anidride solforosa in grado di sequestrare in modo permanente il composto, la ricostituzione del NAD avviene attraverso la via alternativa rappresentata dalla riduzione del diidrossiacetone-fosfato a glicerofosfato (fermentazione gliceropiruvica) con produzione di glicerolo. In presenza di elevate concentrazioni di acetaldeide e pH alcalini, l'attività dell'enzima aldeide deidrogenasi, provoca l'ossidazione dell'aldeide acetica ad etanolo con produzione di acido acetico. Invece se la fonte di azoto è scarsa oppure la piruvato carbossilasi è repressa, ha luogo un'ulteriore fermentazione alternativa che ha come prodotti finali glicerina e acido piruvico.

La produzione di 2,3-butandiolo e acetoino avviene in seguito ad una reazione di condensazione tra due molecole di acetaldeide, quando il lievito necessita di bilanciare il potere riducente cellulare. Per quanto riguarda l'acido succinico, la maggior parte deriva dal metabolismo dell'azoto e in particolare dalla trasformazione del glutammato per via ossidativa, con acido α-chetoglutarico come intermedio.

Fra glicerina e gli altri sottoprodotti esiste un rapporto costante proposto da Genevois nella seguente equazione:

$$\sum (2A + B + 2M + H + 5S) = G$$

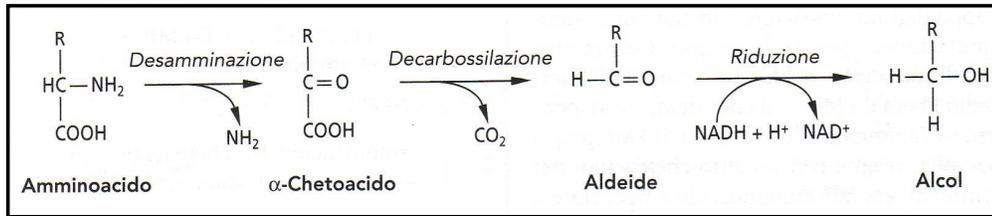
dove: A = acido acetico, B = 2,3-butandiolo, M = acetoino, H = acetaldeide, S = acido succinico, G = glicerina.

I rapporti tra i singoli componenti possono in realtà variare in base alla composizione del mezzo di fermentazione, le condizioni di aerazione e di pH (Zambonelli, 2003; Delfini, 1995).

#### **1.2.4.3 Gli alcoli superiori**

Essi derivano dall'attività di degradazione attuata dai lieviti sia degli aminoacidi che derivano dal metabolismo cellulare sia di quelli presenti nell'uva (Rankine, 1967). Dalla deaminazione di aminoacidi sono prodotti acidi chetonici da cui per

decarbossilazione si ottengono aldeidi e per riduzione alcoli, secondo la reazione proposta da Ehrlich (figura 1.2.1):



**Fig. 1.2.1:** reazione di Ehrlich.

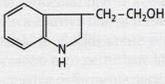
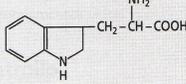
Gli alcoli superiori più rilevanti sono: n-propanolo, derivante dalla treonina; l'isobutanolo (2-metil-propanolo) dalla valina; l'alcol amilico attivo (2-metil-butanolo) dalla isoleucina; l'alcol isoamilico (3-metil-butanolo) dalla leucina. Il β-feniletanolo, che conferisce ai vini un gradevole profumo di rosa, potrebbe derivare dalla fenilalanina. Tuttavia la maggior parte sono portatori di aromi sgradevoli.

Molti esperimenti condotti soprattutto in mosto e vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) indicano che la degradazione degli amminoacidi non è la sola via di formazione degli alcoli superiori, infatti l'1-butanolo e l'1-propanolo non hanno amminoacidi come precursori. Alcuni mutanti, deficienti nella sintesi di specifici amminoacidi, non producono i corrispondenti alcoli superiori, anche se l'amminoacido è presente nel mezzo di crescita. Per il mosto, ad esempio non è possibile definire una relazione stechiometrica che rappresenti gli amminoacidi presenti ed i corrispondenti alcoli superiori nel vino.

La produzione di alcoli superiori da parte del lievito sembra essere legata non solo al catabolismo degli amminoacidi, ma anche alla loro sintesi tramite i corrispondenti acidi chetonici che derivano dal metabolismo degli zuccheri. Per esempio l'1-propanolo, privo di un amminoacido corrispondente, proviene dall'α-chetobutirrato. L'α-chetoisocaproato, un precursore dell'alcol isoamilico e un intermedio nella sintesi della leucina (figura 1.2.2), può anche essere prodotto dall'α-acetolattato che a sua volta deriva dal piruvato. La maggior parte degli alcoli superiori può perciò derivare dal metabolismo del glucosio senza l'intervento di amminoacidi. Non è comunque chiara la funzione fisiologica svolta dalla produzione degli alcoli superiori, nel lievito. Può essere un semplice modo per eliminare gli zuccheri, un processo di detossificazione della cellula oppure un sistema di regolazione del metabolismo degli amminoacidi. La formazione di

alcoli superiori può essere incrementata da pH e temperatura elevati nonché dall'arieggiamento.

Si è visto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) che nel mosto una carenza di ammonio e amminoacidi porta ad un incremento nel contenuto di alcoli superiori. In queste condizioni il lievito sembra recuperare l'azoto disponibile con la transaminazione e rilasciare le catene di carbonio inutilizzate in forma di alcoli superiori. Anche la specie e il ceppo di lievito coinvolti nella fermentazione influiscono sulla produzione di alcoli superiori: *Hansenula anomala* ad esempio, soprattutto in aerobiosi, ne è un buon produttore (Guymon *et al.*, 1961).

Alcol superiore	Contenuto nel vino (ml/L)	Aminoacido precursore
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{3-Metilbutan-1-olo o alcol isoamilico} \end{array}$	80-300	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Leucina} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{2-Metilbutan-2-olo o alcol amilico attivo} \end{array}$	30-100	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Isoleucina} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{2-Metilpropan-1-olo o alcol isobutirrico} \end{array}$	50-150	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{Valina} \end{array}$
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Feniletanolo</p>	10-100	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p>Fenilalanina</p>
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Tirosolo</p>	20-50	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p>Tirosina</p>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Propan-1-olo</p>	10-50	?
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Butan-1-olo</p>	1-10	?
 <p>Triptofolo</p>	0-1	 <p>Triptofano</p>
$\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ <p><math>\gamma</math>-Butirrolattone</p>	0-5	$\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p>Acido glutammico</p>
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p>Metionolo</p>	0-5	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ <p>Metionina</p>

**Fig. 1.2.2** Principali alcoli superiori e loro aminoacidi precursori.

Nel caso dei distillati la maggior parte degli alcoli superiori presenti sono costituiti da miscele di 2-metil-1-propanolo, 2-metil-1-butanolo e 3-metil-1-butanolo, indicati in distillazione con il termine di olio di flemma. Nonostante siano presenti in piccole quantità contribuiscono a livello olfattivo alla formazione

dell'aroma e del bouquet del distillato e con il loro potere solvente esaltano la volatilità di altre sostanze odorose come i terpeni e gli esteri.

#### **1.2.4.4 Gli esteri**

Le conoscenze relative alla produzione degli esteri da parte dei lieviti derivano principalmente da studi condotti su lieviti vinari cresciuti in mosto. La concentrazione di esteri prodotti durante la fermentazione alcolica è condizionata da una serie di fattori quali il ceppo di lievito, i metodi di vinificazione, la temperatura di fermentazione, i materiali insolubili e gli aminoacidi presenti nel mosto ed il suo pH, la quantità di anidride solforosa impiegata e la fermentazione malolattica.

Gli esteri derivano dall'attività di almeno tre enzimi sulfidrilici: alcol-, etanolo- ed isoamil- acetiltransferasi, i quali reagiscono con l'acetil coenzima A e con vari alcoli superiori per dare esteri. Si è visto che la sovraespressione del gene codificante per l'enzima alcol acetiltransferasi può incrementare significativamente la produzione di questi composti durante la fermentazione, aggiustando così il profilo aromatico di distillati e vini che possono mantenere un carattere più fruttato anche per lunghi periodi dopo l'imbottigliamento (Lilly *et al*, 2000).

Particolarmente interessanti per il loro contributo olfattivo sono: l'acetato di isoamile (aroma di banana) e l'acetato di feniletanolo (aroma di rosa).

Tra gli esteri etilici degli acidi grassi a media e lunga catena si possono ricordare, in quanto coinvolti nella formazione del cosiddetto aroma secondario, l'etil-propionato dal profumo di mela, l'etil-butirrato (banana), l'etil-3-butil-acetato (pesca) e il lattato d'etile (lampone). Inoltre la presenza di note fruttate può essere attribuita a etil-capronato, etil-caprilato (mela), etil-caprinato, etil-laurato, acetato di esile, 2-fenilacetato (nota di miele).

#### **1.2.4.5 Il lievito e gli aromi varietali o primari**

E' noto da tempo che alcune classi di composti che formano gli aromi varietali (monoterpeni, norisoprenoidi, derivati benzenici) possono trovarsi in forma libera odorosa e volatile oppure nella forma combinata inodore e non volatile. I primi sono monoterpeni in forma di alcoli (linalolo,  $\alpha$ -terpineolo, nerolo, geraniolo, citronellolo). Presentano basse soglie di percezione e sono principalmente responsabili dell'aroma caratteristico delle uve Moscato. Sono presenti in altre varietà a concentrazioni inferiori, pur sempre contribuendo a formare la

complessità aromatica del vino. Si trovano anche in forma di aldeidi, acetati e polialcoli. Generalmente, però, i monoterpenoli e i polialcoli sono presenti nelle uve in forma di glicosidi non volatili contenenti gli zuccheri semplici glucosio, arabinosio, ramnosio e apiosio (prevale la forma diglicosidica). Particolarmente abbondanti nelle uve Moscato, sono una sorgente potenziale di aroma. Affinché avvenga la liberazione dell'aglicone odoroso sono necessarie due attività enzimatiche consecutive; la prima (glicosidica) stacca lo zucchero più esterno dal disaccaride, la seconda (-glucosidasica) stacca il glucosio dal terpene, liberando il composto odoroso. Entrambe le attività, presenti nel succo d'uva, sono di origine vegetale. Recentemente sono state isolate anche nei lieviti, fornendo perciò la prova che questi microrganismi possono contribuire attivamente alla produzione di aromi primari un tempo ritenuti esclusivamente a carico della componente vegetale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Tra le attività glicosidasiche nei lieviti sono state osservate attività  $\alpha$ -ramnosidasica,  $\alpha$ -arabinosidasica, ma soprattutto  $\beta$ -glucosidasica.

### **1.3 ECOLOGIA E SELEZIONE DEI LIEVITI VINARI**

#### **1.3.1 Origine dei lieviti vinari**

Louis Pasteur nel 1872 allestì il primo esperimento di ecologia dei lieviti vinari: prelevando con una sottile pipetta sterile del succo dall'interno di una bacca di uva, dimostrò che, in assenza di bucce, il succo non entrava in fermentazione. Questo risultato portò a ritenere che i lieviti risiedano sulla superficie dell'acino. Pochi anni più tardi Hansen ed altri studiosi ipotizzarono il ciclo vitale dei lieviti della frutta ed in particolare dell'uva, indicando come lieviti tipici del vino gli apiculati e gli ellittici. Questa teoria prevedeva che i lieviti fossero normali residenti dell'epidermide della frutta; andassero a finire sul terreno durante l'inverno; e ritornassero sulla superficie dei frutti durante l'estate trasportati da vento e correnti d'aria. Le opinioni degli studiosi erano, però, contrastanti poiché c'era fino dall'inizio l'evidenza che un mosto sterile poteva cominciare a fermentare spontaneamente qualora questo fosse stato esposto all'aria oppure fosse messo in cantine (dove ogni utensile era potenzialmente inquinato da lieviti). Gli studi allora si diressero nell'isolare e quantificare dalle superfici naturali i microrganismi per definire l'ambiente più ricco di lieviti come la nicchia

di origine dei lieviti vinari. Vennero fatti campionamenti sul suolo dei vigneti, sull'uva, sulle superfici di cantina e dell'aria. Sfortunatamente però l'isolamento veniva sempre fatto da una coltura di arricchimento che sbilanciava il rapporto relativo delle diverse specie di microrganismi nel campione a favore delle specie di *S. cerevisiae* che veniva quindi isolato sempre a concentrazioni elevate da ogni campione.

Oggi non è ancora chiara l'ecologia dei lieviti vinari ma ci sono sicurezze maggiori rispetto al passato, grazie all'isolamento diretto e soprattutto alle tecniche di indagine molecolare. Perciò si può avallare l'ipotesi sostenuta da Herman Phaff alla fine degli anni '70 (*The life of yeasts*, 1978), secondo il quale la specie di *S. cerevisiae* è un comprimario assolutamente minoritario negli ambienti naturali. E' giusto chiedersi, quindi, quale sia la nicchia ottimale in cui sono presenti i lieviti vinari e che consente le più vaste selezioni clonali.

#### **NEL SUOLO**

Nel suolo si ritrovano la gran parte di lieviti fino ad oggi descritte, queste vivono a spese di zuccheri semplici solubili, sempre presenti in quantità scarse nei residui vegetali che cadono a terra.

In un granello di terra la biodiversità microbica è molto elevata sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. I batteri sono circa 10000 volte più rappresentati dei lieviti, mentre i funghi filamentosi e le alghe verdi sono quasi sempre presenti con poche centinaia di unità. La colonizzazione dei lieviti come gruppo è molto diversa: gli apiculati raggiungono le 200000 cellule/g di terra, mentre il lievito vinario *S. cerevisiae* è a malapena rappresentato da poco più di 10 cellule/g di terra. Inoltre sembra che la microflora spontanea di *S. cerevisiae* sia fluttuante in vigneto, cioè pur essendoci ogni anno un ceppo che domina sugli altri non è detto che sia lo stesso a ripresentarsi l'anno seguente (si osserva comunque una ripresa di dominio in qualche annata a seguire). Ad oggi non si possono definire i fattori che determinano tale fluttuazione. Non è quindi corretto pensare che la fermentazione spontanea, in un dato territorio, sia sistematicamente realizzata dagli stessi ceppi ogni anno e che questa specificità faccia parte delle caratteristiche del territorio (Ribéreau-Gayon, 2003).

## SUL GRAPPOLO

La diversità della microflora epifitica dell'uva può essere attribuita a diversi parametri: la varietà stessa dell'uva, il grado di maturazione e l'annata, ma anche la posizione geografica, le condizioni climatiche, le pratiche viticole ed enologiche (Pramateftaki *et al.*, 2000).

La superficie dell'acino è ricoperto da uno strato di cuticola cerosa che incide sull'adesione dei microrganismi e la loro abilità a colonizzare la superficie. Il microscopio elettronico a scansione ha rivelato che i lieviti si localizzano nelle zone dell'acino dove il succo può uscire, qui si trovano immersi nelle secrezioni zuccherine e vischiose del frutto. La buccia si può rompere e liberare il succo in vari modi: infezioni di muffe (*Botrytis*, *Oidium*), grandinate, eccesso di pioggia e insetti (ape, vespa, moscerino).

- La pioggia vicino o la fase fenologica possono spiegare l'aumento di densità dei microrganismi sul grappolo perché aumenta la disponibilità di nutrienti. Infatti, grazie ai fenomeni di esosmosi, l'acqua all'esterno dei tessuti della pianta induce il rilascio di piccole molecole tra cui nutrienti, ed inoltre l'aumento del volume dell'acino porta al rilascio di succo zuccherino attraverso lacerazioni e distacco delle zone di giunzione come quella fra peduncolo e acino (Combina *et al.*, 2005).
- Gli insetti come ape, vespa, farfalla, ragno, ma soprattutto *Drosophila* ospitano come normali simbionti i lieviti, ed inoltre nelle giornate assolate e calde passano molto tempo sull'uva e soprattutto sugli acini rotti. Gli insetti quindi fungono da vettori, che inoculano i microrganismi, i quali sono liberi di crescere in modo clonale nel succo dell'uva. Non si sa se è da imputare ad uno solo o a più insetti il trasporto dei microrganismi su un grappolo; sembra però plausibile ritenere che siano i lieviti presenti sugli acini rotti a condurre la fermentazione alcolica spontanea (Mortimer *et al.*, 1999).

In generale sono pochi i lieviti riscontrati sugli acini immaturi,  $10-10^3$  CFU/g, ma con la maturazione e fino alla vendemmia, quando gli zuccheri diffondono sulla superficie, la popolazione raggiunge le  $10^4-10^6$  CFU/g.

Sui grappoli immaturi predominano i generi *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*. Questi si ritrovano anche nei grappoli maturi, ma

in minor quantità rispetto ai lieviti apiculati a metabolismo ossidativo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, che sembra dominino anche sui frutti danneggiati, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Il principale agente della fermentazione *Saccharomyces cerevisiae* non è presente oppure viene rilevato a bassissime concentrazioni (Fleet, 2003).

Tra le specie più frequenti appartenenti ai generi già citati sono state isolate: *Rhodotorula glutinis*, *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens* e *kluveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Taphrina spp.*, una specie ancora non del tutto caratterizzata (Rousseau *et al.*, 2001).

La predominanza di alcune specie su altre è influenzata da alcuni fattori quali la loro adesione alla superficie, il metabolismo dei nutrienti disponibili, la tolleranza a inibitori chimici naturali o artificiali e l'interazione con altre specie (lieviti, batteri e funghi).

#### IN CANTINA

*Saccharomyces cerevisiae* non è quindi un lievito ad ampia diffusione ambientale. La prima evidenza sperimentale, che la nicchia alternativa di associazione della specie *S. cerevisiae* potesse essere l'ambiente confinato della cantina, risale a due enologi francesi che negli anni 1950-60 dimostrarono che le cellule vive di *S. cerevisiae* sono costantemente e massicciamente presenti su tutte le superfici esposte della cantina, pavimenti, soffitti, muri perimetrali, vasi vinari e perfino le mani degli operatori. A confermare questi risultati ci sono le indagini degli anni '80 di Ciani e collaboratori che dimostrarono che più dell'80% delle cellule isolabili nei luoghi di produzione del vino appartengono alla specie *S. cerevisiae*, ed il restante 20% sono lieviti filmogeni del genere *Pichia* e *Candida*. Dimostrarono inoltre, grazie all'uso di un lievito selezionato marcato, che normalmente si verifica un passaggio di cellule dalle superfici di cantina al mosto appena spremuto, e che la fermentazione di questo mosto è causata dai lieviti residenti della cantina (Ciani *et al.*, 1997, Ciani e Martini, 1998). Quindi la nicchia ecologica occupata da *S. cerevisiae* non è naturale ma tecnologica.

Coloro che sostenevano il dogma della circolazione del lievito vinario tra la cantina e il suolo non avevano mai dimostrato come le cellule moltiplicate in cantina sui mosti in fermentazione potessero ritornare al vigneto per ricominciare il ciclo. Di conseguenza, senza chiusura del ciclo non si poteva nemmeno immaginare la presenza di una pressione evolutiva che operasse selettivamente nel

miglioramento dei caratteri enologici dei ceppi. Al contrario, la presenza di un ciclo che si svolge internamente alla cantina apre nuove prospettive alla possibilità di selezionare ceppi autoctoni di lievito (Vincenzini *et al.*, 2005).

In un contesto di questo genere, tutte le modificazioni che favoriscono l'adattamento dei ceppi all'ambiente estremo "mosto d'uva" possono fissarsi nella popolazione locale durante il ciclo della riproduzione fino alla vendemmia seguente. Di conseguenza anno dopo anno, vendemmia dopo vendemmia si può immaginare e giustificare scientificamente un processo di selezione genetica che agisce sui ceppi locali. Questa è dovuta alle condizioni imposte dalla fermentazione, almeno per quanto riguarda i principali caratteri enologici (Cocolin *et al.*, 2004).

Il mosto d'uva è un terreno di coltura molto selettivo, caratterizzato da condizioni estreme come:

- il pH intorno a 3,5 che impedisce la crescita della maggior parte delle specie batteriche e di lieviti;
- l'elevata concentrazione di zucchero (>20%v) che favorisce le pochissime specie microbiche osmofile (che resistono a elevate concentrazioni in soluti del terreno di coltura);
- l'elevata concentrazione di etanolo, che si è formato attraverso la via fermentativa, impedisce l'attività di tutti i lieviti con l'esclusione delle specie del gruppo *Saccharomyces sensu stricto*.

Sempre da studi di Ciani e colleghi del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Perugia, condotti anche sul Prosecco, si evince che:

- la flora di cantina è composta nel 75-80% dei casi da ceppi di *S. cerevisiae* e che il 90% di queste colture possiede tutte le proprietà medie che contraddistinguono uno starter selezionato per l'enologia;
- ceppi selezionati localmente, in diverse aree viticole DOC, sono caratterizzati da proprietà enologiche primarie eccezionali (velocità di fermentazione, vigore e purezza fermentativi), inoltre ognuno possiede uno specifico metabolismo secondario in grado di conferire al vino aromi secondari caratteristici. E' estremamente probabile pertanto che, anche per i prodotti secondari, si verifichi una selezione (che opera a livello della

singola cantina individuale) in favore di quei caratteri organolettici che contraddistinguono il vino locale (Ciani *et al.*, 2004).

### 1.3.2 La fermentazione spontanea e fermentazione in purezza

Nel 1891 Martinand e Rietsch scoprirono che nel mosto appena spremuto, in una fermentazione spontanea, cominciano a svilupparsi lieviti a forma di limone (apiculati) appartenenti alla specie *Kloeckera apiculata*, mentre le cellule di forma ovale della specie *Saccharomyces ellipsoideus* (ora *S. cerevisiae*) cominciano ad occupare e fermentare il mosto solo dopo 4-5 giorni di attività delle forme apiculate. Questo effetto di “doppia dominanza” fu in seguito confermato in tutte le fermentazioni spontanee indipendentemente dalla località e dalla varietà dell’uva.

Lo svizzero Müller-Thurgau studiò il fenomeno in rapporto alle sue implicazioni tecnologiche, conducendo fermentazioni comparative con lieviti apiculati o ellittici. Le loro proprietà enologiche non potevano risultare più differenti:

- *Kloeckera apiculata* (figura 1.7), oggi appartenente al gruppo *Hanseniaspora* ha un metabolismo fermentativo molto impuro e lento, produce solo piccole quantità di etanolo (3-4% v/v), formando molti sottoprodotti insieme con quantità eccessive di acido acetico;
- *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1.8) ha un metabolismo fermentativo più puro ed è in grado di formare più alte concentrazioni di etanolo (>10% v/v), in presenza di bassissime concentrazioni di prodotti secondari.

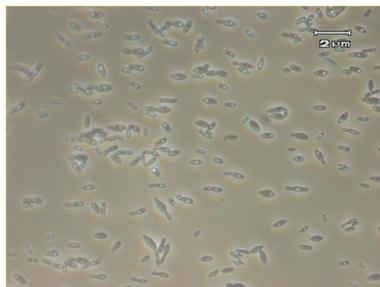


Fig. 1.2.1 *Kloeckera apiculata*

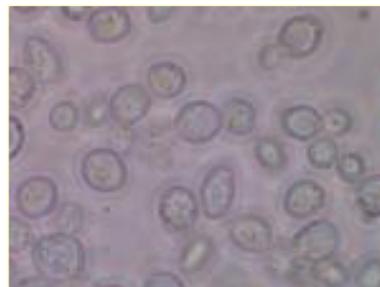


Fig. 1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La trasformazione del mosto in vino è un processo polimicrobico in cui le diverse specie di lievito, presenti prima sull'uva e poi nel mosto si sviluppano contemporaneamente o si susseguono durante la fermentazione.

Le caratteristiche tecnologiche (che verranno trattate in un secondo momento) sono alla base del meccanismo di successione dei diversi generi, ma anche delle specie e dei ceppi di lievito. Va rilevato che i lieviti vinari delle diverse specie sono dotati delle stesse caratteristiche, ma ciò che li differenzia in modo sostanziale è il livello di espressione dello stesso parametro. (Lambrechts and Pretorius, 2000)

La dinamica di popolazione nella **fermentazione spontanea** ha come carattere tecnologico selettivo principale l'alcol-tolleranza. La produzione di etanolo da parte delle diverse specie vinarie è molto variabile ed è legata principalmente alla loro tolleranza nei confronti di questo composto, oltre ad altri numerosi fattori come il tipo di zuccheri o microelementi come il magnesio, o la sintesi di enzimi come glicerolo-3-P-deidrogenasi.

Le fasi iniziali della fermentazione sono dominate dallo sviluppo di lieviti non-*Saccharomyces* caratterizzati da una bassa attività fermentativa e, tra questi generi, *Hanseniaspora (Kloekera)*, *Candida (C.stellata)* e *Metschnikowia (M. pulcherrima)* sono i più frequenti. L'aumento del contenuto di alcol limita ai primi giorni di fermentazione la crescita di questi lieviti che a concentrazioni di etanolo intorno a 5-6% subiscono un rapido declino fino alla completa inibizione cellulare.

A dominare la seconda e più importante fase fermentativa sono i *Saccharomyces sensu stricto* ( $10^6$ - $10^7$  CFU/ml). I lieviti più alcoligeni sono quelli sporigeni e fra questi, in particolare i ceppi vinari della specie *S. cerevisiae*, che per la maggior parte esibiscono potere fermentativo superiore a 14% v/v di etanolo. Sono dotate di buon potere fermentativo le specie *Saccharomyces ludwigii*, *S. pombe* e *T. delbrueckii*, capaci di produrre oltre i 10% v/v di etanolo.

Nell'ambito di ogni specie, è riscontrabile un'ampia variabilità in funzione del ceppo. In particolar modo, in *S. cerevisiae* i livelli di produzione di etanolo sono molto variabili (tra 8-23% v/v), a dimostrazione dell'elevata e naturale biodiversità di questa specie (Vincenzini *et al.*, 2005).

La fermentazione spontanea è però un processo non controllato che può portare ad un vino con caratteristiche aromatiche sfavorevoli, l'utilizzo di colture starter selezionate garantisce invece il controllo della fermentazione e una qualità più costante del prodotto finale. Quando si usano i lieviti selezionati nella fermentazione del mosto non si tratta di un processo condotto in sterilità, in cui il mosto ha subito un processo chimico o fisico capace di eliminare ogni forma di vita, bensì di un processo condotto **in purezza**, cioè al mosto viene aggiunta anidride solforosa (25-100 mg/l) che riduce massicciamente la microflora selvaggia (non la elimina totalmente). A questo punto inoculando dai 15 ai 20 miliardi di cellule vive del lievito selezionato si ottiene un pronto avvio del processo fermentativo condotto unicamente dallo starter.

### **1.3.3 Lieviti selezionati in enologia**

Sino alla fine del secolo XIX la fermentazioni dei succhi di frutta zuccherina e degli estratti acquosi di vari semi di cereali venivano condotte naturalmente, utilizzando le popolazioni miste di lieviti di origine ambientale. Questa fermentazione spontanea, incontrollabile da parte dell'uomo, non viene quasi più usata da nessuno grazie ad Hansen che nel 1880 introdusse nell'industria della birra la pratica della fermentazione in purezza, selezionando ed usando colture pure di lieviti. Fu però Müller-Thurgau nel 1890 ad introdurre il concetto di lievito selezionato in campo enologico (Pretorius and Westhuizen, 1991). I lieviti selezionati sono in grado di condurre una fermentazione dei mosti e dei vini con risultati prevedibili e programmabili. Per lievito selezionato o starter selezionato quindi, si intende un ceppo caratterizzato da proprietà fisiologiche, biochimiche ed enologiche ottimizzate in rapporto alle esigenze tecnologiche dei processi di fermentazione in purezza.

Fino a metà del XX secolo l'uso di lieviti come starter in vinificazione veniva attuato nei paesi nuovi produttori di vino come Australia, Stati Uniti, Nuova Zelanda e Sud Africa. Nei paesi tradizionalmente produttori di vino, le colture selezionate venivano invece utilizzate prevalentemente per correggere i difetti fermentativi e/o per attivare operazioni di rifermentazione in genere, e di spumantizzazione, in particolare. Le colture starter selezionate erano mantenute in collezione, in genere da enti di ricerca, e per il loro impiego era necessario ricorrere alla moltiplicazione e al preadattamento in mosto, questo rendeva

difficile l'utilizzo di starter da parte degli operatori di cantina che avevano scarse nozioni di microbiologia. Sotto la spinta dell'industria paniera finalmente nella seconda metà del XX secolo cominciò la produzione industriale di starter microbici per la vinificazione sotto forma di lievito compresso. Questo preparato, pur evitando agli addetti la fase di moltiplicazione, aveva l'inconveniente di essere facilmente deperibile a causa dell'elevato contenuto in umidità (70%), che in pratica ne riduceva la diffusione commerciale. Per ovviare a ciò, nel 1965 in California furono proposti e commercializzati i primi due starter vinari sottoforma di lieviti secchi attivi (LSA). Questi due ceppi, "Montrachet" e "Pasteur Champagne" si diffusero presto in tutto il mondo. Questo nuovo tipo di preparazione, grazie ad una elevata vitalità (50%), alla lunga conservabilità dovuta al ridotto contenuto in umidità (4-8%) e al sistema di confezionamento sottovuoto, hanno permesso un'ampia diffusione dei LSA. In Italia la rapida diffusione dell'impiego dei lieviti selezionati è iniziata nel 1978 dopo l'entrata in vigore della legge che ne autorizzava l'uso (D.M. 10 ottobre 1977). Le specie oggetto di selezione sono quelle del gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto*, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Zambonelli C. et al., 2000).

Quando si usano i lieviti selezionati nella fermentazione del mosto non si tratta di un processo condotto in sterilità, in cui il mosto ha subito un processo chimico o fisico capace di eliminare ogni forma di vita, bensì di un processo condotto in purezza, cioè al mosto viene aggiunta anidride solforosa (25-100 mg/l) che riduce massicciamente la microflora selvaggia (non la elimina totalmente). A questo punto inoculando dai 15 ai 20 miliardi di cellule vive del lievito selezionato si ottiene un pronto avvio del processo fermentativo condotto unicamente dallo starter.

La diversità della microflora nativa presente nelle fermentazioni spontanee contribuisce alla composizione chimica e alle qualità sensoriali del vino (Lurton I, et al., 1995) e in alcune cantine si preferisce ancora utilizzare esclusivamente i lieviti indigeni per ottenere un prodotto che si distingue per la sua complessità aromatica rispetto alle fermentazioni condotte in purezza con lieviti commerciali. Altri preferiscono far partire le fermentazioni in modo spontaneo ed in un successivo momento provvedere all'inoculo con un lievito starter. Nelle cantine in cui vi è una produzione su larga scala ed è essenziale una fermentazione rapida e una qualità costante del prodotto è normalmente preferito l'utilizzo di lieviti commerciali (Pretorius, 2000). sono poche infatti le cantine che si assumono il

potenziale rischio di una fermentazione spontanea per ottenere un prodotto di cui è difficile predire l'esito finale.

L'uso dei lieviti commerciali come starter ha rivoluzionato il mondo enologico. Il loro uso infatti

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

I primi lieviti sono stati selezionati con lo scopo di esaltare le caratteristiche tecnologiche (vigore fermentativo, alcoltolleranza), in modo da ottenere prodotti senza difetti. (Perez-Coello et al., 1999) Oggi i lieviti di ultima generazione, sono selezionati sulla base di caratteristiche che possano migliorare la qualità dei vini attraverso l'espressione di precursori già presenti nei mosti e la produzione di metaboliti secondari (alcoli superiori, esteri, chetoni, aldeidi). Particolarmente interessanti sono gli sforzi nella selezione di lieviti con alto valore salutistico, cioè che non producono sostanze pericolose per la salute del consumatore (Vincenzini et al., 2005).

Potenzialmente l'uso dei lieviti selezionati può presentare anche degli svantaggi per nulla trascurabili, poiché fra tutte le colture commercializzate di LSA sono relativamente poche quelle realmente utilizzate in tutto il mondo dai vinificatori. Questo potrebbe condurre a una standardizzazione dell'agente microbico con il risultato di ottenere una riduzione della biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina. La prospettiva peggiore però sembra la perdita di biodiversità in vigneto, infatti dopo la vendemmia in vigneto si ritrova circa il 73% dei lieviti commerciali che ci sono in cantina, questi vengono per il 94% disseminati dalle macchine per la raccolta dell'uva in un raggio che va da 10 a 200m dalla cantina (Valero *et al.*, 2005).

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

Per ovviare a questi problemi sia i microbiologi, che i vinificatori, che i responsabili alle vendite del vino ritengono sia opportuno introdurre l'uso di starter ecotipici selezionati seguendo le caratteristiche di tipicità del prodotto locale.

#### **1.4 CRITERI E STRATEGIE DI SELEZIONE DEI LIEVITI VINARI**

La selezione di lieviti starter per l'enologia si attua essenzialmente all'interno del genere *Saccharomyces* ed in particolare tra le colture appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. In anni recenti c'è stata una rivalutazione dei lieviti vinari non-*Saccharomyces* appartenenti ai generi *Candida*, *Kloeckera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Picchia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* e *Rhodotorula*. Le specie non-*Saccharomyces* mancano di competitività in condizioni enologiche perché non hanno un gran vigore fermentativo e mostrano una scarsa resistenza allo stress rispetto a *S. cerevisiae*, possono però essere impiegate come starter in colture miste o sequenziali (Shuller e Casal, 2005). Ad esempio si è visto che i lieviti appartenenti alla specie *Torulasporea delbrueckii*, descritti come bassi produttori di acido acetico, possono rappresentare una soluzione al problema della produzione di un'eccessiva quantità

di acido acetico durante la fermentazione di mosti bottrizzati e ricchi di zuccheri se usati in coltura mista con *S. cerevisiae* (Bely et al., 2007).

Le selezioni si svolgono sempre mediante lo studio di caratteri stabili, misurabili e geneticamente ben definiti. Nel caso dei lieviti è stato molto facile individuare in *Saccharomyces cerevisiae* la specie più idonea alla vinificazione, ma è stato poi molto difficile definire che cosa dovessero avere di particolare i ceppi selezionati. Quello che non si riusciva a precisare era il motivo per il quale i vini prodotti da differenti ceppi di *S. cerevisiae* potevano essere di differente qualità. Prima Castelli, poi Verona e Florenzano hanno individuato caratteri enologicamente validi come la capacità di fermentare a basse temperature, la resistenza ad alte dosi di antisettici, di alcol e di zuccheri, il potere fermentativo e la purezza fermentativa. Successivamente, in seguito alla messa a punto di metodi di analisi chimica anche strumentali, sono stati individuati e studiati numerosi altri caratteri che possono avere influenza sull'andamento della fermentazione e che giustificano la differente qualità conferita ai vini dal ceppo di lievito. L'elenco dei caratteri è poi via via diventato sempre più lungo, così che sull'argomento oggi disponiamo di un complesso di conoscenze piuttosto ampio e completo. Questi caratteri possono essere suddivisi in **caratteri tecnologici**, che influiscono sull'andamento dei processi fermentativi, e **caratteri di qualità**, che influiscono sulle caratteristiche chimiche dei vini.

Va rilevato che i lieviti vinari delle diverse specie sono dotati delle stesse caratteristiche enologiche, ma ciò che li differenzia in modo sostanziale è il livello di espressione dello stesso parametro (Vincenzini *et al.*, 2005).

I caratteri enologici non hanno importanza univoca. Fermo restando che quelli di competitività sono sempre fondamentali, tutti gli altri possono essere talvolta positivi, altre volte negativi, talvolta richiesti ai più alti livelli, altre volte ai più bassi livelli.

#### **1.4.1 Selezione clonale**

Quasi tutti i ceppi attualmente disponibili sono il frutto di selezioni clonali più o meno accurate. Il punto di partenza di un qualsiasi programma di miglioramento genetico di lieviti è l'isolamento da uva, mosto o vino di un elevato numero di ceppi e la valutazione delle loro proprietà enologiche. Questo processo noto come selezione clonale porta all'individuazione di ceppi che possono avere alcuni dei

caratteri desiderati ai fini di una buona vinificazione, tuttavia permette la costruzione di un prezioso serbatoio di biodiversità su cui impostare eventuali programmi di miglioramento genetico. (Giudici *et al.*, 2005)

La selezione viene generalmente effettuata nell'ambito del genere *Saccharomyces* e le colture vengono isolate preferibilmente da mosto o da vino. Data la scarsa presenza dei lieviti *Saccharomyces* sull'uva si procede preferibilmente con la tecnica dell'arricchimento. Con questo metodo vengono create le condizioni che, in una popolazione mista, favoriscono la crescita di alcuni microrganismi e inibiscono la crescita del resto della popolazione microbica. L'elevata concentrazione di etanolo che si accumula nel mosto durante la fermentazione è il fattore che maggiormente favorisce *Saccharomyces* rispetto ad altri generi. Gli isolamenti vengono perciò effettuati su mosti in fermentazione. Dopo l'isolamento di un numero consistente di ceppi si procede alla loro identificazione fenotipica e genotipica di specie e il ceppo e alla determinazione dei caratteri tecnologici e qualitativi. Fermentazioni su larga scala in mosto possono essere effettuate con i ceppi che mostrano la migliore combinazione di caratteri. Infine l'analisi sensoriale dei vini ottenuti può migliorare la descrizione dei ceppi selezionati.

#### **1.4.2 Selezione di lieviti ecotipici**

Anche per il Prosecco come per altri vini locali ad esempio il bardolino, valpolicella, soave e sangiovese (Zilio *et al.*, 2004; Bosca *et al.*, 2004; Zilio *et al.*, 2000) è nata l'esigenza di isolare un ceppo di lievito che meglio si adatta alla specifica varietà di uva, zona di produzione e tecnica di vinificazione.

I lieviti ecotipici possono contribuire alla definizione delle peculiari caratteristiche qualitative dei vini locali (Fugelsang, 1996; Heard, 1999) evitando una eccessiva standardizzazione del prodotto dovuta alla scarso numero di lieviti starter in commercio. (Martini, 2003) La maggior parte dei lieviti presenti in commercio, pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, possiedono caratteristiche ordinarie, producono vini di media qualità. Inoltre, proprio perché provengono da realtà vitivinicole estranee, non sono sempre capaci di sviluppare completamente i sapori e gli aromi tipici di un vino (Pretorius, 2000). I ceppi ecotipici vengono utilizzati esclusivamente nella zona di isolamento e sono stati selezionati seguendo le caratteristiche di tipicità del prodotto locale. In realtà sono

i lieviti che originariamente davano luogo alla fermentazione spontanea e contribuivano in questo modo a costruire le caratteristiche di tipicità del vino. In ogni zona pedoclimatica e forse in ogni singolo vigneto nel tempo si è insediato un complesso di ceppi di *S. cerevisiae* adattati ed evoluti per vivere in quel luogo, ma soprattutto responsabili dei caratteri organolettici specifici del vino prodotto localmente (Regodon et al., 1997).

Le fasi della selezione di un lievito ecotipico sono le stesse di una selezione clonale in cui il campionamento di lieviti viene eseguito da vari ambienti naturali come il suolo del vigneto, l'uva, il mosto o le superfici di cantina della zona di produzione di un particolare vino. Ogni nicchia presenta vantaggi e svantaggi diversi quindi, viene scelta in base alle esigenze di studio del selezionatore.

Poi seguono le fasi di identificazione genetica e caratterizzazione. Ultima tappa fondamentale prevede delle prove di microvinificazione per il *pool* di lieviti selezionati fino a questo punto. Queste prove danno un'idea indicativa di come lavora un ceppo in uno specifico mosto d'uva e serve a limitare sprechi di risorse nei passaggi successivi. Il lavoro si conclude analizzando e confrontando le caratteristiche sensoriali dei vini ottenuti. Questo è un passaggio tanto fondamentale quanto aleatorio perché viene affidato all'esperienza di diverse persone, ma c'è comunque un grosso lavoro di preparazione dei degustatori teso a standardizzare questa delicata fase. Solo i ceppi reputati idonei a produrre gli aromi ricercati in un determinato vino possono essere ammessi alla vinificazione vera e propria.

### **1.4.3 Miglioramento genetico dei lieviti**

Varie tecniche di miglioramento genetico dei lieviti sono state ideate ed applicate da diversi decenni. Alcune tecniche si limitano ad alterare regioni limitate del genoma, altre vengono utilizzate per riarrangiare l'intero genoma (Pretorius, 2000). Mutazioni indotte, ibridizzazione, rare-mating, fusione di sferoplasti, clonazione di geni e trasformazione sono le tecniche più comunemente usate.

La conoscenza della natura monogenetica o poligenetica del carattere è essenziale per un'appropriata scelta tra i diversi approcci di miglioramento genetico. Alcuni dei più importanti caratteri tecnologici come il vigore fermentativo, la tolleranza all'etanolo e la temperatura di crescita dipendono da una moltitudine di loci che

non sono ben caratterizzati. In questo contesto sia un approccio razionale basato sulle tecnologie del DNA che un approccio casuale basato sulla mutagenesi possono incontrare molti ostacoli (Giudici et al., 2005).

Tra gli approcci classici utilizzati per il miglioramento dei lieviti ci sono la mutagenesi e l'ibridizzazione.

L'utilizzo di mutanti naturali o indotti ha come scopo l'eliminazione di un carattere monogenico indesiderato. L'uso di agenti mutageni ed il successivo processo di selezione per replica plating su terreni selettivi rappresentano la procedura più comunemente adottata (Pretorius, 2000).

La ricombinazione sessuale è un efficace meccanismo di combinazione di caratteri utili in quanto è in grado di aumentare la biodiversità genetica molto più rispetto alla mutagenesi. L'ibridizzazione di ceppi di laboratorio eterotallici è stato il primo metodo impiegato per il miglioramento genetico dei lieviti. I ceppi selvaggi sono generalmente omutallici ed eterozigoti (Barre et al., 1993), la coniugazione tra spore è possibile mediante l'uso di un micromanipolatore o miscelando colture in sporificazione, prima dell'autodiploidizzazione. La costituzione di nuovi ceppi mediante ricombinazione sessuale può essere conseguita mediante due differenti approcci: da gameti ottenuti dalle colture di singole spore dei ceppi parentali oppure direttamente dai gameti dei ceppi parentali. La ricombinazione tra un piccolo numero di ceppi parentali permette di ottenere una complessa progenie che sarà successivamente sottoposta a selezione. La prima strategia, cioè l'uso di gameti da singole spore, consente di realizzare la combinazione di caratteri monogenici selezionando il fenotipo desiderato mediante l'analisi delle tetradi. La seconda strategia è caratterizzata da un maggior grado di casualità e risulta quindi più idonea per la ricombinazione di fenotipi complessi ottenuti dall'azione di numerosi geni (Zhang et al., 2002). L'ibridizzazione intra ed inter-specifica è stata impiegata con successo nel miglioramento genetico di proprietà enologiche in ceppi di lievito destinati all'impiego in vinificazione, ad esempio ibridi intraspecifici fra differenti ceppi di *S. cerevisiae* che combinano la non produzione di H<sub>2</sub>S di un ceppo con il carattere di flocculazione dell'altro (Romano et al., 1985). Oppure ibridi interspecifici tra specie criotolleranti *S. uvarum* e ceppi non criotolleranti di *S. cerevisiae* (Masneuf et al., 2002; Stato et al., 2002). Uno dei limiti più grandi nell'applicazione della

tecnica di ibridizzazione è la bassa incidenza in natura di ceppi selvaggi di lievito ad alta capacità di sporificazione a causa del loro assetto genetico per lo più aneuploide o poliploide (Giudici et al, 2006).

Approcci che si basano sulle tecnologie del DNA ricombinante presentano il vantaggio, rispetto alle tecniche appena elencate, di avere una maggiore specificità (Pretorius 1991). Tecniche di clonaggio e trasformazione permettono di modificare le caratteristiche dei lieviti con elevata precisione: variando una proprietà esistente, introducendo un nuovo carattere senza compromettere i caratteri desiderabili già esistenti, eliminando un carattere non desiderato.

Le tecnologie del DNA ricombinante sono adatte a modificare caratteri codificati da un solo gene, quando un carattere risulta invece dall'espressione di una moltitudine di geni l'ibridizzazione rimane il metodo più efficace.

Nonostante i grandi progressi nelle tecnologie genomiche le bevande ottenute con organismi geneticamente modificati non possono ancora essere commercializzate (Rainieri and Pretorius, 2000). Inoltre la diffusione di lieviti modificati geneticamente è condizionata dalle peculiari caratteristiche dell'industria enologica che risulta molto legata alla tradizione e alla "naturalità del processo".

## 1.5 SCOPI DELLA TESI

Questo lavoro è stato condotto con l'obiettivo di aumentare le conoscenze relative alla biodiversità associata alla specie, di elevato interesse tecnologico, *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente presente in un regione a grande vocazione vitivinicola, il territorio della DOC di Conegliano e Valdobbiadene. Mediante la sperimentazione condotta durante i tre anni di dottorato, sono stati saggiati approcci innovativi in grado di descrivere la variabilità genetica a livello di ceppo riscontrata sul territorio e di relazionarla alle principali caratteristiche enologiche. In quest'ottica è stato effettuato un capillare campionamento, svolto in due annate consecutive, di uve in vigneto che ha coinvolto tutto il territorio della DOC. Ogni grappolo raccolto è stato utilizzato per avviare fermentazioni spontanee con lo scopo di isolare lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. Metodi molecolari, sia di letteratura che messi appositamente a punto, sono stati utilizzati per ottenere un'identificazione delle specie di appartenenza e una caratterizzazione ceppo-specifica di più di 600 lieviti isolati mediante metodi convenzionali (uso di specifici terreni di crescita). Successivamente prove di crescita in mosto sintetico e mosto di uve Prosecco hanno permesso la valutazione, nei lieviti isolati, dei principali caratteri tecnologici (vigore fermentativo, produzione di schiuma, adesività) e di qualità (produzione di idrogeno solforato). La notevole mole di dati raccolti è stata elaborata anche mediante un moderno approccio statistico che ha permesso una più approfondita valutazione dei risultati. Per un numero più ristretto di isolati (66) si è proceduto ad un'analisi più accurata di alcuni caratteri, in particolare sono state messe a punto e applicate metodiche per la determinazione del livello di resistenza all'etanolo e all'anidride solforosa. Inoltre è stata valutata, mediante l'utilizzo di un metodo basato sulla rilevazione di un segnale fluorescente, l'attività  $\beta$ -glucosidasi di ciascun ceppo con lo scopo di stabilire l'eventuale effetto del lievito sulla produzione di aromi primari durante il processo di vinificazione. Il risultato complessivo di quest'indagine, supportato da prove di vinificazione in una cantina sperimentale, ha permesso di selezionare un ristretto numero di ceppi autoctoni che verranno proposti al territorio per la produzione di vino Prosecco.

## **2 Campionamento e indagini genetiche**



## 2.1 INTRODUZIONE

La selezione di lieviti vinari ha lo scopo di ottenere, attraverso un programma ben definito, colture di lievito capaci di condurre il processo fermentativo verso risultati predeterminati. La prima fase di un programma di selezione prevede il reperimento di un vasto numero di colture mediante isolamento da vari ambienti. L'individuazione delle caratteristiche da prendere in considerazione per gli starter vinari è sicuramente una fase importante del processo di selezione. Per tale motivo è gioco forza che tutti i caratteri desiderabili in uno starter non siano presenti nello stesso ceppo microbico. Dopo i test di identificazione i ceppi sottoposti a selezione verranno successivamente sottoposti alle varie prove per verificare la loro attitudine enologica (Vincenzini *et al.*, 2005).

Il **campionamento** avviene da vari ambienti naturali come il suolo del vigneto, l'uva, il mosto, ma anche dalle superfici di cantina. Ogni nicchia presenta vantaggi e svantaggi diversi quindi, viene scelta in base alle esigenze di studio del selezionatore. Per esempio numerosi sono gli studi basati sul reperimento dei lieviti dal mosto proveniente da uvaggi o più vigneti. Questo tipo di isolamento potrebbe dare risultati aberranti nella correlazione dei microrganismi con l'ambiente di provenienza poiché, durante la fermentazione per effetto di dominanza di alcuni ceppi si perde una grossa fetta di lieviti ecotipici.

Altri studi reperiscono i lieviti dall'uva facendo condurre la fermentazione in singoli sacchetti sterili. Con campionamenti di questo tipo si riesce a recuperare una grande quantità di lieviti ecotipici, ma aumenta lo sforzo di selezione per i caratteri enologici dei ceppi.

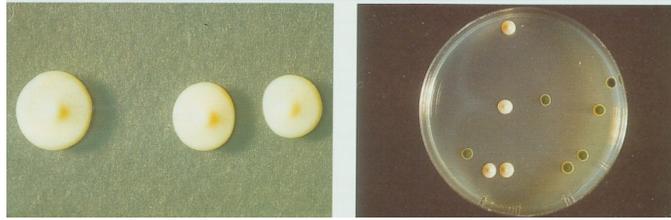
L'**isolamento** dei lieviti su terreno di crescita è una tappa fondamentale per poter raccogliere i ceppi singolarmente, ma presenta l'inconveniente rischioso di sovvertire i rapporti di ricorrenza di tali ceppi. In genere il terreno più diffusamente utilizzato in laboratorio, a questo scopo, è il *Wallerstein Laboratory Nutrient Agar* (WL) (Green and Greay, 1950) un terreno per nulla selettivo che consente di ottenere utili informazioni attraverso le differenti morfologie delle colonie. Altri terreni di crescita consigliati sono: *Yeast and Mould* (YM) (Wickerham, 1951), *Agar-Lisina* (AL) (Morris & Eddy, 1957). Questi in genere sono usati in fasi successive all'isolamento. In genere viene preferita la semina a

differenti diluizioni su terreni solidi che permette la conta delle CFU (unità formanti colonia) e di poter così risalire al numero totale di lieviti nel mosto.

L'**identificazione di specie** in passato è stata condotta principalmente con analisi di tipo fisiologico. Le prime classificazioni erano basate su differenze fenotipiche tra i lieviti come dimensioni e forma delle cellule, modalità di moltiplicazione, modalità di sporificazione, numero di spore per asco e la loro forma, fermentazione e assimilazione degli zuccheri (diverse fonti di carbonio) verificati con il test API, capacità di utilizzare i nitrati quale unica fonte di azoto, capacità di formare vero micelio e di sviluppare alla superficie dei liquidi con formazione di veli.

Altre indagini fenotipiche utilizzate per l'identificazione dei lieviti si basano sulla crescita in alcuni terreni come il già citato WL nutrient agar e l'Agar-Lisina.

Il terreno WL (Wallerstein Laboratory) è stato proposto negli anni cinquanta (Green e Gray, 1950) per la rilevazione di lieviti contaminanti nel processo di produzione della birra. La sua caratteristica saliente è di contenere un colorante, il verde di bromocresolo, che è in grado di essere assorbito in modo variabile dai lieviti. E' possibile quindi caratterizzare il microrganismo in base alla morfologia di colonia e alla colorazione che assume. Ceppi appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* assorbono scarsamente il verde di bromocresolo e assumono perciò una colorazione variabile dal crema al verde chiaro, la colonia in molti casi presenta una elevatura umbonata superficie liscia opaca, consistenza cremosa. Queste caratteristiche morfologiche vengono utilizzate nei birrifici per distinguere i lieviti inoculati da eventuali contaminanti. Recentemente l'uso di questo mezzo di crescita è stato proposto anche per il settore enologico (Cavazza *et al.*, 1992). E' stato osservato infatti che i principali lieviti di vigneto hanno la capacità di assorbire molto bene il colorante: il genere *Hanseniaspora*, il più diffuso sul grappolo, cresciuto su WL assume una colorazione verde intenso facilmente distinguibile dal gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. Si è visto però che alcuni ceppi di *S. cerevisiae* possono formare colonie con diversa morfologia, quindi questo approccio non può considerarsi decisivo perché alcune variazioni a livello di ceppo possono portare ad errori nell'attribuzione della specie.



**Fig 2.1.1** Morfologia di lieviti enologici su WL: a sinistra colonie di *Saccharomyces cerevisiae*, a destra una piastra contenente colonie appartenenti alle specie *Hanseniaspora uvarum* (colore verde intenso) e *Saccharomyces cerevisiae* (colore bianco, elevatura umbonata).

Come conferma, la procedura proposta nel settore enologico, prevede la coltivazione degli isolati con morfologia tipica su WL, in un terreno selettivo contenente come principale fonte d'azoto l'aminoacido lisina (Agar Lisina).

Queste condizioni non sono adatte alla specie *Saccharomyces cerevisiae* che non riesce a svilupparsi su piastra in presenza di lisina come fonte di azoto.

Le analisi di tipo fisiologico hanno l'inconveniente di dipendere dalle condizioni di coltura, che devono essere sempre identiche e non sono considerate sufficienti per identificare la specie di lievito (Riberau-Gayon *et al.*, 2000; Manzano *et al.*, 2005).

Alla fine dello scorso secolo si sono sviluppate analisi genotipiche che danno maggiore affidabilità all'identificazione in quanto non dipendono dallo stato fisiologico dei lieviti.

Da più di trent'anni le specie vengono suddivise, in modo non formale, in due gruppi, i *Saccharomyces sensu lato* e i *Saccharomyces sensu stricto*. Il primo è costituito da microrganismi con caratteristiche proprie del genere, ma che hanno habitat particolari e scarso vigore fermentativo (Lodder, 1970). Il secondo da tutte quelle specie con elevato interesse tecnologico (Wan der Walt, 1970).

Le specie appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* non sono facilmente distinguibili con le metodiche di microbiologia classica dunque sono state sviluppate recentemente tecniche molecolari per l'identificazione della specie.

Allo scopo di individuare relazioni filogenetiche tra diversi organismi in biologia molecolare viene spesso comparato il DNA ribosomale (rDNA), il polimorfismo di sequenza presente in questa regione del DNA viene utilizzato anche per identificare i lieviti a livello di specie.

E' stato sviluppato un metodo rapido per l'analisi di routine dei lieviti (Esteve-Zaezoso et al., 1999) basato sull'amplificazione mediante PCR del gene codificante l'rRNA della subunità 5,8S e le due zone fiancheggianti denominate Internal Transcribed Spacer (ITS1 e ITS2) e successiva analisi del profilo di restrizione utilizzando enzimi opportuni. Con questo metodo sono stati identificati più di un centinaio di specie appartenenti a 25 differenti generi, che includono ascomiceti e basidiomiceti.

E' stata proposta una tecnica basata sull'amplificazione del gene MET2 (Naumov et al., 2000b; Masneuf et al., 1996; Josepa et al., 2000) con lo scopo di con lo scopo di differenziare ceppi del genere *Saccharomyces*.

De Barros Lopez e collaboratori (1996) hanno sviluppato un'interessante tecnica utilizzando dei primer complementari ai siti di splicing presenti in corrispondenza degli introni, i frammenti amplificati presentano diversa lunghezza a seconda della specie all'interno del genere *Saccharomyces*.

Recentemente la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) sono state sviluppate per distinguere le specie appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. In questa tecnica i frammenti di DNA della stessa lunghezza ma con diversa sequenza nucleotidica sono separati come risultato di una diversa mobilità elettroforetica dovuta sostituzioni di un nucleotide o di pochi nucleotidi (Manzano et al., 2005; Cocolin et al, 2000).

Per la **caratterizzazione a livello di ceppo** sono state sviluppate numerose tecniche molecolari come l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) applicata per la prima volta ai lieviti da Schwartz e Cantor (1984). La PFGE è una tecnica laboriosa ma anche molto efficiente per individuare variabilità a livello di ceppo (Vezinhet et al., 1994). Utilizzando particolari metodi di estrazione, il DNA pressoché intatto viene caricato su gel di agarosio e viene sottoposto a campi elettrici alternati e diversamente orientati; le molecole di DNA (costituenti i singoli cromosomi) si riorientano ripetutamente e si separano in base alle loro dimensioni, dando origine ad un cariotipo elettroforetico. Confrontando i diversi pattern che ne derivano si è in grado di evidenziare differenze anche a livello di ceppo.

Sono stati sviluppati vari metodi basati sulla PCR come la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) in cui sequenze casuali di nucleotidi possono fungere da primer e permettere l'amplificazione di diversi frammenti di DNA genomico (Williams *et al.*, 1990). In questa tecnica i frammenti ottenuti dipendono per numero e dimensioni dalla sequenza del primer e del DNA genomico che funge da stampo. Primer che differiscono tra loro anche per un solo nucleotide danno origine a profili elettroforetici diversi. Inserzioni o delezioni che interessano le sequenze bersaglio, come pure mutazioni puntiformi a livello delle sequenze complementari al primer, impediscono l'amplificazione del frammento e generano un polimorfismo in grado di differenziare i microrganismi a livello di ceppo.

Lo svantaggio principale di questo approccio è la scarsa riproducibilità, determinata da diverse variabili tra cui il tipo di thermal-cycler, l'attività della DNA polimerasi, la concentrazione dei primer, la composizione del buffer e addirittura la manualità dell'operatore. La reazione va quindi standardizzata per aumentare la riproducibilità dell'esperimento (Budroni *et al.*, 2000).

Con questa tecnica è possibile comunque identificare i singoli individui a livello inter e intra-specifico (Gomes *et al.*, 2000; Deak, 1995).

Ampiamente applicato è anche il metodo dell'analisi di restrizione del DNA mitocondriale. Si tratta della tecnica RFLP applicata al solo DNA mitocondriale; non è richiesta necessariamente l'estrazione del DNA dai mitocondri e la purificazione mediante ultracentrifugazione in CsCl, ma si può tagliare direttamente il DNA totale con enzimi di restrizione che hanno il sito di riconoscimento, ricco in guanina e citosina, per cui tagliano frequentemente il DNA nucleare e raramente quello mitocondriale sfruttando la diversa composizione dei due tipi di DNA (quello nucleare più ricco in GC). I frammenti derivanti dal mitocondriale sono di dimensioni maggiori e quindi facilmente distinguibili su gel di agarosio poiché migrano più lentamente (Querol *et al.*, 1996).

Largamente utilizzate come bersaglio di amplificazione tramite PCR sono le regioni altamente ripetute del genoma di *S. cerevisiae*, note come interdelta: gli elementi  $\delta$  sono spesso associati alla regione LTR (long terminal repeats)

fiancheggiante i retrotrasposoni TY1 e TY2 nei lieviti, ma possono anche essere separati.

L'uso di protocollo rapido basato sull'analisi PCR delle regioni interdelta è stato proposto per la prima volta nel 1993 (Ness et al.) e migliorato da Legras e collaboratori (2003). Le regioni interdelta sono altamente ripetute nel genoma di *S. cerevisiae*, note come gli elementi  $\delta$  sono associati alla regione LTR (long terminal repeats) fiancheggiante i retrotrasposoni TY1 e TY2 nei lieviti. Gli elementi  $\delta$  possono anche trovarsi nel genoma separati dai retrotrasposoni. Sono stati descritti circa 300 elementi  $\delta$  nel genoma del ceppo S288C, quindi risultano dei buoni marcatori per l'identificazione di polimorfismi. Questo metodo è spesso utilizzato per analisi di routine dei ceppi di lievito (Lavalley et al., 1994) anche se meno discriminante rispetto alla tecnica dell'elettroforesi in campo pulsato menzionata prima (Vezinhet et al., 1994).

Altro metodo di caratterizzazione del DNA genomico utilizzato per individuare variabilità a livello di ceppo è l'analisi PCR delle regioni microsatellite che prevede l'utilizzo di primer complementari a regioni di DNA note come microsatelliti. I microsatelliti sono delle piccole sequenze di DNA ripetute in tandem (da una a sei basi) che variano nel numero delle ripetizioni e possono essere localizzate anche all'interno delle Open Reading Frames (ORF) (Legras et al., 2005). Sono estremamente variabili in lunghezza, come risultato di errori di replicazione del DNA, perciò mostrano un certo grado di polimorfismo tra individui della stessa specie. Alcuni autori hanno proposto l'utilizzo di combinazioni di primer complementari a diversi loci di microsatelliti per caratterizzare *S. cerevisiae*. L'analisi del polimorfismo dei microsatelliti è un metodo altamente riproducibile perché per la loro amplificazione sono utilizzati primer specifici ed alte temperature di annealing.

Sono stati costruiti recentemente primer omologhi alle regioni fiancheggianti gli introni del gene COX1 di *Saccharomyces cerevisiae*. Si tratta di un gene mitocondriale che codifica per la subunità maggiore della citocromo ossidasi *c* ed è considerato uno dei geni più ricchi in introni, presenti nei lieviti in numero variabile a livello di specie ma anche di ceppo (López et al., 2003).

Uno dei metodi più recenti basati su PCR, utilizza come oligonucleotidi gli elementi REP (repetitive extragenic palindromic) e gli elementi ERIC

(enterobacterial repetitive intergenic consensus), che sono stati usati in passato per determinare le relazioni tassonomiche nei batteri. In uno studio del 2004 (Hiero *et al.*, 2004) hanno permesso una caratterizzazione rapida, semplice ed affidabile di ceppi di lievito di riferimento e l'identificazione di ceppi isolati durante le fermentazioni.

## 2.2 MATERIALI E METODI

### 2.2.1 Ceppi di lievito

Per la messa a punto dei metodi di monitoraggio sono stati utilizzati i ceppi di collezione e commerciali elencati in tabella 1:

<i>Specie microbica</i>	CEPPO	PROVENIENZA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	444	Vason Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NT 45	ANCHOR Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EC1118	Lalvin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blastosel Gran cru	Perdomini Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Premium blanc 12V	Vason Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Enoferm QA23	Lalvin
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Nouveaux ferments	Vason Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ICV D-47	Lalvin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AEB	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Complete killer	Fermol grup
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blastosel Fr95	Perdomini Spa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VRB	Lallemand
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F15	Laffort
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DV10	Lallemand
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LV10	Intec

**Tab 2.2.1** Ceppi commerciali utilizzati.

Nel corso del progetto sono stati analizzati 659 isolati naturali di lievito da uve di Prosecco.

Ad ogni campione è stata assegnata una sigla alfanumerica: XYZ.

X è una lettera (P=Prosecco, C=Cartize, S=Scuola Enologica di Conegliano);

Y corrisponde al numero progressivo del campione;

Z corrisponde al numero progressivo della colonia isolata dal campione.

### 2.2.2 MEZZI COLTURALI E CONDIZIONI DI CRESCITA

#### Mezzo di isolamento

Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar (Green e Gray, 1950)

Sospendere 75 g di WL nutrient agar (Oxoid) in un litro d'acqua distillata.

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### **Mezzi di propagazione ordinaria**

YM (Yeast and Mould) (Wickerham, 1951)

Dosi per un litro:

3 g Estratto di lievito (OXOID)

3 g Estratto di malto (DIFCO)

5 g Peptone (DIFCO)

10 g Glucosio (PROLABO)

Portare a volume con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

YM agar

Stessa composizione del mezzo precedente con l'aggiunta di 16 g/l di Bacto Agar (DIFCO). Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti

### **Soluzioni**

Soluzione ringer (1/4 strenght) (Dept. of Health & Social Security, 1937)

Dissolvere una tavoletta di preparato (LAB M, International Diagnostics Group) in 500 ml di acqua deionizzata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### **Condizioni di crescita**

I ceppi di lievito sono stati cresciuti a 25°C; le colture liquide, quando necessario, sono state sottoposte ad agitazione pari a 100 oscillazioni al minuto.

## **2.2.3 CAMPIONAMENTO E ISOLAMENTO DI LIEVITI DA VIGNETO**

### **2.2.3.1 Campionamento**

Il campionamento è stato effettuato raccogliendo dei grappoli d'uva all'interno della zona DOC del Prosecco di Conegliano e Valdobbiadene nei giorni precedenti alla vendemmia.

All'interno di ciascun vigneto, sono stati scelti i filari più lontani da strade ed edifici (fonti eventuali di contaminazione con microrganismi non autoctoni) e scelti grappoli bassi, maturi quanto più possibile e non infestati da muffe visibili.

La raccolta è stata effettuata evitando in ogni fase di toccare i grappoli con le mani e sterilizzando periodicamente le forbici, allo scopo di limitare il più possibile le contaminazioni.

Sono stati utilizzati sacchetti sterili da stomaker, ciascuno dei quali è stato riempito con circa 500 g di uva (corrispondenti ad circa uno o due grappoli, a seconda delle dimensioni) e chiuso provvisoriamente per il trasporto al laboratorio (in scatole di polistirolo). Per ogni campione al momento della raccolta è stata compilata una scheda nella quale sono state inserite informazioni quali la data di campionamento, il nome dell'azienda, la località, l'esposizione, eventuali trattamenti antibiotrici effettuati, l'età e la varietà del vigneto.

All'arrivo in laboratorio ad ogni campione sono stati aggiunti 10 g di zuccheri (5 g fruttosio e 5 g glucosio) e 500 µl di anidride solforosa al 5% v/v. Ciascun sacchetto è stato chiuso con un tappo di gommapiuma precedentemente sterilizzato, allo scopo di evitare l'aumento di pressione all'interno del sacchetto mantenendo nel contempo l'ambiente interno isolato da quello esterno dal punto di vista microbiologico. Ogni grappolo è stato poi spremuto manualmente e lasciato fermentare spontaneamente (a temperatura ambiente) dalle 2 alle 3 settimane in presenza di bucce, raspo e vinaccioli. L'andamento della fermentazione è stato monitorato misurando il calo in peso per ogni sacchetto (indice della fermentazione degli zuccheri a CO<sub>2</sub>) e ricavando il grado alcolico prodotto secondo la formula:  $\text{calo peso \%} \cdot 1,285$  (Delfini, 1995)

### **2.2.3.2 Isolamento**

A fine fermentazione da ciascun sacchetto sono stati prelevati 3 ml di prodotto, sono state effettuate 6 diluizioni seriali (1:10) in soluzione Ringer e sono stati seminati su mezzo di isolamento WL 100 µl delle ultime tre diluizioni.

Dopo un periodo di incubazione di 5 gg a 25°C si è proceduto alla conta e al prelievo casuale di 16 colonie con morfologia tipica di *Saccharomyces cerevisiae*, cioè con colore variabile dal crema al verde, elevatura umbonata, superficie liscia opaca, consistenza cremosa.

### 2.2.3.3 Purificazione e conservazione degli isolati

Le colonie prelevate dalle piastre di isolamento sono state riseminate sul terreno di crescita YM. La procedura è stata ripetuta per garantire che ciascun isolato provenisse sicuramente da colonia singola. La coltura ottenuta con l'ultimo ristriccio su piastra è stata moltiplicata in terreno liquido YM per 24 ore a 25°C, successivamente centrifugata e risospesa in 2 ml di una soluzione sterile di mezzo colturale fresco e glicerolo al 40%. Le provette sono state conservate a -80°C.

### 2.2.4 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

Le amplificazioni via *Polimerase Chain Reaction* sono state condotte utilizzando il termociclatore iCycler (Bio-Rad). I primer, forniti in forma liofilizzata dalla ditta MWG Biotech, sono stati sciolti in acqua sterile alla concentrazione di 100 µM. Il campione di DNA per l'amplificazione è stato preparato risospesando con un puntale una singola colonia di lievito (1-2 mm di diametro) in 20 µl di acqua deionizzata sterile. Due microlitri della suddetta soluzione di lieviti sono stati usati direttamente nella miscela di amplificazione del DNA prolungando nel protocollo di amplificazione la fase di denaturazione iniziale (95°C per 5 min). Le prove di PCR sono state eseguite in volumi di reazione di 25 µl.

#### 2.2.4.1 Identificazione di *Saccharomyces sensu stricto* (Multiplex PCR)

L'identificazione delle colonie di *Saccharomyces sensu stricto* è avvenuta adottando il metodo messo a punto da Nardi *et al.* (2006). I vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni finali:

Componenti	Concentrazione finale
Primer SAC26F	0,2 µM
Primer SAC26R	0,2 µM
Primer SAC18SF	2 µM
Primer SAC18SR	2 µM
dNTPs (Amersham)	50 µM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi (Amersham)	0,02 U/µl
Buffer	1X
DNA	2 µl sospensione cellulare

I primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

PRIMER	Sequenza (5'-3')	LUNGHEZZA
<b>SAC26F</b>	GAGAGGGCAACTTTGGGRCCGT	22 nt
<b>SAC26R</b>	ACCATTATGCCAGCATCCTTGACTTAC	27 nt
<b>SAC18F</b>	CTGCGAATGGCTCATTAATCAG	23 nt
<b>SAC18R</b>	CCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATG	25 nt

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

<i>PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE</i>		
<b>Ciclo1 (1X)</b>	94°C	5'
<b>Ciclo2 (35X)</b>	94°C	30''
	54°C	30''
	72°C	1'30''
<b>Ciclo3 (1X)</b>	72°C	5'
<b>Ciclo4 (1X)</b>	15°C	∞

#### 2.2.4.2 Condizioni di amplificazione della regione ITS1-5,8S-ITS2 del rDNA

I vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni finali:

ITS1	2 µM
ITS4	2 µM
dNTPs	50 µM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,02 U/µl
Buffer	1X
DNA	2 µl sospensione cellulare

I primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

PRIMER	LUNGHEZZA	SEQUENZA (5'-3')	FONTE
ITS1	19 bp	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> ,1990
ITS4	20 bp	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> ,1990

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

<i>PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE</i>		
<b>Ciclo1 (1X)</b>	95 °C	5'
<b>Ciclo2 (35X)</b>	95 °C	30''
	53,5 °C	45''
	72°C	90''
<b>Ciclo3 (1X)</b>	72°C	5'
<b>Ciclo4 (1X)</b>	15°C	∞

#### 2.2.4.3 Condizioni di amplificazione delle regioni interdelta

I vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni finali:

Primer F	1 µM
Prmer R	1 µM
dNTPs	200 mM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,02 U/µl
Buffer	1X
DNA	80 ng di DNA

Sono state utilizzate le coppie di primer delta21/delta12 e delta2/delta12.

Le sequenze dei primer sono riportate nella seguente tabella:

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZA (5'-3')</b>	<b>FONTE</b>
Delta12 F	TCAACAATGGAATCCCAAC	Legras et al., 2003
Delta1 F	CAAAATTCACCTATATCT	Ness et al., 1993
Delta2 R	GTGGATTTTTATTCCAAC	Ness et al., 1993

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

<i>PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE</i>		
<b>Ciclo1 (1X)</b>	95 °C	4'
<b>Ciclo2 (35X)</b>	95 °C	30''
	46 °C	30''
	72°C	90''
<b>Ciclo3 (1X)</b>	72°C	10'
<b>Ciclo4 (1X)</b>	15°C	∞

#### **2.2.4.4 Condizioni di amplificazione dei microsatelliti**

I vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni finali:

Primer F	1 µM
Prmer R	1 µM
dNTPs	50 µM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,02 U/µl
Buffer	1X
DNA	80 ng di DNA

Le sei coppie di primer utilizzate sono riportate nella seguente tabella:

PRIMER	SEQUENZA (5'-3')
C4 F	AGGAGAAAAATGCTGTTTATTCTGACC
C4 R	TTTCCTCCGGGACGTGAAATA
C5 F	TGACACAATAGCAATGGCCTTCA
C5 R	GCAAGCGACTAGAACAACAATCACA
C8 F	CAGGTCGTTCTAACGTTGGTAAAATG
C8 R	GCTGTTGCTGTTGGTAGCATTACTGT
C11 F	TTCCATAACCGTCTGGGATT
C11 R	TGCCTTTTTCTTAGATGGGCTTTC
ScYOR267c F	TCATAACGTCAACACTGCTGCCAA
ScYOR267c R	GGATCTACTTGCAGTATACGGG
SCAAT1 F	AAAGCGTAAGCAATGGTGTAGATACTT
SCAAT1 R	CAAGCCTCTTCAAGCATGACCTTT

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

<i>PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE</i>		
<b>Ciclo1 (1X)</b>	95 °C	4'
<b>Ciclo2 (35X)</b>	94 °C	30''
	53°C	30''
	68°C	1'
<b>Ciclo3 (1X)</b>	68°C	10'
<b>Ciclo4 (1X)</b>	15°C	∞

### 2.2.5 RESTRIZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

I prodotti di amplificazione della regione ITS1-5,8S-ITS2 del rDNA sono stati digeriti con gli enzimi *HaeIII* e *MaeI* (Amersham). Le digestioni sono state eseguite in volumi di reazione di 20 µl contenenti 10 U di enzima e 10 µl amplificato. Le reazioni sono state condotta a 37° C per 16 h.

## **2.2.6 ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE**

### **2.2.6.1 Estrazione del DNA totale**

La patina ottenuta da una coltura cresciuta in terreno YM solido per 48 h a 25°C è stata risospesa con 1 ml di acqua sterile e successivamente centrifugata a 14000 rpm per 3 minuti in una microcentrifuga Eppendorf.

Una volta drenato il liquido, le cellule sono state risospese nuovamente in 500 ml di una soluzione contenente enzima litico ottenuto da *Rhizoctonia solani* (Sigma) (25 mg/ml in 1M sorbitolo, 0,1M di EDTA, pH 7.5). La sospensione è stata agitata con vortex per pochi secondi. I campioni sono stati incubati a 45°C per due ore nelle quali sono stati periodicamente agitati per evitare la riformazione del pellet. Alla fine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti ed è stato eliminato il surnatante.

Successivamente, le cellule sono state risospese nuovamente in 500 ml di TE (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA a pH 7.4) e sono stati aggiunti 50 µl di SDS 10%. I campioni sono stati incubati in bagnetto termostatico a 65°C per 30 minuti. Al termine sono stati aggiunti 200 µl di acetato di potassio 5 M e si sono lasciati i campioni in ghiaccio per 30 minuti. Le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 5 minuti e il surnatante trasferito in una provetta tipo Eppendorf da 1.5 ml. Dopo aver aggiunto 600 µl di isopropanolo freddo i campioni sono stati tenuti a temperatura ambiente per 5 minuti agitando per inversione, e quindi centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti. E' stato eliminato il surnatante e aggiunti 500 µl di etanolo 70%. Dopo una centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti e l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato asciugato per 1 h a 37°C.

I campioni sono stati risospesi in 50 µl di acqua sterile, a cui sono stati aggiunti 1,5 µl (10 mg/ml) di RNasi (Amersham Bioscience E70194Z) e lasciati a temperatura ambiente per 15-20 minuti. Infine, i campioni sono stati conservati a -20°C.

### **2.2.6.2 Restrizione del DNA totale**

Le digestioni del DNA totale sono state eseguite in volumi di reazione di 15 µl contenenti 10 U di enzima *HinfI* (Amersham) e 10 µl di DNA estratto. Le reazioni sono state condotte a 37°C per 2 h.

## 2.2.7 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO

La separazione di frammenti lineari di DNA è avvenuta mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il gel contiene 0,1 µg/ml di etidio bromuro per la visualizzazione del DNA all'ultravioletto. La corsa è effettuata in un apparato per elettroforesi orizzontale usando TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM acido borico, 1 mM EDTA) come tampone di corsa e applicando una differenza di potenziale variabile tra 50 e 110 V.

Sono state utilizzate le seguenti concentrazioni di agarosio:

- 1,2% per separare gli amplificati ottenuto con i primer SAC26F/SAC26R e 18SF/18SR;
- 1,5% per separare gli amplificati ottenuti con i primer ITS1/ITS2 e i prodotti di restrizione ottenuti con gli enzimi *HaeIII* e *MaeI* e per separare i frammenti amplificati con i primer delta;
- 1% per separare i frammenti del DNA mitocondriale digeriti con *HinfI*;
- 2,5% per separare amplificati ottenuti con l'analisi delle sequenze microsatellite.

Dopo la corsa il i gel sono stati osservati tramite transilluminatore UV alla lunghezza d'onda di 312 nm e fotografati con il sistema EDAS 290 (Kodak).

### 2.2.7.1 Analisi dei profili elettroforetici

Per l'analisi delle bande elettroforetiche del DNA mitocondriale è stato utilizzato il programma GelComparII V. 3.5 (Applied Maths).



In particolare la zona di Conegliano è stata suddivisa in 17 località in cui sono stati campionati 148 campioni nel 2004 e altri 57 nel 2005 per un totale di 205 campioni. E' stata programmata una seconda fase di campionamento nel 2005 solo nella zona di Conegliano dato l'esiguo numero di colonie raccolto durante l'annata 2004. Nella zona di Valdobbiadene, nonostante le dimensioni più ridotte, sono state identificate 20 località e raccolti 206 campioni tutti nel 2004 (tabella Tab. 2.3.1).

	<i>Totale</i>	<i>Conegliano (%)</i>	<i>Valdobbiadene (%)</i>
<i>Località</i>	37	45,9	54,1
<i>Aziende</i>	97	47,8	52,2
<i>Campioni</i>	411	49,9	50,1

**Tab. 2.3.1** Distribuzione campionamenti nella zona del Prosecco doc di Conegliano e Valdobbiadene 2004-2005.

In generale è possibile affermare che la distribuzione del campionamento ottenuta copre in modo ottimale il territorio considerando sia le caratteristiche geografiche che le realtà produttive.

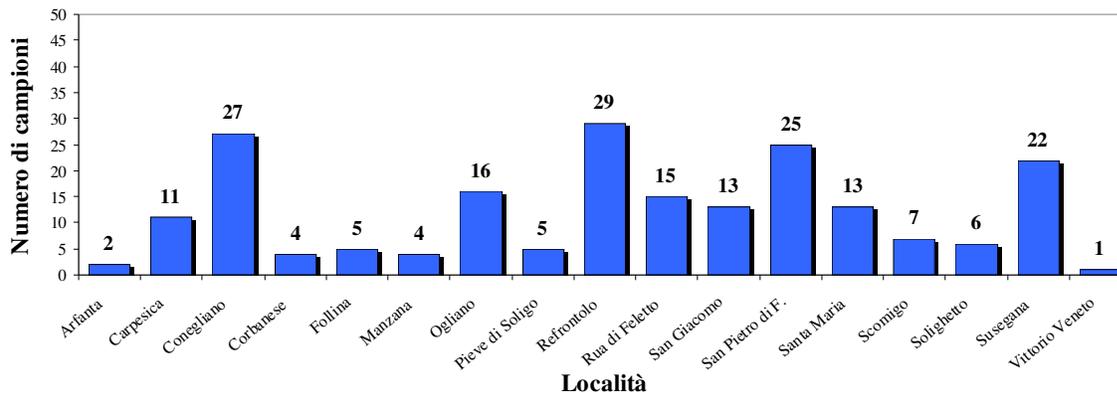
### **2.3.1.1 La raccolta dei grappoli in relazione alla localizzazione geografica**

E' possibile ottenere informazioni sull'efficacia del campionamento osservando la distribuzione dei grappoli raccolti in relazione alle località considerate (figura 2.3.2).

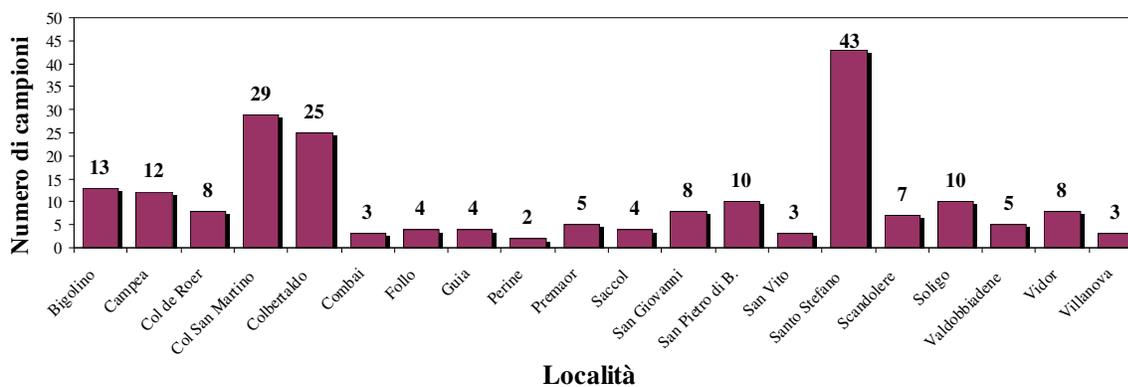
Considerando la zona di Conegliano il numero di grappoli raccolti per località varia da 1 a 29. Questa distribuzione estremamente variabile asseconda esigenze tecniche di campionamento, caratteristiche del territorio e presenza di realtà produttive.

Un solo campione è stato raccolto nell'area di Vittorio Veneto in quanto è una località poco rappresentata per quanto riguarda il numero di aziende.

Molti campioni (27) sono stati raccolti nella zona di Conegliano, in quanto facilmente raggiungibile essendo la più vicina alla sede dei laboratori universitari dislocati nella provincia di Treviso. Un numero elevato di grappoli (16) è stato raccolto nella zona di Ogliaio, giustificato anche in questo caso dalla facilità di



A)



B)

**Fig. 2.3.2** Distribuzione dei campioni prelevati in relazione alle località nelle zone di Conegliano (A) e Valdobbiadene (B).

accesso in quanto nell'area sono localizzate aziende con cui il gruppo di ricerca collabora.

Altre località con le stesse caratteristiche sono Refrontolo e San Pietro di Feletto in cui sono stati prelevati rispettivamente 29 e 25 grappoli. In questi casi il numero elevato non è giustificato dalle dimensioni (sono tutte località piccole) ma dalla cospicua presenza di aziende vitivinicole. L'area di Susegana, in cui sono stati prelevati 22 campioni, è caratterizzata al contrario da poche aziende, ma dotate di grandi estensioni viticole.

Anche nella zona di Valdobbiadene la distribuzione dei grappoli raccolti è molto variabile, da un minimo di 2 ad un massimo di 43.

Due campioni sono stati raccolti in località Perine, una piccola area caratterizzata dalla presenza di poche aziende. Il numero maggiore di campioni è stato raccolto in località Santo Stefano (43 campioni), una piccola parcella ricca di aziende che comprende l'area di produzione del Cartizze, particolarmente interessante per l'alta qualità del prodotto. Altre due località sono state oggetto di un massiccio campionamento: Col San Martino (29 campioni) e Col Bertaldo (25 campioni). Si tratta di piccole parcelle entrambe situate nella zona che insieme alla collina del Cartizze storicamente producono lo spumante più rinomato.

### **2.3.1.2 Trattamento dei campioni e isolamento di *Saccharomyces sensu stricto***

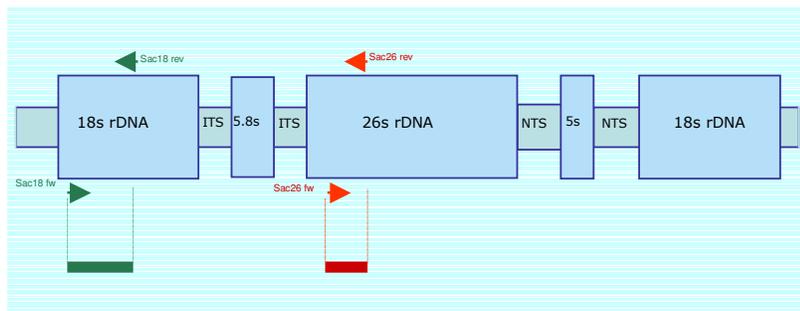
I campioni raccolti in vigneto sono stati trasferiti in laboratorio dove sono stati aggiunti ad ogni campione zucchero e anidride solforosa per favorire lo sviluppo di lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. Inoltre i lieviti di questo gruppo sono più resistenti alla SO<sub>2</sub> rispetto agli apiculati che generalmente dominano la prima fase delle fermentazioni spontanee. Gli zuccheri sono stati aggiunti come fonte di nutrienti per favorire lo sviluppo della microflora poiché, l'uva, essendo stata raccolta precocemente, non aveva ancora raggiunto il livello ottimale di maturazione.

I campioni così allestiti sono stati lasciati fermentare spontaneamente e durante questo periodo è stato monitorato il calo in peso. La fermentazione è stata ritenuta conclusa quando il peso del campione si è mantenuto costante.

A fine fermentazione mediante una serie di diluizioni e successivo trasferimento di aliquote su terreno di crescita WL, è stato possibile isolare i lieviti indigeni e mediante conta su piastra stabilire la loro concentrazione nei mosti fermentati che si attesta in un intervallo compreso tra 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/ml. Come conferma gli isolati con morfologia tipica su WL sono stati coltivati in un terreno Agar-Lisina. Inizialmente, quindi è stata seguita la procedura proposta in letteratura. I campioni fermentati che presentavano su WL morfologie riconducibili, anche se non sempre identiche, a quella tipica del gruppo *Saccharomyces* sono stati considerati per ulteriori caratterizzazioni. Per ciascun campione positivo sono state isolate un massimo di 16 colonie e ristriciate su Agar Lisina per la conferma.

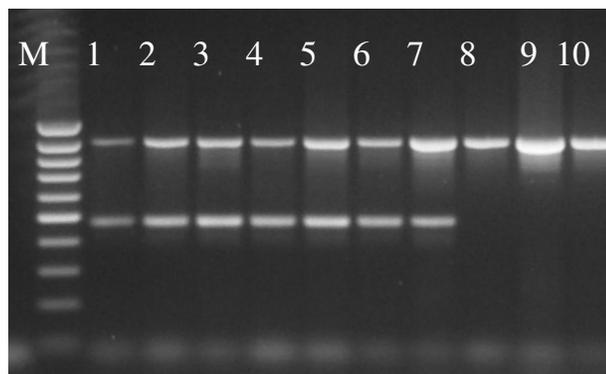
Inaspettatamente tutti gli isolati hanno manifestato una certa crescita sul terreno di conferma, anche se con un forte grado di variabilità, dimostrandosi, come molti test fenotipici, nelle condizioni sperimentali utilizzate poco affidabile. Tutti gli isolati con morfologia compatibile sono stati purificati, e conservati in glicerolo. Con lo scopo di ottenere un'identificazione non ambigua degli isolati conservati, è stata utilizzata la tecnica di Multiplex PCR che permette di identificare i lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*. Il metodo di Multiplex PCR messo a punto dal gruppo di Microbiologia del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di (Nardi *et al.*, 2006) prevede la possibilità di discriminare questo gruppo di lieviti rispetto agli altri presenti in ambiente enologico in un unico step di amplificazione sulla base di differenze nucleotidiche all'interno della regione di DNA codificante per l'rRNA ribosomale (rDNA). Il tratto di DNA che porta le maggiori informazioni relative alle differenze tra le specie di lievito è la regione D1/D2 del DNA 26S, di cui sono disponibili in GenBank informazioni relative alle caratteristiche di sequenza in moltissime specie di lieviti. E' stato possibile perciò identificare due brevi tratti che, in base a un allineamento multiplo (ClustalW) di questo tratto in un certo numero di lieviti di riferimento appartenenti a svariati generi, risultavano altamente conservati solo nel gruppo dei *S. sensu stricto*. I due tratti di DNA sono stati utilizzati per costruire i primer di amplificazione (Sac26).

Una seconda coppia di primers (18S) è stata disegnata per avere un controllo interno di amplificazione: in questo caso è stata scelta una sequenza appartenente alla regione 18S del rDNA, altamente conservata tra tutti i lieviti analizzati (figura 2.3.3).



**Fig. 2.3.3** Regione di DNA codificante l'rRNA ribosomale nei lieviti. Sono indicate le posizioni dei primer utilizzati per identificare *S. sensu stricto*.

Il metodo così costituito è stato testato su tutti i ceppi tipo appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*, *Saccharomyces sensu lato* ed una selezione di specie (17) di interesse enologico. I risultati ottenuti hanno confermato che si possono discriminare correttamente i lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* (7 specie) dagli altri lieviti presenti in ambiente enologico. In particolare i primi danno luogo all'amplificazione di due frammenti di DNA (della lunghezza di 460 e 862 bp) mentre gli altri ad uno solo (862 bp); i suddetti amplificati sono facilmente visualizzabili come bande distinte in un'elettroforesi su gel di agarosio (figura 2.3.4).



**Fig. 2.3.4** Multiplex PCR. M standard di peso molecolare (100bp, Amersham Bioscience) *S. sensu stricto*: 1) *S. bayanus*, 2) *S. cariocanus*, 3) *S. cerevisiae*, 4) *S. kudriavzevii*, 5) *S. paradoxus*, 6) *S. pastorianus*, 7) *S. mikatae*; *S. sensu lato*: 8) *S. barnetti*, 9) *S. bulderi*, 10) *S. servazii*.

L'amplificazione viene eseguita direttamente sulle cellule di lievito lisate termicamente, evitando ogni procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico. La procedura di estrazione del DNA, della durata di 3-5 ore, e la precedente fase di crescita dei microrganismi in coltura liquida (che necessita di almeno una notte di incubazione) sono state in questo modo eliminate completamente.

Utilizzando, prima l'analisi delle morfologie su WL e poi il test di PCR appositamente messo a punto è stato possibile fare una valutazione accurata dell'appartenenza degli isolati al gruppo *S. sensu stricto*. Come si può osservare dai risultati riportati in tab. 2.3.2 nella maggior parte dei campioni non è stato possibile trovare colonie con morfologia compatibile a quella di *S. sensu stricto*,

infatti gli isolati cresciuti su WL presentavano principalmente morfologie molto diverse rispetto a quella umbonata, cremosa e bianca che è tipica di *Saccaromyces*. La morfologia più ricorrente (colonia lucida, piatta, verde) aveva caratteristiche riconducibili al genere *Hanseniaspora*. Molte altre con bordi irregolari e varie sfumature di colore si sono presentate con minore frequenza. La maggior parte dei grappoli positivi è stato raccolto nella zona di Valdobbiadene. Solo nel 18% dei campioni sono state isolate colonie con una morfologia in WL riconducibile a *Saccharomyces cerevisiae*, anche se è importante considerare che circa il 17% dei grappoli non ha dato origine ad una fermentazione spontanea. Il numero di campioni si è ridotto ulteriormente dopo l'analisi in PCR così che solo il 7,5% è risultato contenere realmente *S. sensu stricto*.

	<b><i>Campioni totali</i></b>	<b><i>Campioni contenenti S. sensu stricto (morfologia WL)</i></b>	<b><i>Campioni contenenti S. sensu stricto (multiplex PCR)</i></b>
<b><i>Conegliano</i></b>	205	38	11
<b><i>Valdobbiadene</i></b>	206	36	20
<b><i>Totale</i></b>	411	74	31

**Tab. 2.3.2** Identificazione del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* nei campioni considerati mediante analisi morfologica e genetica eseguita sugli isolati.

Questi risultati sono confermati anche dai dati riportati in tab. 2.3.3 Infatti delle 659 colonie isolate, solo 308 sono costituite da individui appartenenti al gruppo di *S. sensu stricto* e di queste il 70% provengono dalla zona di Valdobbiadene.

Per quanto riguarda il totale degli isolati con morfologia tipica solo il 47% sono risultati dei veri *S. sensu stricto*. Questa percentuale relativamente bassa di isolati positivi è giustificata anche dal fatto che in fase di isolamento sono state sottoposta a PCR anche colonie dalla morfologia incerta per non rischiare di escludere qualche individuo appartenente al gruppo *Saccaromyces*.

	<i>S. sensu stricto (morfologia WL)</i>	<i>S. sensu stricto (multiplex PCR)</i>
<b><i>Conegliano</i></b>	284	92
<b><i>Valdobbiadene</i></b>	375	216
<b><i>Totale</i></b>	<b>659</b>	<b>308</b>

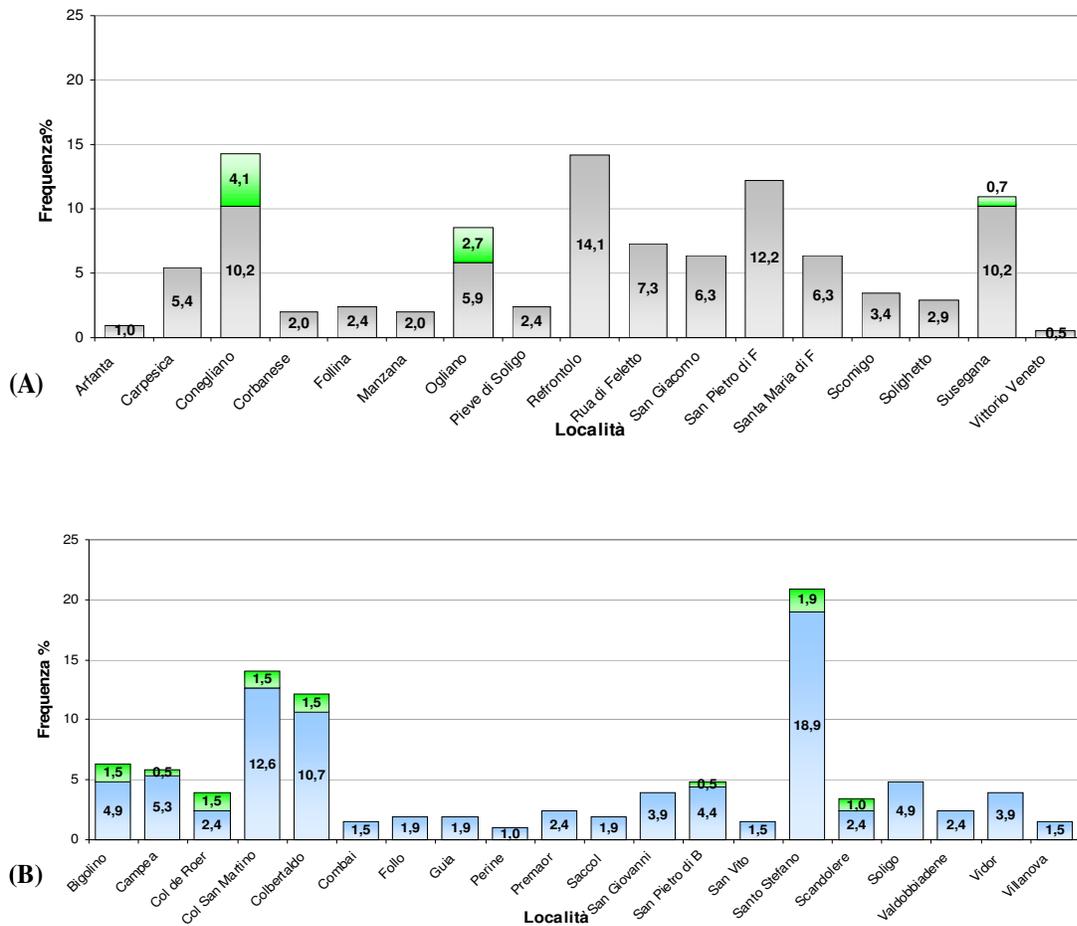
**Tab. 2.3.3** Quantificazione di *Saccharomyces sensu stricto* mediante analisi genetica (multiplex PCR) eseguita sugli isolati con morfologia tipica.

### 2.3.1.3 Distribuzione geografica dei campioni contenenti *S. sensu stricto*

Come si vede dalla figura 2.3.5 nella zona di Conegliano, in relazione al numero di campioni analizzati, solo il 7,5% hanno permesso l'isolamento di *S. sensu stricto*. Questi provengono solo da 3 località sulle 17 campionate: Ogliano, Conegliano e Susegana. E' interessante notare che queste località sono tra quelle più campionate della zona. A Refrontolo, come a S. Pietro e Rua di Feletto non è stato ottenuto nessun campione positivo pur essendo località molto campionate.

A Valdobbiadene in relazione al numero di campioni solo il 9,7% hanno permesso l'isolamento di *S. sensu stricto*, percentuale un po' più alta di quella precedente. Questi isolati sono stati ottenuti da 8 località su 20, raggruppabili in 4 sottozone: S. Pietro di Barbozza, S. Stefano che rientrano nella piccola zona del Cartizze; più a sud Colbertaldo, Col de Roer, Col S. Martino; Bigolino, Scandolere; Campea. Anche in questo caso i *S. sensu stricto* sono stati isolati dalle località più campionate, ma ci sono anche località che pur essendo state meno campionate presentano la stessa frequenza di positivi (1,5%) (Col de Roer, Bigolino).

I risultati ottenuti in questo programma di campionamento non possono essere comparati con selezioni precedenti fatte in questa zona poiché, i campionamenti in quei casi furono eseguiti in cantine e non in vigneti.



**Fig. 2.3.5** Distribuzione dei campioni contenenti *S. sensu stricto* ( ) in relazione alle località nelle zone di Conegliano (A) e Valdobbiadene (B).

### 2.3.2 Caratterizzazione ceppo-specifica dei *S. sensu stricto*

#### 2.3.2.1 Analisi di restrizione del DNA mitocondriale

Per ottenere una caratterizzazione ceppo-specifica degli isolati identificati come *S. sensu stricto* è stato scelto un metodo presente in letteratura da diversi anni (Querol *et al.*, 1996) che prevede l'analisi di profili di restrizione del DNA mitocondriale mediante digestione enzimatica del DNA totale.

Questo è il sistema di caratterizzazione genetica più utilizzato per identificare ceppi appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in particolare impiegando *HinfI* come enzima di restrizione (Lopez *et al.*, 2001; Schuller *et al.*, 2004). E' una tecnica che offre molti vantaggi, riproducibilità e la rapidità di esecuzione innanzitutto.

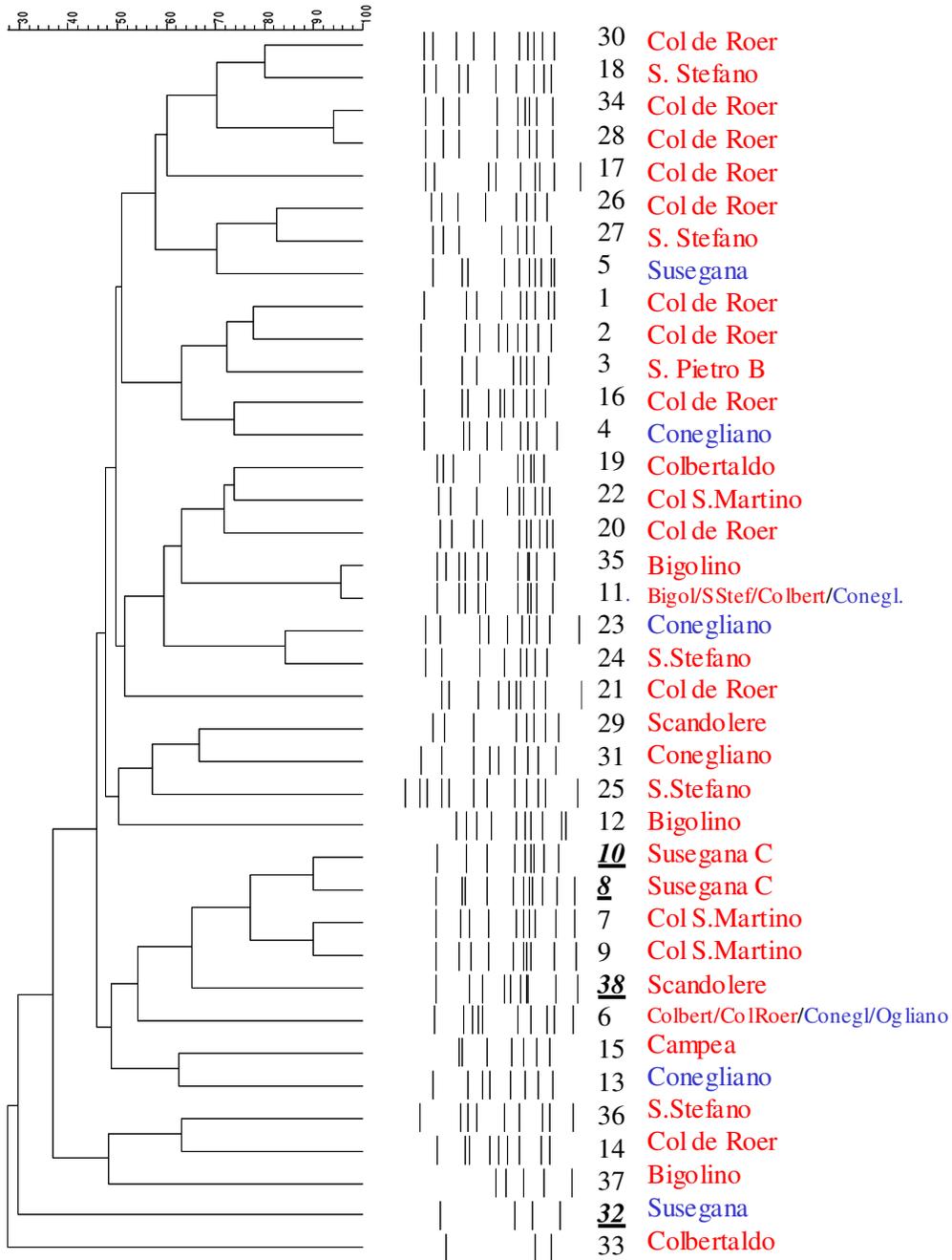
Il confronto dei profili di restrizione è stato fatto utilizzando il software GelComparII che è in grado, mediante la costruzione di una matrice, di calcolare il livello di similarità tra profili ed esprimerlo mediante la costruzione di un dendrogramma. Questa analisi è stata condotta sui 308 isolati, attribuiti precedentemente al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* mediante PCR .

Nella costruzione della matrice è stato utilizzato il coefficiente di similarità di Dice che considera la posizione delle bande elettroforetica, ma non la sua intensità. Inoltre nella costruzione del dendrogramma, determinato con il metodo di associazione UPMGA, i valori dei parametri “ottimizzazione” e “tolleranza”, che determinano il grado minimo di variabilità di un profilo rispetto a quelle più simile, sono stati quelli consigliati dal programma. In queste condizioni, sottoponendo ad analisi il medesimo ceppo più volte si è ottenuto un grado di similarità di circa 98%. Tale valore è stato utilizzato come soglia per la determinazione del numero di profili presenti. In questo modo i 308 isolati sono stati raggruppati in 38 profili. La relazione di similarità tra i 38 gruppi ottenuti è rappresentata nel dendrogramma riportato nella figura 2.3.6.

L’elevato grado di variabilità tra i profili è dimostrato dal fatto che la maggior parte dei nodi di biforcazione del dendrogramma si collocano ad un grado di similarità inferiore al 70%. In particolare ad un livello di similarità del 30% si separano 2 profili con caratteristiche di DNA mitocondriale molto diverse rispetto agli altri. Un secondo nodo ad un livello di similarità pari al 38% separa un piccolo gruppo di 3 profili (14, 36 e 37) mentre la maggior parte dei profili si trova collocato in un grosso gruppo che mostra una similarità del 46%.

Considerando la frequenza dei profili sul totale dei ceppi analizzati (figura 2.3.7) si osserva che il profilo 6 è il più rappresentato (27,6%) seguito dal profilo 11 (17,2%), mentre i profili 15, 19, 29, 36 e 38 si attestano ad una percentuale che va dal 4 al 5% circa. Tutti gli altri sono presenti in percentuale inferiore al 3%, tra questi 12 profili sono stati osservati in un solo caso.

L’analisi di restrizione del DNA mitocondriale è stata eseguita anche su un certo numero di ceppi commerciali, quelli maggiormente diffusi nella zona. Abbiamo potuto verificare che i ceppi isolati con maggiore frequenza (6 e 11) presentano un profilo uguale a quello di alcuni ceppi commerciali.



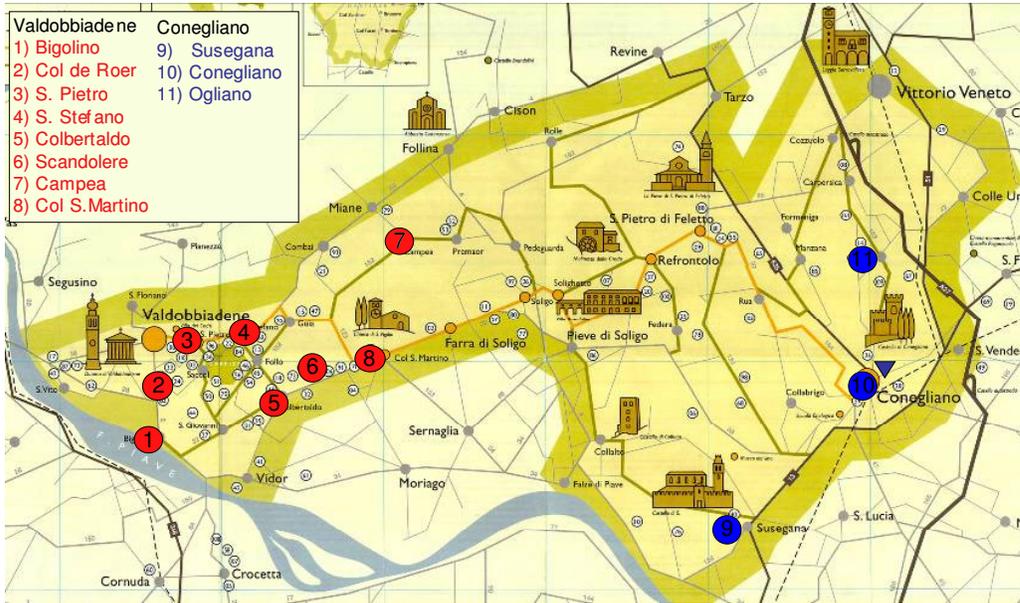
**Figura 2.3.6.** Dendrogramma di similarità dei 37 diversi profili di restrizione di mtDNA calcolato con il coefficiente DICE (numero e dimensione delle bande) secondo il metodo di associazione UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Association). Software GelComparII.

Altri due profili, il 36 ed il 13, sono assimilabili a ceppi commerciali ma questi ultimi sono stati ritrovati a frequenze più basse, 0,97% e 3,9% rispettivamente.

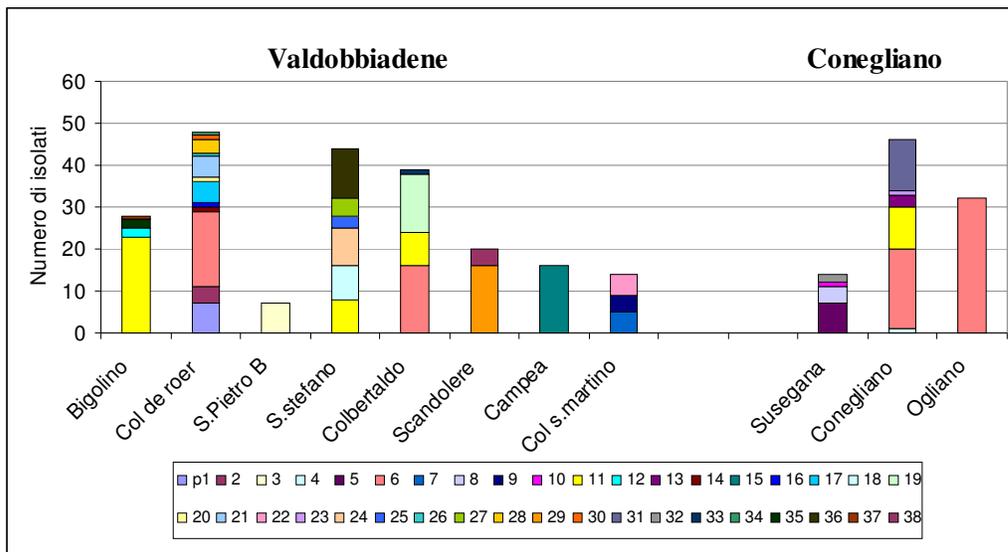
Mettendo in relazione i diversi profili e la loro presenza nello stesso campione di isolamento e quindi su di un singolo grappolo (figura 2.3.8) si osserva che nella maggior parte dei casi è presente un unico ceppo. Infatti, considerando i 31 campioni positivi, 22 (74%) contenevano isolati con profilo elettroforetico riconducibile ad uno stesso gruppo, indicando che la fermentazione è stata condotta da un solo ceppo dominante, mentre 3 (9,7%) dei grappoli positivi contenevano due profili, altri 3 (9,7%) ne contenevano tre. In un solo caso (3,2%) sono stati isolati 4 profili diversi ed eccezionalmente, in un solo campione, ne sono stati trovati 9.

La distribuzione dei profili è stata messa in relazione anche alle diverse aree in cui è stato suddiviso il territorio della DOC (figura 2.3.8 e figura 2.3.9). Su di un totale di 37 località campionate, solo 11 hanno permesso l'isolamento di *S. sensu stricto*. Tre (Ogliano, Conegliano, Susegana) sono localizzate nella zona di Conegliano, mentre 8 (Campea, S. Stefano, S. Pietro di Barboza, Scandolere, Bigolino, Col Bertaldo, Col de Roer, Col S. Martino) si trovano nella zona di Valdobbiadene. Quest'ultima ha permesso l'isolamento della maggioranza dei ceppi. Infatti, il maggior numero proviene dalle località Col di Roer in cui sono stati riscontrati 12 profili diversi e S. Stefano in cui i profili sono 6. Il minor numero, un solo profilo, proviene da Campea.

I ceppi con profilo 6 e 11, con profilo sovrapponibile a quello di alcuni ceppi commerciali, oltre ad essere quelli numericamente isolati in maggiore quantità sono anche presenti in più microaree di isolamento. Questo risultato è in accordo con i alcuni dati presenti in letteratura (Valero et al., 2005) che riportano possibili contaminazioni di lieviti selezionati anche in vigneto, trasportati mediante macchine agricole. In particolare il profilo 11 è stato isolato nelle località di S. Stefano, Scandolere, Bigolino, Col Bertaldo, Col de Roer e Ogliano. Il profilo 6 è stato isolato ad Ogliano, Conegliano, Col de Roer e Col Bertaldo. Tutti gli altri gruppi invece sembrano essere tipici della microarea di isolamento, essendo presenti ciascuno in una località soltanto.



**Fig. 2.3.8** Località da cui sono stati isolati lieviti appartenenti al gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* all'interno del territorio costituente il Distretto del Prosecco DOC di Conegliano e Valdobbiadene.



**Fig. 2.3.9** Numero di lieviti appartenenti al gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* raccolti nei vari siti di isolamento, i diversi colori corrispondono ai differenti profili genetici

Confrontando le relazioni di similarità riportate nel dendrogramma in alcuni casi è stato possibile osservare delle correlazioni con la distribuzione geografica dei ceppi. In località Susegana sono stati isolati 4 profili diversi (32, 5, 8,10), mentre 32 e 5 hanno un basso livello di similarità, 8 e 10 sono separati da un unico nodo posizionato ad una percentuale di similarità di circa il 90% e provengono dallo stesso grappolo. La stessa situazione si verifica tra i profili i profili 34 e 28 isolati a Col de Roer (similarità 94%) e tra i profili 35 e 11 di Bigolino (similarità 95%). Infine i profili 7 e 9 (similarità 91%) sono stati isolati entrambi a Col S. Martino questa volta da grappoli diversi.

### **2.3.2.2 PCR delle regioni interdelta**

Poiché l'analisi di restrizione del DNA mitocondriale individua polimorfismi di lunghezza esclusivamente a livello del DNA mitocondriale, il passo successivo è stato quello di caratterizzare i ceppi con profilo 6 e profilo 11 utilizzando delle metodiche in grado di evidenziare eventuali polimorfismi a livello di DNA genomico.

L'analisi PCR delle regioni interdelta è stata eseguita utilizzando le coppie di primer delta12-delta2 e delta12-delta21 (Legras et al, 2003). I primi primer disegnati per questo tipo di analisi sono stati i primer delta1 e delta2 all'interno dell'elemento  $\delta$  "YOLC delta3" (Ness et al., 1993). In un successivo lavoro Legras e collaboratori (2003) hanno proposto due nuovi primer nella zona maggiormente conservata sempre all'interno di YOLC delta3. Questi primer sono il delta12 (disegnato vicino al primer delta1) e delta 21 (60 bp a monte del primer delta2). Dai risultati della ricerca in Blast per comparare il grado di omologia dei quattro diversi primer con i 305 elementi  $\delta$  interspersi nel genoma di *S. cerevisiae* è emerso che gli elementi  $\delta$  potenzialmente riconosciuti dal primer delta12 sono 180 contro i 34 riconosciuti dal primer delta1. L'utilizzo del primer delta12 rispetto al primer delta1 dovrebbe quindi migliorare l'efficienza. Invece il primer

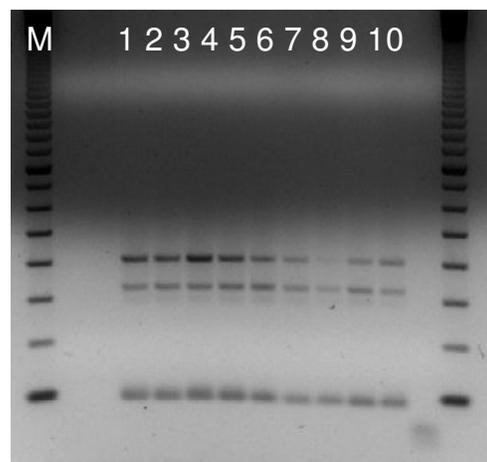
delta 21 ha un'efficienza simile a delta2, rispettivamente 179 e 172 siti di ibridazione.

Quindi si è deciso di eseguire due PCR per ogni ceppo utilizzando sia la coppia di primer delta21/delta12 che la coppia di primer delta2/delta12.

Non sono stati analizzati tutti gli isolati aventi profilo 6 e profilo 11, ma sono stati considerati tra gli individui caratterizzati dai due profili solo quelli la cui crescita è stata saggiata in mosto di prosecco (vedi capitolo 3).

Sono stati analizzati 10 dei 53 isolati con profilo 11 e comparati con il corrispondente ceppo commerciale Premium blanc 12V e 14 degli 85 isolati con profilo 6 e comparati i ceppi commerciali AEB Complete killer, Blastosel Fr95 e ICV D-47 caratterizzati dal medesimo profilo mitocondriale.

Dalla caratterizzazione effettuata con entrambe le coppie di primer delta non sono emerse differenze tra gli isolati e i ceppi commerciali (figura 2.3.10). Solo il ceppo commerciale ICV D-47 (Lalvin) si è diversificato sia dai due ceppi commerciali provati che dagli isolati con profilo 6 usando i primer delta2/delta21.



**Figura 2.3.10.** Esempio di gel elettroforesi ottenuta dall'analisi delle regioni interdelta utilizzando la coppia di primer delta2/delta12. M marker "100-bp DNA ladder" Amersham. Pozzetti: da (1) a (9) ceppi con profilo 11; (10) ceppo commerciale Premium blanc 12V .

### 2.3.2.3 PCR regioni microsatellite

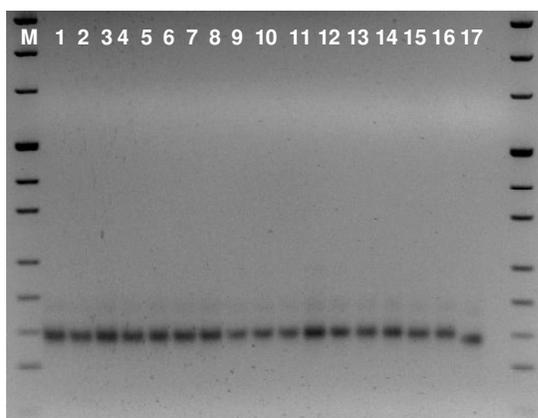
Legras e collaboratori (2005) in un recente lavoro hanno analizzato e comparato il grado di polimorfismo di 41 diversi loci microsatellite nel genoma di *S. cerevisiae*

alcuni già descritti in precedenza (Gallego et al. 1998; Hannequin et al., 2001; Techera et al., 2001; Perez et al., 2001) e altri descritti per la prima volta. I loci sono stati classificati a seconda del numero di bande rilevate in poco polimorfici (fino a tre bande), mediamente polimorfici (da quattro a sei bande) e altamente polimorfici (più di sei bande).

Sono stati scelti per l'analisi dei ceppi sei loci altamente polimorfici. I loci sono: ScAAT1 (polyTTA) e ScYOR267c (polyTGT) già proposti in precedenza da Techera e collaboratori (2001); C4 (polyTAA-polyTAG), C5 (polyGT), C8 (polyTAA) e C11 (polyGT) descritti da Legras e collaboratori (2005).

Anche in questo caso sono stati analizzati i medesimi 10 isolati scelti tra i 53 con profilo 11 e comparati con il corrispondente ceppo commerciale Premium blanc 12V e 14 degli 85 isolati con profilo 6 comparati anche con i ceppi commerciali AEB Complete killer, Blastosel Fr95 e ICV D-47 .

Per quanto riguarda i 14 isolati con **profilo 6** sottoposti a questa analisi, utilizzando i primer ScYOR267c e C4 non sono state evidenziate differenze nel profilo con i ceppi commerciali. I primer C5, C8, C11 e SCAAT1 hanno permesso invece di separare i 14 isolati, i due ceppi commerciali Blastosel Fr95 e AEB Complete killer dal ceppo commerciale ICV D-47. In figura 2.3.11. è riportato un esempio di gel elettroforesi dei campioni con profilo 6 dopo amplificazione del DNA con il primer C8.

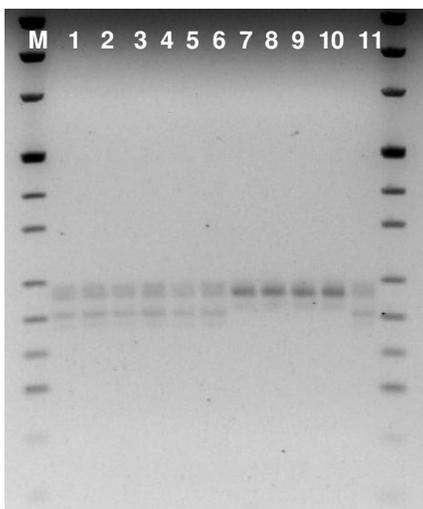


**Figura 2.3.11.** Esempio di gel elettroforesi ottenuta dall'analisi delle regioni microsatellite locus C8 dei ceppi con profilo 6. M marker "PucMix8" Amersham. Pozzetti: (1)P227.12; (2) P227.15; (3) P304.14; (4) P303.3; (5) P304.8; (6) S40; (7) X20.13; (8) X20.16; (9) X22bis.12; (10) X22bis.4; (11) X22bis.8; (12) X39.10; (13) X39.16; (14) X39.3; (15) FR95; (16) AEB fermol complete; (17) ICV D-47.

Anche per i 10 ceppi con **profilo 11**, utilizzando i quattro primer C5, ScYOR267c, SCAAT1 e C4 non sono state evidenziate differenze del profilo di bande elettroforetiche tra isolati e ceppi commerciali.

L'amplificazione eseguita con la coppia di primer C8 ha permesso invece di suddividere gli isolati in tre gruppi con diversi profili elettroforetici. Un primo gruppo che comprende gli isolati B173.1, B173.16, C261.4, C271.7, P173.3, P173.1 e il ceppo commerciale Premium blanc 12V, un secondo gruppo in cui si collocano gli isolati X36.1, X36.4 e un ultimo gruppo costituito dagli isolati P225.2, P225.5.

Anche l'amplificazione con la coppia di primer C11 ha permesso di individuare due gruppi di profili. Da una parte gli isolati B173.1, B173.16, C261.4, C271.7, P173.3, P173.1 e il ceppo commerciale Premium blanc 12V e dall'altra gli isolati P225.2, P225.5, X36.1 e X36.4 (Figura 2.3.12).



**Figura 2.3.12.** Esempio di gel elettroforesi ottenuta dall'analisi delle regioni microsatellite locus C11 dei ceppi con profilo 11. M marker "PucMix8" Amersham. Pozzetti: (1) B173.1; (2) B173.16; (3) C261.4; (4) C261.7; (5) P173.3; (6) P173.1; (7) P225.2; (8) P225.5; (9) X36.1; (10) X36.4; (11) ceppo commerciale Vason Premium blank.

Dall'analisi dei microsatelliti quindi sono state rilevate delle differenze a livello di DNA nucleare tra alcuni isolati con profilo 11 del DNA mitocondriale, ma solo tra quelli provenienti da diversi campioni (grappoli fermentati).

Le differenze riscontrate ci permettono di individuare tre diversi gruppi all'interno del profilo 11, quelli distinti dal primer C8 (Tabella 2.3.4). Il primo gruppo è costituito dagli isolati provenienti dalla zona di Valdobbadene, in particolare tutti ottenuti dai campioni B173 e P173, prelevati entrambi dallo stesso vigneto (microarea di Bigolino), dal campione C216 (località S. Stefano) e dal ceppo commerciale Premium blanc 12V.

Un secondo gruppo costituito dai due isolati dal campione P225 prelevato nella località di Colbertaldo (Valdobbadene) e l'ultimo gruppo costituito dai due isolati provenienti dal campione X36 raccolto nella località di Conegliano. I risultati ottenuti con il primer C8 confermano che gli isolati raccolti dai campione X36 e P225 si discostano geneticamente dagli altri e dal ceppo commerciale analizzato pur possedendo il medesimo DNA mitocondriale. Perciò è possibile sostenere non solo che ci sia stata una diffusione di ceppi commerciali (identificati nell'analisi con il profilo mitocondriale 11 e 6), come già evidenziato in alcuni studi (Valero et al., 2005), ma per quanto riguarda il profilo 11, è possibile ipotizzare che il ceppo commerciale sia stato in grado di insediarsi stabilmente nel territorio e gli isolati ottenuti dai campioni X36 e P225 potrebbero essere frutto dell'evoluzione di tale ceppo nell'ambiente del rilascio.

<b>Campioni</b>	<b>locus C5</b>	<b>locus C11</b>	<b>Località</b>
B173.1	A	D	Bigolino (V)
B173.16	A	D	Bigolino (V)
P173.3	A	D	Bigolino (V)
P173.1	A	D	Bigolino (V)
C261.4	A	D	S. Stefano (V)
C261.7	A	D	S. Stefano (V)
P225.2	B	E	Colbertaldo (V)
P225.5	B	E	Colbertaldo (V)
X36.1	C	E	Conegliano (C)
X36.4	C	E	Conegliano (C)
Premium blanc 12V	A	D	

**Tabella 2.3.4.** Sono elencati gli isolati con profilo 11 analizzati, i diversi pattern elettroforetici ottenuti dall'analisi dei locus C8 e C11 e la località di provenienza.

#### 2.3.2.4 Identificazione di specie

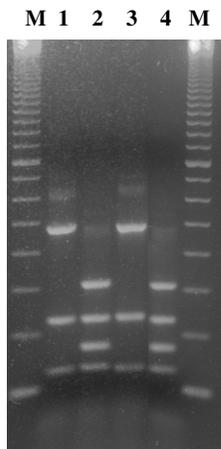
È stata condotta un'ulteriore indagine genetica per determinare la specie di appartenenza tra quelle comprese nel gruppo *S. sensu stricto* dei 66 campioni scelti in base alla caratterizzazione fenotipica (vedi capitolo 3). Anche in questo caso come in precedenza sono state considerate le informazioni associate alla regione di DNA codificante l'rRNA ribosomiale. In particolare è stato preso in considerazione quel tratto di DNA compreso tra quelli codificanti la subunità 18 e 26S, codificante l'rRNA della subunità 5,8S e contenente le due zone fiancheggianti denominate ITS (Internal Transcribed Spacer), particolarmente interessante perché mostra un polimorfismo di sequenza molto più elevato di quello associato ai geni codificanti l'rRNA delle subunità 18S e 26S (Cai *et al.* 1996; James. *et al.*, 1996) (figura 3.8). Questa variabilità è estremamente alta, se si considerano organismi appartenenti a specie diverse, mentre scende drasticamente quando si considerano ceppi della stessa specie. Questo polimorfismo intra-specifico può essere messo in evidenza mediante amplificazione della regione ITS e successiva analisi del profilo di restrizione utilizzando enzimi opportuni (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). In questo modo si ottiene un metodo rapido, di facile esecuzione per l'identificazione dei lieviti, che ha il vantaggio di fornire informazioni relative non solo al ceppo da riconoscere ma anche al resto della popolazione microbica.

In una fase precedente di messa a punto (Bernardini, 2005) è stata effettuata una ricerca bibliografica per identificare gli enzimi utilizzati per l'analisi di lieviti dell'ambiente enologico ed in particolare tra questi è stato scelto l'enzima *HaeIII* (Baleiras Couto *et al.*, 1996; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Las Heras-Vazquez *et al.*, 2003; Naumova *et al.*, 2003). Questo enzima è stato provato su una serie di ceppi di riferimento. Sono stati considerati i ceppi tipo delle sette specie appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* come proposto da Naumov (2000), i 12 ceppi tipo di *Saccharomyces sensu lato* (Kurtzman, 1998) e 17 ceppi rappresentanti le principali specie enologiche

*HaeIII* permette di suddividere le specie appartenenti al *sensu stricto* in due sottogruppi in pieno accordo con la similarità genetica (Kurtzman, 1998). Nel primo gruppo si collocano *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. cariocanus*, nel

secondo *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*. Un esempio del gel di separazione è osservabile in figura 2.3.13 in cui sono rappresentati i due profili tipici.

Sono stati analizzati con *HaeIII* i 66 isolati *Saccharomyces sensu stricto* scelti per le prove tecnologiche eseguite in mosto di Prosecco e tutti hanno dato il profilo di restrizione tipico del gruppo *S. cerevisiae/S. paradoxus/S. cariocanus*.



**Fig 2.3.13.** Esempio di analisi della regione ITS, digestione con enzima *HaeIII*. Lane: M, marker 100bp (Amersham Bioscience); 1, *S. mikatae*; 2, *S. paradoxus*; 3 *S. kudriavzevii*; 4, *S. cerevisiae*.

Mc Culloch e collaboratori nel 1998 ha dimostrato di poter separare *S. cerevisiae* da *S. paradoxus* mediante taglio con enzima *MaeI*. Poichè l'introduzione delle tre nuove specie extra europee all'interno del gruppo *S. sensu stricto* è posteriore (2000) è stato necessario verificare il comportamento di *S. cariocanus* al taglio con *MaeI*. Si è potuto così concludere che questo enzima discrimina *S. cerevisiae* da *S. paradoxus/S. cariocanus*. Dei nostri isolati analizzati 62 sono risultati appartenere alla specie *Saccharomyces cerevisiae* e solamente 4 fanno parte del gruppo *S. paradoxus/S. cariocanus* (Tab. 2.3.5). Confrontando le relazioni di similarità riportate nel dendrogramma in figura 2.3.6 i due isolati *S. paradoxus/S. cariocanus* con profilo 8 e 10 mostrano una similarità molto elevata (91%), come già discusso in precedenza. I due derivano entrambi dallo stesso grappolo fermentato cioè il campione B125 raccolto in località Susegana (Conegliano). L'isolato con profilo 38 deriva invece dalla zona di Scandolere (Valdobbiadene) e mostra comunque un certo grado di similarità con i profili 8 e 10 (65%). Infine

l'isolato con profilo 32 proveniente da Susegana (Conegliano) risulta geneticamente molto diverso dagli isolati di tutte le specie, poiché si separa da tutti gli altri profili in corrispondenza di un nodo con similarità del 30%.

PROFILO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	TOT.			
<i>S. cerevisiae</i>	1	1	1	1	2	14	1	-	1	-	10	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	-	1	1	1	2	1	-	62		
<i>S. paradoxus/</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>S. cariocanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Tabella 2.3.5.** Identificazione di specie dei 66 isolati selezionati per la caratterizzazione in mosto di Prosecco. Sono indicati il numero di isolati scelti per ogni profilo di restrizione del DNA mitocondriale e la specie di appartenenza

### **3. Caratteristiche tecnologiche e di qualità dei lieviti**



### 3.1 INTRODUZIONE

Per ottenere la coltura starter più appropriata al tipo di vino da produrre vanno individuati i ceppi con caratteri tecnologici ottimali. Minarik nel 1978, per primo, suddivise le caratteristiche enologiche in fisiologiche (velocità di sviluppo, resistenza all'etanolo, alla SO<sub>2</sub>, ecc.) e in biochimiche (formazione di etanolo, acido acetico, glicerina, ecc.). Successivamente Giudici e Zambonelli nel 1992 hanno sostituito questa divisione dei caratteri enologici con una più funzionale.

- I caratteri tecnologici sono quelli che consentono di dominare e guidare in modo ottimale e programmato la fermentazione nelle varie fasi e di interagire con le tecnologie di vinificazione.
- I caratteri qualitativi influiscono invece sulla composizione e quindi sulla qualità del vino finito per effetto della formazione (o consumo) di taluni composti o per azione su alcuni componenti dei vini (Vincenzini *et al.*, 2005).

Va rilevato che i lieviti vinari delle diverse specie sono dotati delle stesse caratteristiche enologiche, ma ciò che li differenzia in modo sostanziale è il livello di espressione dello stesso parametro (Vincenzini *et al.*, 2005).

I caratteri enologici non hanno importanza univoca. Fermo restando che quelli di competitività sono sempre fondamentali, tutti gli altri possono essere talvolta positivi, altre volte negativi, talvolta richiesti ai più alti livelli, altre volte ai più bassi livelli (Zambonelli, 2003).

#### 3.1.1 Principali caratteri tecnologici

Il **vigore fermentativo**, detto anche velocità di fermentazione, che esprime la capacità di dare origine a pronte e rapide fermentazioni in presenza anche di antisettici nelle dosi consentite dalla legge e a temperature comprese tra 20 e 30°C. Questo carattere è stabile nel tempo ed è specifico per ciascun ceppo all'interno della specie.

Il pronto avvio del processo fermentativo è uno dei caratteri che lo starter deve possedere a prescindere dalla sua tipologia di impiego; per tale motivo deve essere

ritenuto fondamentale nella selezione dei lieviti per la vinificazione (Vincenzini *et al.*, 2005).

Altro carattere importante è il potere fermentativo o alcoligeno, ovvero il grado alcolico massimo (inteso come etanolo %) prodotto da un lievito per fermentazione di un mosto contenente zucchero in eccesso (Castelli, 1954). Questo carattere, definito come **alcol-tolleranza**, è più o meno espresso nei lieviti; quelli più alcoligeni sono quelli riferibili alla specie *S. cerevisiae*, ma anche altri lieviti meno frequenti nella fermentazione spontanea dei mosti come quelli del genere *Torulaspota* presentano un elevato potere fermentativo. Nell'ambito di ogni specie è possibile un'ampia variabilità sia in funzione del ceppo sia del luogo di origine del lievito, (Vincenzini *et al.*, 2005). Durante il processo di fermentazione infatti le cellule sono sottoposte a numerosi fattori di stress tra i quali lo stress da etanolo, dovuto alla progressiva produzione del composto durante la fermentazione. L'etanolo è molto tossico per il metabolismo e la crescita dei lieviti ed esercita la sua tossicità in particolare sulla membrana dei lieviti (Carrasco e Querol, 2001). L'etanolo agisce mediante meccanismi intracellulari quali l'alterazione delle polarità delle membrane, con perdita di fluidità della stessa, e la riduzione dell'attività delle proteine sia di membrana che citoplasmatiche, a concentrazioni elevate provoca può provocare rallentamenti della fermentazione o anche arresti di fermentazione

In particolare numerosi studi hanno messo in evidenza che generalmente l'arresto della fermentazione non è dovuto alla concentrazione alcolica raggiunta nel mezzo, bensì a quello che gradualmente, si accumula all'interno delle cellule.

I principali meccanismi di detossificazione adottati dal lievito verso l'etanolo sono la modifica della frazione lipidica e proteica delle membrane, l'espressione di proteine da stress, ad esempio la proteina Hsp104 (Carrasco e Querol, 2001). superossido dismutasi mitocondriale e catalasi citoplasmatica, maggiore sintesi del citocromo P450, aumento della sintesi del trealosio.

La **resistenza alla SO<sub>2</sub>** è la capacità di mantenere inalterata o sufficientemente elevata la velocità di fermentazione in presenza delle dosi selettive di SO<sub>2</sub>. Questo additivo viene utilizzato in enologia per le sue proprietà antiossidanti e come

agente antimicrobico nei confronti di lieviti e batteri contaminanti. *Saccharomyces* presenta generalmente una elevata resistenza all'anidride solforosa rispetto agli altri lieviti vinari, così l'aggiunta del composto elimina i microrganismi indesiderati. Anche se i lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae* hanno generalmente una elevata resistenza all'anidride solforosa, dosi eccessive possono comunque causare rallentamenti o arresti di fermentazione (Boulton *et al.*, 1996). All'interno del genere *Saccharomyces* circa il 30% dei ceppi è in grado di crescere in presenza di 150 ppm di SO<sub>2</sub>, mentre i ceppi sensibili sono inibiti a concentrazioni di 100 ppm che causa un prolungamento della fase di latenza (Vincenzini *et al.*, 2005).

I lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae* utilizzano tre diversi meccanismi di difesa contro l'anidride solforosa:

- formazione di un addotto non tossico con l'acetaldeide;
- utilizzo dei solfiti attraverso la solfito riduttasi;
- efflusso forzato tramite trasportatori di membrana (SSU1).

Il terzo meccanismo è quello responsabile della diversa sensibilità dei ceppi di *S. cerevisiae* dato che nei ceppi resistenti alla SO<sub>2</sub> si sono riscontrate notevoli quantità di mRNA relativo al gene SSU1.

In *S. cerevisiae* i ceppi sufficientemente resistenti alla SO<sub>2</sub> sono abbastanza frequenti e generalmente ne sono anche forti produttori (ne sintetizzano anche 100 mg/l). E' tuttavia, importante selezionare i ceppi maggiormente resistenti a questo antisettico per evitare problematici avvii nel processo fermentativo e limitare il più possibile lo sviluppo di lieviti di vigneto (Vincenzini *et al.*, 2005).

Il lievito nel vino può assumere diverse **modalità di sviluppo** che possono essere distinte in polverulento, flocculento, in aggregati.

Polverulento: le cellule dei lieviti al termine del processo di gemmazione, si separano le une dalle altre. Per questo è detto anche sviluppo a cellule disperse. Al termine dello sviluppo le cellule si raccolgono più o meno rapidamente sul fondo dei recipienti; in seguito ad agitazione, le cellule del deposito si sospendono provocando torbidità uniforme e polverulenta del liquido. Questo è lo sviluppo più comune in *S. cerevisiae*, ma anche il migliore auspicabile in uno starter selezionato per la fermentazione primaria.

Flocculento: le cellule possono separarsi dopo gemmazione ma, venendo poi a contatto tra di loro, si aggregano dando origine a fiocchi anche di notevoli dimensioni; i fiocchi e i grumi, a seguito di agitazione, si frammentano, ma non irreversibilmente, perché in breve tempo si riformano. Questo carattere ha diversi gradi di espressione. Il grado massimo di flocculazione ha una frequenza dell'1% mentre gli altri gradi si collocano attorno al 6%.

Uno sviluppo di questo tipo è interessante negli starter vinari per la spumantizzazione con rifermentazione in bottiglia (metodo classico), dove il lievito flocculante facilita notevolmente la fase del *remuage*, cioè della messa in punta delle fecce di lievito.

In aggregati: in alcuni ceppi di lievito, le cellule figlie, al termine della gemmazione, anziché distaccarsi rimangono unite alle cellule madri formando aggregati anche di dimensioni notevoli. Questo tipo di sviluppo in *S. cerevisiae* è più raro; ed è nettamente diverso dalla flocculazione (Zambonelli, 2003).

Il **potere schiumogeno** di un ceppo è la sua capacità di produrre schiuma. In molti ceppi (20-30%) le cellule aderiscono alle bollicine di CO<sub>2</sub> che si svolgono. Queste, arrivate alla superficie, anziché rompersi si fondono tra loro e aumentano il volume dando origine alle schiume che assumono colore grigio-bruno appunto per la presenza delle cellule. Per misurare questo parametro si valuta l'altezza della schiuma. Per quanto non siano state riscontrate differenze fondamentali nella composizione della parete cellulare, tuttavia le caratteristiche di idrofobicità delle cellule schiumogene vengono attribuite alla presenza di materiale proteico (assente nella parete cellulare dei lieviti non schiumogeni) al quale dovrebbe essere principalmente attribuita la responsabilità di persistenza delle schiume. L'assenza o la scarsa produzione di schiuma è carattere sicuramente positivo sia in fermentazioni primarie che in rifermentazione, perché riduce il volume occupato dal mosto. In *S. cerevisiae* è un carattere stabile, ereditario e dominante. Si manifesta nei ceppi con sviluppo polverulento ed è compatibile con la flocculazione (Zambonelli, 2003).

L'**adesività** è la capacità delle cellule di lievito di crescere adese sulle superfici dei vasi vinari; risulta essere un carattere negativo perché complica l'igienizzazione delle vasche a fine lavorazione.

Alcuni ceppi, alla fine della normale fermentazione alcolica, danno origine ad un velo sulla superficie del vino, dove lo sviluppo continua in condizioni ossidanti (*flor*), questo carattere è denominato **potere filmogeno**. I ceppi *flor* ossidano l'alcol etilico e formano una serie di composti aromatici. Il processo di fluorizzazione non è richiesto in vini tradizionali, ma solo in alcuni come la Vernaccia di Oristano, perciò il carattere filmogeno deve essere tenuto in debito conto dai selezionatori di starter (Vincenzini *et al.*, 2005).

La **rapidità di sedimentazione** è misurata attraverso il tempo di illimpidimento del mezzo espresso in giorni. La rapidità di sedimentazione è un carattere positivo perché agevola le successive operazioni di chiarificazione e filtrazione.

Il **carattere killer** è la capacità di alcuni lieviti (K) di produrre proteine o glicoproteine in grado di uccidere ceppi sensibili (S) a tali tossine.

Questo carattere scoperto per la prima volta in *S. cerevisiae* è ampiamente diffuso anche in altri generi di lievito. I *S. cerevisiae* K diffusi negli ambienti vinari producono una tossina denominata K2 attiva nelle condizioni di vinificazione nei confronti di ceppi di lievito S appartenenti allo stesso genere. La tossina K2 agisce sulla permeabilità della membrana influenzando la fuoriuscita di protoni, cationi potassio, ATP e aminoacidi. Il possesso del carattere killer senza dubbio aumenta la competitività, favorendo i ceppi K su quelli S, ma non sui ceppi neutri (N) i quali sono insensibili alla tossina. Il vantaggio dei K tuttavia è limitato all'azione nei confronti dei *Saccharomyces* selvaggi sensibili, senza per altro incidere sulla competitività degli starter nei confronti dei non-*Saccharomyces* selvaggi.

Perciò il fattore killer può essere considerato un carattere addizionale nella selezione di lieviti starter per la vinificazione (Vincenzini *et al.*, 2005).

Da uno studio eseguito su campionamenti nella zona di Conegliano è emerso che il carattere killer è presente nel 44% degli isolati di lieviti e risulta essere positivo

nel processo evolutivo e di colonizzazione degli ambienti vinari (Ciani *et al.*, 1997).

### 3.1.2 Principali caratteri di qualità

Il **glicerolo**, dopo l'etanolo e la CO<sub>2</sub>, è il composto prodotto in maggior quantità durante la fermentazione alcolica. Esso influenza notevolmente il "corpo del vino", contribuisce ad impartire ai vini i caratteri di "pienezza" e di "dolcezza" (soglia di percezione 5,2 g/l). I *Saccharomyces* della vinificazione possono produrre dai 2 ai 10 g/l in funzione della specie e del ceppo di lievito. *S. cerevisiae* è il lievito che forma le minori quantità di glicerolo ed è questo il motivo principale del suo alto rendimento in etanolo. Il glicerolo è gradito alle più alte concentrazioni nei vini rossi ai quali conferisce la sensazione di "vecchio", non lo è per lo stesso motivo nel caso di vini che devono conservare la freschezza originale.

Questo composto, nella realtà, non è un prodotto secondario della fermentazione perché deriva direttamente dagli zuccheri e la sua entità di formazione, a parità di ceppo, è proporzionale alla loro concentrazione (Zambonelli, 2003).

Fra i prodotti secondari, un ruolo importantissimo, anche se tutto negativo, è svolto dall'**acido acetico** che deriva direttamente dagli zuccheri quale prodotto di una forma di fermentazione. La capacità di produrre quantità più o meno elevate di acido acetico, oltre che di specie è carattere di ceppo, è ereditario e stabile.

Questo carattere viene attualmente definito col termine di purezza fermentativa, è espresso come rapporto tra l'acidità volatile formata e alcol etilico prodotto. I ceppi migliori risultano quelli che hanno il minor valore di purezza fermentativa. In linea di massima, per un vino di 10° alcolici, un valore di questo carattere inferiore a 0,3 g/l è già da considerarsi ottimo.

L'acidità volatile dei vini può essere di diversa origine e non deriva soltanto dall'attività dei lieviti; spesso anche il mosto ha già un contenuto di acido acetico rilevante quale conseguenza del marciume acido o dello sviluppo di batteri acetici sulle uve (Zambonelli, 2003).

L'**acetaldeide** è il composto carbonilico più importante che si forma durante la fermentazione e rappresenta più del 90% del contenuto totale di aldeidi nel vino. E' un normale prodotto della fermentazione alcolica e il suo contenuto nel vino può variare notevolmente (10-300 mg/l); la valutazione del suo contenuto è usata come indicatore del grado di ossidazione di un vino. Un livello alto di acetaldeide è indesiderabile e vini contenenti 500 mg/l sono considerati non commerciabili. I vini bianchi hanno in generale un valore medio di 80 mg/l. Presente nel vino a livelli bassi conferisce un gradevole aroma di frutta, ma a concentrazioni già di 100-125 mg/l libera un odore pungente ed irritante.

La produzione di questa sostanza da parte dei lieviti dipende da molti fattori, come la fase di fermentazione (in cui c'è il picco di produzione), la composizione del mezzo, la natura dei materiali insolubili usati per la chiarificazione dei mosti, le condizioni di anaerobiosi, la temperatura del processo e lo stato di invecchiamento del vino.

L'anidride solforosa induce la produzione di acetaldeide da parte dei lieviti e questo sembra essere correlato alla resistenza dei lieviti all'anidride stessa.

Il fattore principale che determina la maggiore variabilità di contenuto di acetaldeide è la specie di lievito. *S. cerevisiae* è tra i maggiori produttori della molecola (50-120 mg/l), ceppi diversi di questa specie ne producono livelli differenti probabilmente perché la produzione di acetaldeide è in relazione alla piruvato decarbossilasi del lievito (Vincenzini *et al.*, 2005).

L'**acetoino**, normalmente presente nei vini in quantità compresa fra 2 e 32 mg/l, è un composto che ha importanza per la qualità del vino sia per azione diretta sia a causa della sua possibile conversione a diacetile e 2-3 butanediolo. L'acetoino è prodotto in quantità rilevante dagli apiculati. La maggioranza dei ceppi di *S. cerevisiae* produce circa 12 mg/l, ma ci sono anche ceppi che arrivano a 200 mg/l. Il carattere "alta produzione di acetoino" è stabile, ereditario e negativo (Zambonelli, 2003).

Gli **alcoli superiori** rappresentati prevalentemente sono: l'n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol amilico e l'alcol 2-fenil etilico. Questi composti derivano dal catabolismo degli aminoacidi corrispondenti presenti nel mosto, ma anche dal

metabolismo del glucosio senza coinvolgimento degli aminoacidi precursori. Non c'è, infatti, una relazione diretta tra le quantità di aminoacidi presenti nel mosto e quelle degli alcoli superiori nel vino.

La produzione di questi composti è dovuta principalmente all'azione dei ceppi di lievito i quali possono fornire da 100 a 500 mg/l a seconda della composizione del mezzo, disponibilità di ossigeno, fonte azotata e concentrazione iniziale dello zucchero. La specie *S. cerevisiae* è la maggiore produttrice.

Piccole quantità di alcoli superiori contribuiscono positivamente alla qualità del vino, mentre quantità elevate (>300 mg/l) conferiscono al prodotto qualità negative: in particolare, l'alcol isoamilico dà un caratteristico odore di bruciato. Fa eccezione il 2-feniletanolo, che libera una fragranza di rosa ed in concentrazione anche elevata contribuisce positivamente all'aroma del vino (Vincenzini *et al.*, 2005).

I **composti solforati** sono costituiti principalmente da idrogeno solforato ( $H_2S$ ) e anidride solforosa ( $SO_2$ ) e derivano direttamente dalla riduzione dei solfati presenti nei mosti. I *S. cerevisiae* producono sempre idrogeno solforato anche se in quantità differenti e variabili in funzione del ceppo (da pochi  $\mu g/l$  a 4-5 mg/l) e delle condizioni del mosto (presenza di derivati antiiodidici). L'idrogeno solforato si produce dalla riduzione dei solfati, in parte si lega all'acetilomoserina e all'acetilserina per la sintesi degli aminoacidi solforati, l'eccesso viene liberato. L'idrogeno solforato è insolubile in acqua, perciò velocemente passa allo stato gassoso. Questa caratteristica determina la sua presenza solo temporaneamente nei vini. A seconda della composizione di quest'ultimi, una volta fuori dalla cellula, l'idrogeno solforato può legarsi ad altri composti per produrre disolfuri e mercaptani, molto meno volatili che hanno effetti pesanti sull'aroma dei vini (Zambonelli, 2003). Anche la produzione di  $SO_2$  da parte dei lieviti, come sopra citato, presenta un'ampia variabilità; alcuni ceppi che producono quantità rilevanti di  $SO_2$  (100-120 mg/l), hanno anche la tendenza a produrre notevoli quantità di acetaldeide con il risultato di elevate concentrazione di  $SO_2$  combinata a fine fermentazione. Durante le operazioni di selezione di uno starter vinario, quindi, la preferenza dovrebbe andare ai ceppi che producono bassi livelli di  $SO_2$  (massimo 10-20 mg/l) (Vincenzini *et al.*, 2005).

I composti solforati, dal punto di vista qualitativo, sono costituiti principalmente da idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S) e anidride solforosa (SO<sub>2</sub>), che derivano direttamente dalla riduzione dei solfati presenti nei mosti; sono sempre prodotti da *S. cerevisiae*, anche se in quantità differenti e variabili in funzione del ceppo.

L'**acido malico** è uno dei principali acidi organici dei mosti e dei vini. I lieviti sono in grado di consumarlo mediante la fermentazione maloalcolica. *Schizosaccharomyces* può usare fino al 100% dell'acido malico presente, mentre *Saccharomyces* arriva al massimo al 45%.

D'altro canto sono stati individuati ceppi di *Saccharomyces*, generalmente tra i criotolleranti, capaci anche di produrre l'acido malico durante il processo fermentativo (Faticenti *et al.*, 1981). Queste due diverse abilità (degradazione e produzione di acido malico) potrebbero essere utilizzate in funzione delle caratteristiche del mosto e della tipologia di vino che si vuole ottenere (Vincenzini *et al.*, 2005).

I lieviti riescono a modificare la composizione dei vini anche per via indiretta, cioè mediante la secrezione nel mezzo di enzimi idrolitici.

**Attività esterasica:** durante la fermentazione alcolica si producono numerosi esteri principalmente fra acido acetico e lattico con etanolo ed altri alcoli del vino. Questi composti non hanno azione univoca sulla qualità dei vini ma in generale non sono graditi perché, l'influenza negativa che svolgono è superiore a quella positiva. Questo è vero soprattutto per l'acetato di etile che conferisce tipico profumo di aceto.

Ci sono dei lieviti, tra cui *S. cerevisiae*, che hanno attività idrolitica sugli esteri provocando la liberazione degli acidi e degli alcoli ed è accertato anche che questa azione non è costante ma varia in funzione della specie e del ceppo. Questa deesterificazione, oltre a provocare un calo nel contenuto totale di esteri, altera anche il loro rapporto di presenza perché agisce con intensità differente sui vari composti (Zambonelli, 2003).

I tioli sono uno dei più potenti gruppi di aromi riscontrati nei vini. Essi apportano in alcuni casi note positive mentre in altri peggiorano drasticamente la qualità aromatica dei vini. Tra i composti tiolici “positivi” per la qualità si possono inserire a pieno titolo il 4-mercapto 4 metil pentanone (4MMP), il 3 mercapto esanolo (3 MH) e il 3 mercaptoesil acetato (3MHA), che possiedono soglie di percezione estremamente basse. Questi composti presenti in modo significativo in alcune varietà (Sauvignon Blanc, Riesling, Semillon, Merlot e Cabernet Sauvignon) non si trovano in forma libera e volatile ma coniugati con la cisterna che li rende inodori.

Durante la fermentazione avviene la rottura del legame cisteinico, causata da  **$\beta$ -liasi**, e la formazione dei composti odorosi. E' stato dimostrato che l'efficienza delle  $\beta$ -liasi dei lieviti è ceppo dipendente.

L'**attività glicosidasi** agisce sugli aromi dei vitigni. E' noto da tempo che alcune classi di composti che formano gli aromi varietali (monoterpeni, norispronoidei, derivati benzenici) sono presenti nell'uva principalmente sotto forma glicosidata. La forma glicosidata permette una maggiore solubilità e stabilità rispetto alle forme libere ma non apporta un contributo diretto all'aroma. I più interessanti e il più studiati tra gli aromi varietali sono i monoterpeni. Questi composti possono essere rilevati nella bacca in tre forme: nella forma libera, con basse soglie di percezione, costituiti principalmente come alcoli (linalolo,  $\alpha$ -terpineolo, nerolo, geraniolo, citronellolo) e da ossidi del linalolo in forma sia piranica che furanosica; la seconda, inodore, è rappresentata dalle forme polidrossilate dei monoterpeni; l'ultima costituita dai monoterpeni glicosidati. Le forme glicosidiche dei monoterpeni sono rappresentate da monoglucosidi ( $\beta$ -D glucopiranosio) e principalmente da diglicosidi ossia glucosio e zuccheri semplici quali l'arabinosio, ramnosio e apiosio (Gunata *et al.*, 1985). In rari casi sono stati isolati forme trisaccaride (Winterhalter *et al.*, 1997).

I monoterpeni sono particolarmente abbondanti in forma libera nelle uve “aromatiche” (Moscato, Gewürztraminer, Riesling ecc.) mentre nelle uve “neutre” possono essere presenti anche ad elevate concentrazioni ma principalmente in forma legata (Chardonnay, Semillon, etc) (Ugliano *et al.*, 2006). Si è riscontrato

che il rapporto tra le forme glicosidate e quelle libere nell'uva varia da 2 a 8 volte (Gunata *et al.*, 1985).

I monoterpeni presenti nel vino non sono solo di origine varietale. Recenti studi hanno evidenziato che questi possono essere sintetizzati da *S. cerevisiae* in concentrazioni superiori alle soglie di percezione (Carrau *et al.*, 2004).

I C13 norisoprenoidi isolati nel succo d'uva sono oramai diverse decine e nella quasi totalità sono in forma glicosidata (Sefton *et al.* 1993).

I derivati benzenici sono una categoria di composti odorosi che derivano principalmente dall'acido scimmico e si trovano nella bacca in parte come glucosidi inodori (principalmente l'alcol benzilico e il metilvanillato) (Sefton *et al.*, 1993).

La liberazione dell'aglicone odoroso presente nel vino come glicoside può avvenire mediante due meccanismi.

Il primo consiste in un'idrolisi acida del glucoside. Il processo ha una cinetica lenta. L'aglicone che si forma (monoterpenolo e norisoprenoide) può subire a riarrangiamenti molecolari con formazione di nuovi composti (linaiolo, geraniolo e neroli in  $\alpha$  terpinolo nei monoterpeni, trimetildidronaftalene nei casi dei norisoprenoidi). L'idrolisi e l'eventuale riarrangiamento è pH dipendente. L'invecchiamento del vino quindi porta a una sostanziale variazione del contenuto e della composizione dei monoterpeni liberi (Rapp e Mandery 1986; Di Stefano 1989).

Il secondo consiste in un'idrolisi enzimatica. Attualmente si ipotizza la presenza di due diversi meccanismi di reazione; il primo prevede due attività enzimatiche consecutive (idrolisi sequenziale) mentre il secondo ha un solo step di reazione (Gunata *et al.*, 1998). Nel primo caso il primo enzima (esoglicosidasi) rimuove lo zucchero più esterno dal disaccaride, il secondo ( $\beta$ -glucosidasi) rimuove il glucosio dal terpene, liberando il composto odoroso. Nel secondo caso l'idrolisi enzimatica (diglucosidasi) forma direttamente l'aglicone e un disaccaride. Attività glucosidasiche sono state individuate sia nelle piante che nei microrganismi.

Nella bacca dell'uva è stato isolato un enzima con attività  $\beta$ -glucosidasica, concentrato specialmente nella buccia (Gunata *et al.*, 1990) mentre sono state riscontrate basse attività  $\alpha$ -arabinosidasiche,  $\alpha$ -rhamnosidasiche e  $\beta$ -xilosidasiche.

La presenza di attività  $\alpha$ -apiosidasi non è stata ancora confermata (Gunata *et al.*, 2002). L'enzima presenta una scarsa stabilità al pH del mosto e le condizioni ottimali di pH e temperatura (5 e 50 °C) sono lontane da quelle presenti durante la fermentazione. Inoltre l'enzima è fortemente inibito dal glucosio, Ca e Cu mentre mostra insensibilità alla presenza di alcol (10% v/v) e SO<sub>2</sub> (50-200 mg/ml) (Gunata *et al.*, 1990; Di Stefano e Garcia, 1995; Cordonnier *et al.*, 1989).

Le miscele glucosidasi attualmente utilizzate in vinificazione sono principalmente di origine fungina (*Aspergillus spp.*, *A. niger*, *Penicillium spp.*). Le più efficaci possiedono sia attività  $\beta$ -glucosidasi che  $\alpha$ -arabinosidasi,  $\alpha$ -rhamnosidasi e  $\alpha$ -apiosidasi. Esistono sensibili variazioni dell'optimum di pH e temperatura delle glucosidasi isolate a seconda della specie fungina utilizzata. Anche in questo caso il glucosio inibisce la maggior parte delle  $\beta$ -glucosidasi fungine, anche se in *A. oryzae* è stata isolata una forma minore dell'enzima, che mostra elevata tolleranza al glucosio (Riou *et al.*, 1998). Per questo motivo le preparazioni enzimatiche si impiegano sul vino secco.

Le informazioni sulle glucosidasi dei batteri lattici vinari sono attualmente scarse. *O. oeni* produce delle  $\beta$ -glucosidasi efficaci sugli antociani glicosidati (Boido *et al.*, 2002) (con fenomeni di instabilità del colore) e sui precursori terpenici in soluzioni di vino modello (Ugliano *et al.*, 2002), mentre non hanno efficacia nell'uva nativa/mosti.

Recentemente queste forme enzimatiche sono state isolate anche nei lieviti, fornendo perciò la prova che questi microrganismi possono contribuire attivamente alla produzione di aromi primari un tempo ritenuti esclusivamente a carico della componente vegetale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Si è evidenziato che i lieviti mostrano attività  $\beta$ -glucosidasi con maggiore efficienza nei generi non *Saccharomyces* che in quelli *Saccharomyces cerevisiae*. (Rosi *et al.*, 1994 ; McMahon *et al.*, 1999). Nei lieviti vinari le  $\beta$ -glucosidasi prodotte possono essere sia extracellulari (*Debranomyces spp* e *Candida spp*) che localizzate all'interno della cellula (*Kloeckera spp.* e *Hanseniaspora spp.*).

Gli studi svolti su *Saccharomyces cerevisiae* evidenziano che l'attività  $\beta$ -glucosidasi ha le seguenti caratteristiche:

- massima attività a pH 5 (massima stabilità a pH 6) e riduzione dell'attività dell'80% passando da pH 5 a pH 3;
- temperatura ottimale di 50°C (alla temperatura di fermentazione l'attività è pari al 10-15%);
- massima attività dopo 48 ore di fermentazione in un mosto contenente 200 gr/l di zucchero dato in quel periodo si raggiunge il picco di concentrazioni dell' $\alpha$ -rhamnosidasi e le  $\alpha$ -arabinosidasi prodotte dal lievito (Ugliano *et al.*, 2006);
- attività glucosidasi ad elevate concentrazioni di glucosio (Hernandez *et al.*, 2003);
- probabile inibizione dell'etanolo che limita l'efficacia delle  $\beta$  glucosidasi ai primi stadi fermentativi e della SO<sub>2</sub>.

L'attività  $\beta$ -glucosidasi durante la fermentazione alcolica è imputabile principalmente al lievito e in misura minore all'idrolisi acida (Ugliano *et al.*, 2006). Le  $\beta$ -glucosidasi dei lieviti hanno efficacia sia sui glucosidi monoterpici che su quelli isoprenoidi. In letteratura i test di laboratorio mostrano un decremento dei glucosidi durante la fermentazione del 30 % e non è ancora chiaro se il carattere è ceppo dipendente. Si è riscontrato inoltre che l'idrolisi enzimatica degli alcol terpenici terziari (linalolo e  $\alpha$  terpinolo) avviene molto più facilmente rispetto agli alcoli terpenici primari (geraniolo e nerolo) a differenza dei risultati ottenuti con i preparati di origine fungina dove sono quest'ultimi sono più facilmente degradabili. Anche nel caso dei lieviti l'enzima con attività  $\alpha$ -apiosidasi è quello meno espresso tra gli enzimi esoglucanasi.

Recenti studi mostrano che anche le esoglucanasi endogene dei lieviti possiedono attività  $\beta$ -glucosidasi (Gil *et al.*, 2005).

### 3.1 MATERIALI E METODI

#### 3.2.1 CEPPI DI LIEVITO

Per la messa a punto dei metodi di monitoraggio sono stati utilizzati i ceppi di collezione e commerciali elencati in tabella 1:

<i>Specie microbica</i>	CEPPO	PROVENIENZA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Premium 444	Vason Spa

**Tab. 2.1** Ceppo commerciale

Sono stati analizzati 308 isolati naturali di lievito da uve di Prosecco appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*.

Ad ogni campione è stata assegnata una sigla alfanumerica: XYZ.

X è una lettera (P=Prosecco, C=Cartizze, S=Scuola Enologica di Conegliano);

Y corrisponde al numero progressivo del campione;

Z corrisponde al numero progressivo della colonia isolata dal campione.

#### 3.2.2 MEZZI COLTURALI E CONDIZIONI DI CRESCITA

##### 3.2.2.1 Mezzi di propagazione ordinaria

YM (Yeast and Mould) (Wickerham, 1951)

Dosi per un litro:

3 g Estratto di lievito (OXOID)

3 g Estratto di malto (DIFCO)

5 g Peptone (DIFCO)

10 g Glucosio (PROLABO)

Portare a volume con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### YM agar

Stessa composizione del mezzo precedente con l'aggiunta di 16 g/l di Bacto Agar (DIFCO). Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti

### GPY (Glucose Peptone Yeast) agar

Dosi per un litro:

10 g	Estratto di lievito (OXOID)
20 g	Peptone (DIFCO)
20 g	Glucosio (PROLABO)
20 g	Bacto Agar (DIFCO)

Portare a volume con acqua distillata ed aggiungere 16 g/l di Bacto Agar. (DIFCO). Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### **3.2.2.2 Mezzi per la determinazione dei caratteri fenotipici dei lieviti**

#### Mezzo nutritivo sintetico (MNS)

Dosi per un litro:

##### *Macroelementi*

0,1 g	CaCl <sub>2</sub>
0,1 g	NaCl
1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
3 g	Acido tartarico

##### *Microelementi*

0,2 mg	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0,4 mg	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,04 mg	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
0,1 mg	KJ
0,4 mg	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O
0,4 mg	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O

### *Vitamine*

400 µg	Piridossina cloridrato
400 µg	Tiamina cloridrato
2000 µg	Inosite
20 µg	Biotina
400 µg	Calcio pantotenato
400 µg	Ammide nicotinica
200 µg	Acido p-ammino-benzoico

### *Componenti variabili*

0,3 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,3 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
200 g	Glucosio
0,2 g	Idrolizzato di caseina
2 g	Acido Malico

Preparare i microelementi e le vitamine in una soluzione acquosa concentrata 100 volte e utilizzarne l'1%. Sciogliere tutti i componenti in acqua distillata, aggiustare il pH della soluzione ottenuta con KOH fino a pH 3,2 e sterilizzare per filtrazione.

### Biggy agar (produzione di idrogeno solforato)

Sospendere 42 g di Biggy agar (OXOID) in un litro di acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria bollente per sciogliere l'agar. Lasciare raffreddare a 50-55°C, agitare delicatamente per disperdere il flocculo che si forma e versare in piastra senza autoclavare.

### Agar lisina (Morris & Eddy, 1957)

Sospendere 6,6 g di Lysine medium (Oxoid) in 100ml di acqua deionizzata sterile. Portare ad ebollizione con il forno a microonde per sciogliere l'agar ed agitare frequentemente per non surriscaldare il mezzo. Lasciar raffreddare a 50-55°C e versare in piastra senza sterilizzare in autoclave.

### **3.2.3 PROVE DI FERMENTAZIONE IN MEZZO NUTRITIVO SINTETICO E IN MOSTO NATURALE**

#### **3.2.3.1 Preparazione di inoculi per prove di fermentazione su mosto sintetico**

L'inoculo è stato preparato stemperando la patina ottenuta da una coltura cresciuta in terreno GPY in 10 ml di MNS fino al raggiungimento di una  $OD_{620}$  di 1,5 che corrisponde a circa  $1.5 \times 10^6$  cell/ml. La sospensione è stata inoculata in beuta contenente 90 ml di MNS ed incubata a 20°C.

#### **3.2.3.2 Preparazione di inoculi per prove di fermentazione su mosto d'uva prosecco**

L'inoculo è stato preparato stemperando la patina ottenuta da una coltura cresciuta in terreno GPY in 23 ml di soluzione di saccarosio al 18% fino al raggiungimento di una  $OD_{620}$  di 1,6 che corrisponde a circa  $3,5 \times 10^6$  cell/ml. La sospensione è stata centrifugata a 8000 rpm per 10 minuti, il pellet risospeso con 10 ml di mosto naturale ed inoculato in una beuta contenente 190 ml dello stesso. La sospensione è stata incubata a 25°C.

#### **3.2.3.3 Monitoraggio del calo in peso delle beute**

Il calo in peso dovuto alla perdita di  $CO_2$  delle beute allestite per prove di fermentazione in mosto e in MNS è stato monitorato giornalmente e sono stati scelti come parametri di confronto tra i ceppi il calo in peso a 2 gg, a 7 gg e a fine fermentazione.

#### **3.2.3.4 Valutazione del potere schiumogeno**

Per ciascun isolato cresciuto in MNS e in mosto naturale è stata valutata la capacità di produrre schiuma durante la fermentazione misurandone l'altezza in mm.

#### **3.2.3.5 Valutazione della rapidità di sedimentazione**

Per ciascun isolato cresciuto in MNS e in mosto naturale è stata valutato il tempo di illimpidimento del mezzo come numero di giorni necessari per la sedimentazione dei lieviti a partire dal momento dell'inoculo.

#### **3.2.3.6 Adesività**

Per ciascun isolato cresciuto in MNS è stata valutata la capacità delle cellule di crescere adese alla superficie della beuta. E' stata misurata l'altezza (in mm)

dell'alone di crescita delle cellule dal fondo della beuta. La misura è stata eseguita a fine fermentazione.

### **3.2.4 PRODUZIONE DI IDROGENO SOLFORATO**

Ciascun isolato è stato seminato su terreno Biggy agar in modo da ottenere una crescita a colonia singola. Le piastre sono state incubate a 25°C per 4 giorni, trascorsi i quali si è valutata la colorazione delle colonie singole sviluppatesi.

### **3.2.5 TEST DI RESISTENZA ALL'ETANOLO**

#### **3.2.5.1 Preparazione della brodocoltura**

I lieviti sono stati coltivati in YPD solido a 25°C per 3 gg. Le colture ottenute sono state utilizzate per inoculare 10 ml di terreno liquido YPD. Le provette sono state lasciate ad incubate per 30 ore a 25 °C in agitazione in modo da ottenere una coltura in fase stazionaria (circa  $10^7$  cellule/ml).

#### **3.2.5.2 Allestimento del test**

Al terreno YPD agarizzato liquido (temperatura di circa 45 °C) sono state aggiunte aliquote diverse di etanolo in modo da ottenere concentrazioni finali di alcol di 14 %, 15%, 16%, 17%.

L'inoculo è stato fatto aggiungendo una goccia di coltura (20µl) sulla superficie della piastra. La crescita è stata osservata, dopo 24 e 48 a 25°C, registrando la presenza di una patina microbica in corrispondenza della goccia d'inoculo.

### **3.2.6 TEST DI RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA**

#### **3.2.6.1 Preparazione della brodocoltura**

I lieviti sono stati coltivati in YPD solido a 25°C per 3 gg. Le colture ottenute sono state utilizzate per inoculare 10 ml di terreno liquido YPD. Le provette sono state lasciate ad incubate per 30 ore a 25 °C in agitazione in modo da ottenere una coltura in fase stazionaria (circa  $10^7$  cellule/ml).

#### **3.2.6.2 Allestimento del test**

E stata preparata una prima diluizione della brodocoltura in fase stazionaria aggiungendo, in provette tipo eppendorf da 2 ml, 300 µl di coltura e 1,7 ml di mezzo nutritivo sintetico.

In una provetta tipo Falcon è stata diluito 1:10 una soluzione acquosa di anidride solforosa (10 gr/l) con mosto sintetico.

Nella cuvetta preventivamente sterilizzata con radiazioni UV si è proceduto alle aggiunte come riportato in tabella in modo da ottenere un inoculo di circa  $10^5$  cellule/ml per ogni concentrazione di anidride solforosa testata.

Concentrazione SO <sub>2</sub> (mg/l)	Volume di mosto sintetico (ml)	Volume di coltura diluata (ml)	SO <sub>2</sub> (1 gr/l) (ml)
0	2,8	0,2	-
50	2,65	0,2	0,15
100	2,5	0,2	0,3
200	2,2	0,2	0,6

### **3.2.7 TEST PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ β-GLUCOSIDASICA**

L'esperimento si articola nell'arco di 3 giornate. Il primo giorno è previsto un preinoculo in liquido dei ceppi cresciuti su piastra, il secondo giorno un inoculo in mosto sintetico ed il terzo giorno si esegue il test in microtiter e la lettura allo spettrofluorimetro.

#### **3.2.7.1 Condizioni di crescita dei ceppi di lievito**

I ceppi di lievito da analizzare sono stati cresciuti per 48 h a 30°C su piastre di YPD (estratto di lievito 10 g/l, peptone 20 g/l, glucosio 20 g/l) partendo dagli stock in glicerolo 20% conservati a -20°C. Successivamente le piastre sono state conservate a 4°C.

#### **3.2.7.2 Inoculo**

Il preinoculo dei lieviti in liquido è stato effettuato utilizzando come mezzo YPD contenente 5 g/l di glucosio anzichè i 20 g/l previsti dalla ricetta originale. Dalla piastra è stata prelevata una quantità minima di materiale cellulare con un puntale

e inocolata in provette tipo Falcon da 50 ml contenenti 10 ml di terreno. Le provette sono state incubate in agitazione a 30°C per circa 24 h.

Il giorno successivo è stata effettuata una misura della densità ottica dei ceppi a 600 nm per verificare il livello di crescita ottimali per l'inoculo in MSN. I ceppi aventi densità ottica misurata a 600 nm compresa tra 1,5 e 2,0 sono stati inoculati in MSN. Sono stati prelevati 500 µl di coltura in YPD e trasferiti in 9,5 ml di MSN in modo tale da ottenere un inoculo di circa 10<sup>6</sup> CFU/ml. Le provette tipo Falcon sono state incubate in agitazione a 30°C per circa 24 h.

Dopo 24 h di crescita in MSN è stata misurata la densità ottica a 600 nm. Le colture con densità ottica compresa tra 1,5-1,6 sono stati utilizzati per eseguire il test in microtiter, quelli con valori di densità ottica inferiore sono stati lasciati in incubazione fino al raggiungimento del valore desiderato.

### **3.2.7.3 Preparazione delle soluzioni**

Soluzione di acetato di sodio 0,05 M pH 3,5: pesare 0,41 g di polvere, sciogliere in 100 ml di acqua distillata, aggiustare il pH a 3,5 e filtrare con siringa e filtro da 0,22 µm.

Soluzione di acetato di sodio 0,05 M pH 5: pesare 0,41 g di polvere, sciogliere in 100 ml di acqua distillata, aggiustare il pH a 5 e filtrare con siringa e filtro da 0,22 µm.

Soluzione satura di bicarbonato di sodio: sciogliere 9,6 g di polvere in 100 ml di acqua distillata, aggiungere ancora bicarbonato fino a completa saturazione (la solubilità a 20°C è di 9,6 g in 100 g di acqua), filtrare con siringa e filtro da 0,22 µm.

Soluzione stock di MUD (4-metilumberilliferone β-D-glucopiranoside) 50 mM: pesare 16,92 mg di polvere, sciogliere in 1 ml di dimetilformammide.

Soluzione di MUD 0,76 mM in acetato di sodio pH 3,5 e 5: prelevare 76 µl di MUD 50 mM e diluirli in una provetta tipo Falcon con 5 ml di acetato di sodio pH 3,5. Diluire la stessa quantità di MUD con 5 ml di acetato di sodio a pH 5. Il volume calcolato è per una singola piastra microtiter. Coprire le provette con alluminio e lasciarle in ghiaccio.

Soluzione di MU 1 mM: pesare 19,8 mg di polvere, sciogliere in 100 ml di acqua distillata e filtrare con siringa e filtro da 0,22 µm.

#### **3.2.7.4 Preparazione della curva di taratura**

La curva di taratura è stata preparata utilizzando 4-metilumbelliferone sodico (MU) a diverse concentrazioni in 3 repliche.

Sono stati preparati 2 ml di soluzione di MU 50  $\mu\text{M}$  (1) prelevando 100  $\mu\text{l}$  dalla soluzione stock 1 mM e aggiungendo 1900  $\mu\text{l}$  di sodio acetato a pH 5.

Da questa soluzione madre sono state preparate le altre mediante le diluizioni riportate di seguito.

- Concentrazione 10  $\mu\text{M}$ : 200  $\mu\text{l}$  della soluzione madre sono stati aggiunti a 800  $\mu\text{l}$  di sodio acetato 0,05 M.
- concentrazione 5  $\mu\text{M}$ : 100  $\mu\text{l}$  della soluzione madre sono stati aggiunti a 900  $\mu\text{l}$  di sodio acetato 0,05 M.
- concentrazione 1  $\mu\text{M}$ : 20  $\mu\text{l}$  della soluzione madre sono stati aggiunti a 980  $\mu\text{l}$  di sodio acetato 0,05 M.
- concentrazione 0,1  $\mu\text{M}$ : 2  $\mu\text{l}$  della soluzione madre sono stati aggiunti a 998  $\mu\text{l}$  di sodio acetato 0,05 M.
- concentrazione 0  $\mu\text{M}$  (bianco): 1ml di sodio acetato 0,05 M.

Le soluzioni sono state tenute in ghiaccio fino al momento dell'uso.

Le soluzioni a concentrazione crescente di MU da utilizzare direttamente in microtiter in triplicato sono state preparate in provette tipo Eppendorf da 2 ml come segue. Per ogni replica a 50  $\mu\text{l}$  di acqua milliQ sterile sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  delle soluzioni contenenti le diverse concentrazioni di MU (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) preparate in precedenza e 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{NaHCO}_3$  saturo.

#### **3.2.7.5 Preparazione dei campioni**

Per ciascuna delle tre repliche, 100  $\mu\text{l}$  di coltura in MSN 3 sono stati prelevati e trasferiti in provette tipo Eppendorf da 2 ml. Dopo centrifugazione a 14000 rpm per 3 minuti e drenaggio il liquido surnatante il pellet è stato risospeso in 50  $\mu\text{l}$  di sodio acetato a pH 3,5. La procedura è stata ripetuta per la determinazione a pH 5.

#### **3.2.7.6 Allestimento del test in microtiter**

Ciascun campione, preparato nel modo descritto in precedenza, è stato trasferito in un pozzetto della piastra microtiter. Successivamente ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di MUD. La piastra è stata poi incubata a 37°C per 5 min. dopo i quali sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{NaHCO}_3$  saturo per bloccare la reazione. Alcuni

pozzetti della piastra sono stati utilizzati per caricare le soluzioni (150  $\mu$ l), preparate in precedenza, contenenti concentrazioni crescenti di MU per la costruzione della curva di taratura. Successivamente è stata effettuata la lettura della piastra con lo spettrofluorimetro (SpectraFluor, Tecan) utilizzando per l'eccitazione un filtro a 390 nm e per rilevare l'emissione un filtro a 465 nm).

### **3.2.8 DEGUSTAZIONE**

Alla fine di ciascuna fermentazione condotta in beuta a partire da mosto, il prodotto (200 ml circa di vino base) è stato trasferito in due bottiglie da 100 ml ciascuna, chiuse con tappo corona e conservate a 10°C. Il panel test è stato composto da 8 assaggiatori, di età compresa tra i 25 ed i 50 anni. Sono stati scelti assaggiatori esperti, tecnici del settore e conoscitori della tecnologia di produzione del Prosecco. I campioni sono stati presentati in forma anonima, il vino è stato servito a una temperatura di 10°C circa. La scheda di valutazione, appositamente redatta, chiedeva un giudizio espresso numericamente con una scala da 1 a 10, in relazione ai seguenti parametri: tipicità, presenza di eventuali difetti, presenza di note organolettiche gradevoli. Si chiedeva, inoltre, per i dieci campioni migliori, di esprimere anche un giudizio di preferenza, riordinando numericamente i campioni a cominciare da quello con le migliori caratteristiche.

### **3.2.9 ANALISI CANONICA DISCRIMINANTE**

L'analisi canonica discriminante (CDA) crea delle nuove variabili, chiamate funzioni canoniche discriminanti che sono una combinazione lineare delle variabili originali ed è finalizzata a massimizzare le differenze tra gruppi. Il metodo permette di riorganizzare le osservazioni sperimentali in uno spazio diverso, con meno dimensioni, ma senza perdere la capacità di differenziare i gruppi.

L'analisi canonica discriminante (CDA) è stata eseguita per analizzare le differenze tra le diverse classi di profili genetici utilizzando le seguenti variabili: glucosio a 2gg, a 7gg, a fine fermentazione, giorni di fine fermentazione, altezza schiuma, adesività e biggy.

Come indice di separazione tra le classi è stata utilizzata la distanza di Mahalanobis che indica se la distanza quadratica tra le classi è significativa.

E' stata utilizzata la variabile casuale Lambda di Wilks come test di verifica dell'ipotesi nell'ambito dell'analisi statistica multivariata.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software SAS 9.1 statistical package (SAS Institute, Cary, NC).

### **3.2.10 MICROVINIFICAZIONI**

#### **3.2.10.1 Preparazione dell'inoculo**

I 10 lieviti previsti per la microvificazione sono stati coltivati in Malt agar modificato, utilizzando il peptone vegetale rispetto al tradizionale estratto proteico di carne, in vista di un impiego dei vini ottenuti per la degustazione. Da queste piastre è stata prelevata una certa quantità di lievito per inoculare 20 ml di una soluzione di saccarosio al 18% in modo da avere una OD<sub>600</sub> pari a 1, corrispondente a circa 10<sup>7</sup> cell/ml. Quindici ml della sospensione cellulare così ottenuta sono stati aggiunti a 300 ml di mosto di prosecco (mosto 2004 conservato a -20°C) addizionato di 0,75 g/l di ammonio solfato al fine di favorire l'aumento della massa cellulare. Le beute sono state incubate a 25°C, senza agitazione. Una volta raggiunta nuovamente una OD<sub>600</sub> pari a 1, si è trasferita la coltura in 3 l dello stesso mosto lasciando crescere il lievito nelle stesse condizioni fino ad un valore di assorbanza pari a 1.

Al fine di stimare il tempo necessario per la preparazione delle colture e poter effettuare l'inoculo in damigiana di tutti i ceppi contemporaneamente, sono state eseguite delle prove preliminari mimando la procedura di preparazione fino all'avvio della fermentazione tumultuosa (OD<sub>600</sub> = 1) nella beuta da 300 ml. Questa prova ha permesso di variare il momento di preinoculo a seconda della velocità di crescita dei diversi ceppi.

La concentrazione cellulare nelle beute finali ed il potenziale inoculo dovuto al mosto di partenza (non pastorizzato) è stato verificato tramite conta su piastre di YM.

Ad ogni inoculo successivo è verificata la corrispondenza tra densità ottica e numero di unità formanti colonia (CFU) desiderato, ossia 10<sup>6</sup> cell/ml.

### **3.2.10.2 Microvinificazioni**

Le microvinificazioni sono state effettuate presso le strutture di Veneto Agricoltura nella sede di Conegliano (TV).

Il mosto di Prosecco è stato prelevato dalla cantina Masottina da un serbatoio a 15°C già solfitato (50 mg/l SO<sub>2</sub> totale) e trasportato in bidoni da 100 l presso la cantina di lavorazione. Il mosto conservato a 10 °C in attesa dell'inoculo.

Il mosto è stato suddiviso in 10 damigiane (volume contenitore 34 l) con 30 l ciascuno e portato a temperatura ambiente per circa 12 ore in modo da portare la temperatura a 16-18°C. L'inoculo è stato effettuato aggiungendo 3 l di coltura di lievito in 30 l di mosto. In concomitanza con l'inoculo è stato aggiunto attivante (ammonio fosfato 59,88%, tiamina cloridrato 0,6%, cellulosa 39,52%) alla concentrazione di 10 g/hl.

Il giorno successivo all'inoculo è stato effettuato un prelievo di materiale (100 ml) per l'analisi FOSS. I campionamenti per queste analisi sono stati effettuati con cadenza giornaliera nel primo periodo di fermentazione e successivamente ogni 2-3 giorni a seconda dei valori degli zuccheri valutati con il metodo enzimatico (EC<sup>TM</sup> Wine Glucose + Fructose Total HL/ML Diffchamb). A due giorni dall'inoculo sono stati aggiunti nuovamente 10 g/hl di attivante. Alla fine della fermentazione alcolica (quando la concentrazione di zuccheri stimata con il metodo enzimatico è inferiore a 1 g/l) sono stati trasferiti a 12°C ed il giorno successivo sono stati travasati in contenitori da 28 litri. Dopo 5 giorni dal travaso sono stati aggiunti 6 g/l di metabisolfito di potassio. I ceppi che dopo 5 giorni dall'inoculo non avevano finito la fermentazione alcolica sono stati nuovamente addizionati di attivante alla dose di 5 g/hl. Nei casi in cui quest'ultima operazione non aveva portato ad esaurimento degli zuccheri, a 10 giorni dall'inoculo sono stati iniettati 5 g/l di ossigeno. Questa procedura è stata ripetuta a 15 giorni nei casi necessari. Dopo la fine della fermentazione il trattamento è stato uguale per tutti.

Successivamente è stato effettuato un controllo della solforosa, del pH e del rame e si è provveduto all'aggiunta di metabisolfito di potassio fino ad ottenere 0,8 g/l di solforosa molecolare.

Per tutti i campioni è stato effettuato un periodico rimescolamento delle fecce (ogni 10 giorni).

A circa tre mesi dall'inoculo è stato effettuato il test di stabilità proteica ed è stata aggiunta bentonite in quantità diversa a seconda del tipo di lievito. Dopo 2 giorni il vino è stato travasato in contenitori da 25 l.

Successivamente (dopo ulteriori 3 giorni) è stata effettuata una prefiltrazione per contropressione con filtri di porosità 10-5-3  $\mu\text{m}$ , riducendo il volume a 20 l.

Dopo circa un mese è stata controllata nuovamente la  $\text{SO}_2$  e portata ad un valore di 1,2 mg/l.

Il vino, previa filtrazione (filtri di porosità 2-1-0,65  $\mu\text{m}$ ), è stato imbottigliato e conservato a temperatura di 15°C.

### **3.2.10.3 Analisi chimiche**

Per la determinazione di grado alcolico, zuccheri riducenti, etanolo, acidità totale, acidità volatile, acido tartarico, acido malico, glicerolo, pH e APA 100 ml di mosto in fermentazione/vino sono stati prelevati con pipette graduate (25 ml) a circa metà del contenitore. Il liquido è stato filtrato con farina fossile e conservato in ghiaccio per il trasporto alla cantina Masottina, sede dell'analisi. La strumentazione utilizzata è il Wine scan™ (FOSS).

### 3.3 RISULTATI

#### 3.3.1 CARATTERIZZAZIONE FISIOLÓGICA DEGLI ISOLATI APPARTENENTI AL GRUPPO *Saccharomyces sensu stricto*: CRESCITA IN MOSTO SINTETICO

Dopo l'isolamento e la caratterizzazione genetica la seconda fase della selezione è proceduta con l'individuazione di ceppi con caratteri tecnologici ottimali. Nel precedente paragrafo sono stati elencati i principali caratteri tecnologici e di qualità che possono essere scelti come criteri di selezione, in questo capitolo, verranno illustrati i risultati ottenuti.

Il pool di isolati (308) ottenuti nelle fasi precedenti di campionamento e caratterizzazione genetica sono stati sottoposti a coltivazione simulando condizioni enologiche. Ciascun isolato è stato inoculato ad una concentrazione di circa  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml in una beuta contenente 200ml di mosto sintetico e sono stati valutati i principali caratteri tecnologici. Il vantaggio di utilizzare mosto sintetico, rispetto a quello naturale, per un a prima valutazione fisiologica, è quello di poter controllare completamente l'ambiente di sviluppo, e di facilitare notevolmente le operazioni di monitoraggio giornaliero della crescita.

In particolare è stato osservato il vigore fermentativo, ovvero la prontezza con cui il ceppo dà inizio alla fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine. Una caratteristica che dipende dal tempo di generazione del ceppo. E' stata valutata registrando il calo in peso a 2 gg dall'inoculo e i giorni totali di fermentazione. Altro carattere importante è il potere fermentativo, ovvero la quantità massima di etanolo che un lievito può formare per fermentazione di un mezzo (mosto) contenente zucchero in eccesso. Non è stato possibile valutare questa caratteristica, durante le prove di crescita, in quanto la fermentazione in mosto sintetico è stata condotta considerando una concentrazione media di zuccheri (200 g/l), che è la situazione ideale per osservare il vigore fermentativo, mentre per verificare la massima produzione d'alcol è necessario aggiungere una quantità di zucchero molto più elevata (300 g/l) (Delfini, 1995). In realtà, dati di letteratura riferiscono che la maggior parte dei ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* isolati in natura esibisce un'ottima capacità di produrre etanolo e raggiunge normalmente i 14-15 gradi alcolici (Vincenzini, *et al.*, 2005). Durante

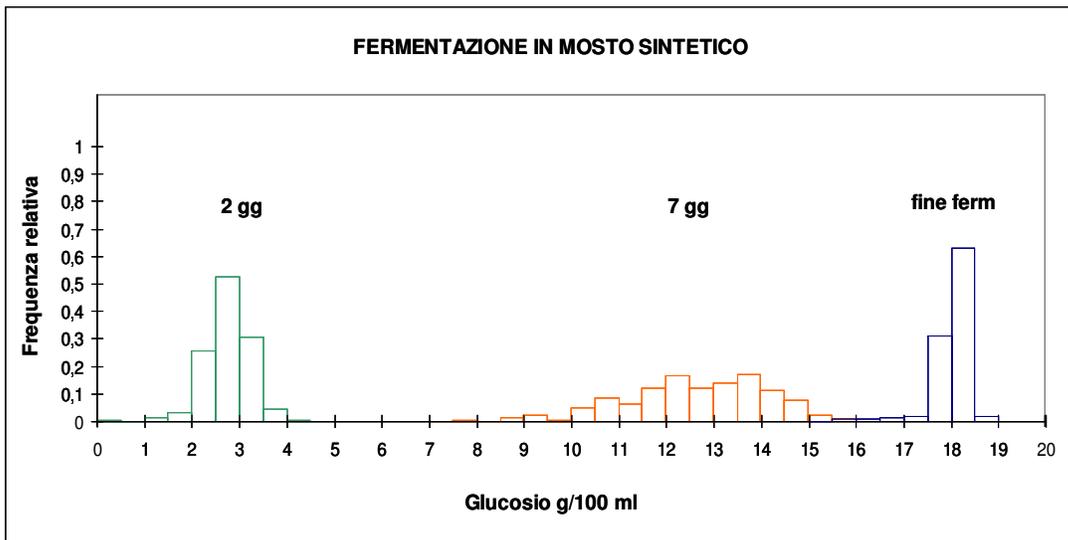
la crescita in mosto è stata valutata anche la modalità di sviluppo del lievito, l'adesività, il tempo di illimpimento del mezzo e produzione di schiuma.

Considerando in generale la crescita in mosto sintetico quasi tutti gli isolati saggiati hanno portato a termine la fermentazione alcolica sviluppando circa 11 gradi d'alcol e consumando tutto lo zucchero disponibile. Soltanto gli isolati caratterizzati dal profilo 4, 23, 31 e 32 non sono stati in grado di fermentare in mosto sintetico. Mentre all'interno del profilo 8, uno solo su 5 ha portato a termine la fermentazione. In relazione alla modalità di sviluppo, generalmente gli isolati hanno dimostrato una crescita a cellule disperse (sviluppo pulverulento). Solo in rari casi si è osservato uno sviluppo a fiocchi. In particolare per gli appartenenti al gruppo 5 pur essendo caratterizzati da uno sviluppo pulverulento in fase avanzata di crescita si è osservata una leggera flocculazione. Questa modalità di sviluppo è stata osservata in altri 3 casi e sembra non essere correlata alla suddivisione in gruppi sulla base del profilo elettroforetico. Sono coinvolti gli isolati *P304,13*, *P304,6* unici rappresentanti rispettivamente dei gruppi 14 e 16 e l'isolato *P304,14* appartenente al gruppo 17 che contiene altri 5 isolati tutti a sviluppo pulverulento.

Questa variabilità fenotipica all'interno del gruppo identificato dall'analisi del profilo elettroforetico si ripropone osservando tutti i caratteri analizzati ed è particolarmente evidente considerando i parametri glucosio consumato a due giorni, a sette giorni, a fine fermentazione, giorni di fermentazione, dimensioni della schiuma, velocità di illimpimento e dimensioni dello strato adesivo. Questa osservazione è in palese contrasto con i risultati attesi che prevedevano mediante analisi del DNA mitocondriale la costruzione di gruppi omogenei non solo dal punto di vista genotipico ma anche fenotipico. Infatti questo sistema di caratterizzazione ha il vantaggio di analizzare quella parte del DNA di lievito in grado di mutare più facilmente (la DNA polimerasi che duplica il DNA mitocondriale non è dotata di attività di correzione degli errori) e quindi dovrebbe essere in grado di separare il pool di isolati in gruppi dotati anche di minime diversità genetiche (Querol. *et al.*, 1996). L'elevata variabilità fenotipica si osserva chiaramente non solo all'interno di gruppi elettroforetici molto numerosi come il 6 (85 isolati), l'11 (53 isolati), o numerosi come il 29 (16 isolati), ma si osserva anche in raggruppamenti che lo sono molto meno (il 17 con 5 isolati, il 2

con 4 isolati il 12 con 2 isolati.) Solo nel caso del profilo 27 tutti e quattro gli isolati presentano le medesime caratteristiche.

L'elaborazione dei dati relativi alle *performance* di fermentazione in mosto sintetico, con le modalità viste in precedenza, è stata condotta mettendo in relazione i risultati del singolo isolato sul totale degli individui analizzati (figura 3.4.1). Considerando il primo carattere analizzato, la quantità di glucosio consumata su 100 ml di mosto sintetico dopo due giorni di fermentazione, si osserva che la maggior parte degli isolati (44,4%) si attesta all'interno di una classe con valori compresi nell'intervallo 2,5-3 g/100 ml. Soltanto il 4,1% degli isolati mostra un bassissimo vigore fermentativo caratterizzato da un consumo di glucosio inferiore a 2 g/100 mL, la quantità minima di glucosio (0,36 g/100 mL) è stata osservata nel campione X36.15. Anche un vigore fermentativo estremamente elevato è rappresentato da un esiguo gruppo di isolati (4,1%) che si collocano nelle due classi con valori superiori a 3,5 g/100 mL, la massima quantità di glucosio consumata (4 g/100 mL) è stata ottenuta nel campione P138.1.



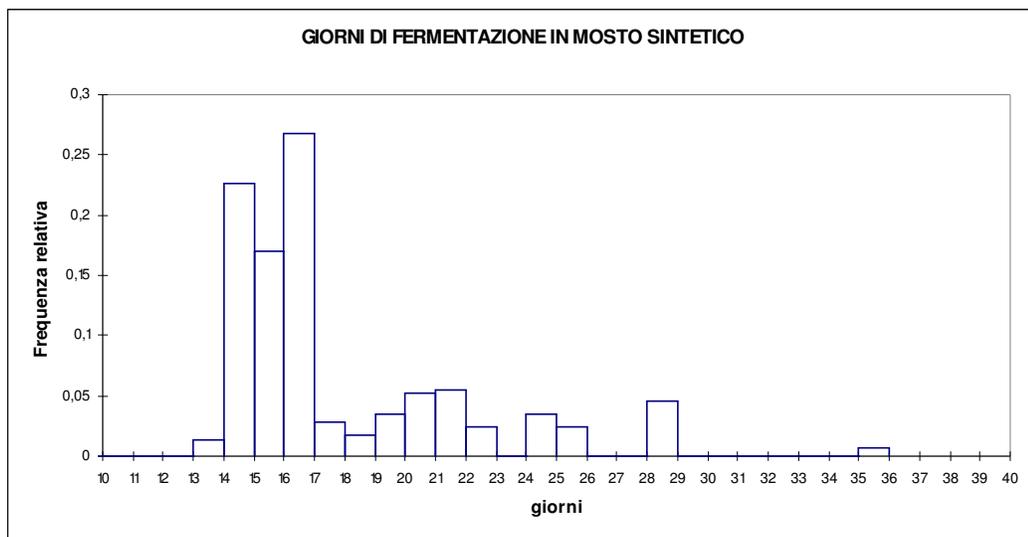
**Fig. 3.3.1** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base al consumo di glucosio in mosto sintetico.

Per quanto riguarda il consumo di glucosio a 7 giorni dall'inizio della fermentazione possiamo vedere che la distribuzione in classi è molto più omogenea, esiste una notevole diversità tra gli isolati. Il valore massimo di 15,8 g di glucosio è stato osservato nel campione X39.3, mentre il valore minimo di 7,8

g nel campione B173.2. Il valore medio è di 12,65 g e l'intervallo di maggior frequenza è tra 12 e 12,5 g di glucosio (14%).

Per quanto riguarda i valori di glucosio consumato a fine fermentazione (figura 3.4.1) la classe di maggior frequenza (62,8% degli isolati) è quella che contiene i ceppi che hanno consumato da 18 a 18,5 g di glucosio su 100/mL. Il valore minimo è di 15,68 g/100mL di glucosio consumato (ceppo P301.12) ed il valore massimo di 18,57 g/100 mL.

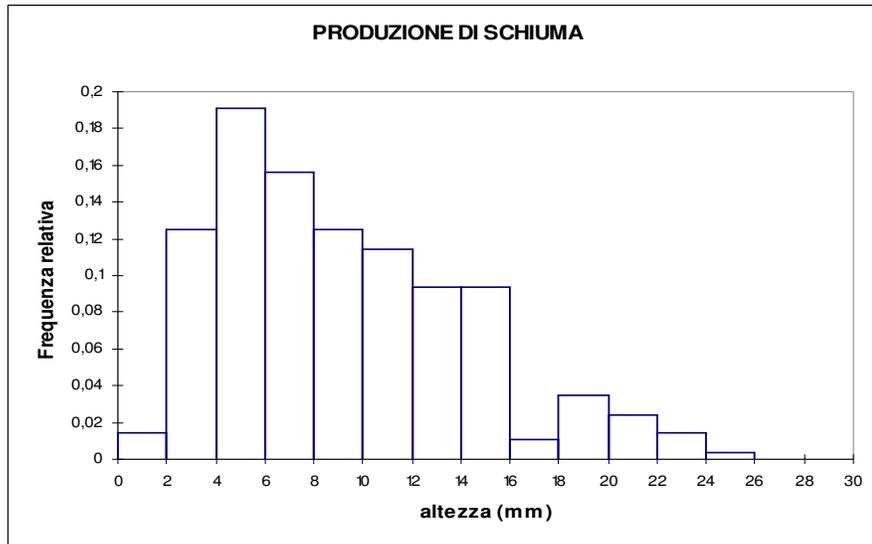
Considerando la durata della fermentazione (Fig. 3.3.2) osserviamo che la maggior parte dei isolati (26,7%) consuma gli zuccheri in 16 giorni e una buona parte termina la fermentazione in 14 e in 15 giorni (22,6% e 17% rispettivamente). Soltanto 4 isolati appartenenti al gruppo 6 (1,4%) dimostrano un vigore fermentativo lievemente superiore concludendo la fermentazione in 13 giorni. Sono stati isolati anche ceppi molto più lenti, che complessivamente costituiscono solo il 33% del totale. Il più lento è stato un ceppo appartenente alla specie *Saccharomyces paradoxus*, il B125,5, unico rappresentate del gruppo 10 che ha concluso la fermentazione in 35 giorni.



**Fig. 3.3.2** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base alla durata della fermentazione.

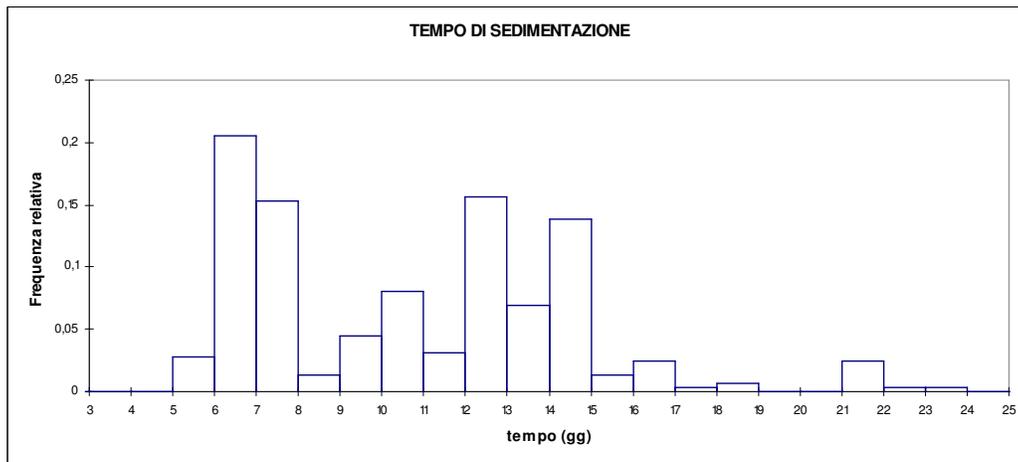
Per quanto riguarda il carattere produzione di schiuma (Fig. 3.3.3) la distribuzioni in classi è molto più omogenea, mettendo in risalto una notevole diversità. Si

passa dalla situazione di isolati che non producono affatto schiuma a quelli che ne producono una quantità non accettabile, fino a un massimo di 25 millimetri. Il valore medio di produzione di schiuma degli isolati si attesta attorno agli 8,5 mm.



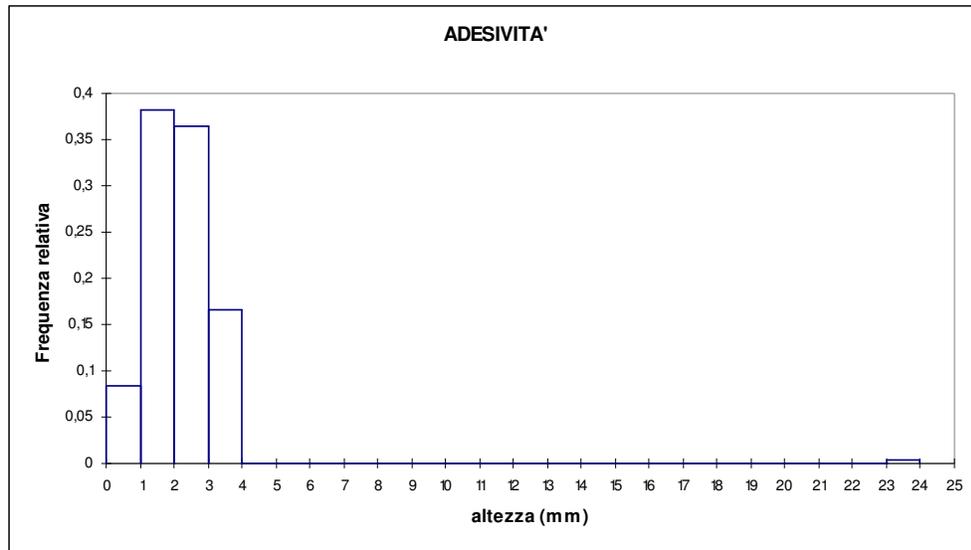
**Fig. 3.3.3** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base all'altezza della schiuma prodotta durante la fermentazione in mosto sintetico.

Considerando la velocità di illimpidimento (Fig. 3.3.4) anche qui si osserva una distribuzione omogenea degli isolati anche se la maggior parte (20,5%) si attesta nelle classe comprendente i valori più bassi (6 giorni). Solo 9 isolati hanno fatto registrare tempi di illimpidimento estremamente elevati (da 22 a 24 giorni).



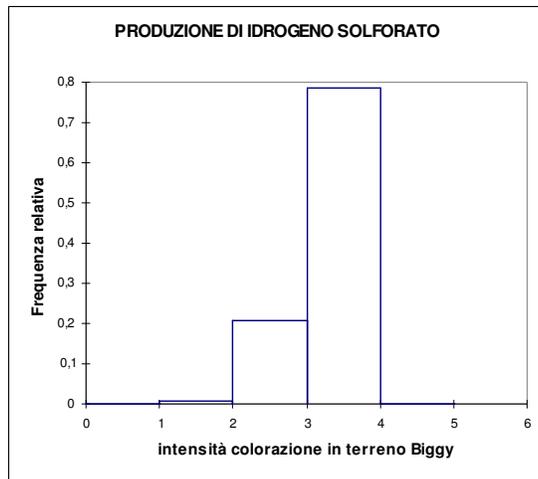
**Fig. 3.3.4** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base tempo di sedimentazione dei lieviti durante la fermentazione in mosto sintetico.

Considerando la capacità adesiva, invece, la maggior parte dei campioni si attesta nelle classi con valori di 1 e 2 mm di alone (rispettivamente il 38,2 e il 36,5%). Alcuni ceppi non presentano nessun alone di adesività (8,3%), invece per un solo ceppo è stata misurato un alone di adesività pari a 23 mm, molto più elevato rispetto a tutti gli altri isolati.



**Fig. 3.3.5** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base all'altezza dell'alone di adesività prodotta durante la fermentazione in mosto sintetico.

La crescita su Biggy agar (figura X) ha evidenziato che nessun isolato saggiato ha una forte produzione in piastra di H<sub>2</sub>S, non sono mai state osservate infatti colonie di colore marrone scuro. La maggior parte invece è caratterizzata da una produzione modesta che determina una colorazione marrone chiaro (78,6%) oppure beige (20,5%) della colonia. Una piccola percentuale (0,7%) caratterizzata da colonie di colore bianco sembra non produrre H<sub>2</sub>S, questa situazione generalmente si verifica quando l'enzima chiave dell'organizzazione dello zolfo non funziona: la solfito riduttasi, che trasforma lo ione solfito a solfuro successivamente incorporato per la sintesi degli aminoacidi solforati. In questi casi lo ione solfito non viene trasformato ed esce dalla cellula sottoforma di anidride solforosa. Si può ipotizzare quindi che questi ceppi siano caratterizzati da produzione di elevate quantità di anidride solforosa endogena e quindi poco idonei all'uso in cantina (Zambonelli, 2003).



**Fig. 3.3.6** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base alla produzione di idrogeno solforato valutata in terreno Biggy agar espressa come intensità della colorazione della colonia. Bianca=1, Beige=2, Marrone Chiaro=3, Marrone Scuro=4.

I dati relativi alla crescita in mosto sintetico hanno permesso la scelta dei 66 isolati più interessanti per le successive prove in mosto di Prosecco. I criteri di scelta oltre alle migliori performance di fermentazione sono stati anche il gruppo elettroforetico di provenienza, il campione di provenienza, in modo da ben rappresentare, anche nelle prove successive, la biodiversità microbica raccolta.

### 3.3.2 ANALISI CANONICA DISCRIMINANTE

L'analisi canonica discriminante (CDA) costituisce un ottimo mezzo per studiare graficamente le distanze tra gruppi e comprendere quali caratteristiche contribuiscono meglio alla discriminazione. Nel progetto questo strumento statistico è stata utilizzato per mettere in relazione i profili genetici alle caratteristiche fenotipiche degli isolati. In figura x è riportato il grafico ottenuto con l'analisi canonica discriminante dei 308 isolati appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* di cui sono state definite le performance di fermentazione in mosto sintetico. La variabile di raggruppamento degli isolati è il profilo genetico ottenuto mediante l'analisi del DNA mitocondriale, le variabili

analitiche sono le seguenti: quantità di glucosio consumata a 2gg e a 7gg dall'inizio della fermentazione, e la quantità totale, la durata della fermentazione espressa in giorni, l'altezza della schiuma prodotta, adesività e la produzione di Idrogeno solforato osservata su terreno Biggy. Dei 38 profili genetici individuati gli isolati con profilo 4, 23, 31 e 32 non rientrano nell'analisi perché non hanno fermentato, quindi non ci sono variabili misurate relative a questi profili. Inoltre anche gli isolati con profilo 5 non rientrano nell'analisi pur avendo fermentato poiché non sono cresciuti su terreno Biggy. La variabile canonica CAN1, riportata sull'asse X del grafico, da sola spiega il 53,35% del totale della variabilità del sistema, mentre sommando a questa la variabile CAN2, riportata sull'asse Y, si ottiene la giustificazione dell'81,73% della variabilità totale, risultati che dal punto di vista statistico indicano che quest'analisi è in grado di interpretare molto bene i risultati sperimentali ottenuti.

Inoltre l'analisi statistica univariata rivela che tutte le variabili sono risultate significative ( $p \leq 0,05$ ) nel determinare le differenze tra i gruppi con diverso profilo genetico (vedi tabella). Queste osservazioni indicano che dal punto di vista statistico la CDA è in grado di interpretare molto bene i risultati sperimentali ottenuti e che i gruppi con diverso profilo genetico si differenziano gli uni dagli altri in base alle variabili fenotipiche prese in considerazione.

I rimanenti 281 isolati risultano raggruppati in 33 profili genetici diversi e la distanza quadratica di Mahalanobis, parametro principale di significatività nell'analisi, tra i vari profili risulta altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) nella maggior parte dei casi. I profili che hanno una distanza di Mahalanobis non significativa ( $P > 0,05$ ) sono le coppie di profili 8 e 10, 6 e 21.

Le variabili fenotipiche analizzate sono indicate nella tabella 2.2 in ordine d'importanza in base a *F value*. Come si può osservare dai valori riportati, le variabili che più incidono nello spiegare le differenze tra i gruppi sono “giorni di fermentazione” e “crescita su terreno Biggy” che sono caratterizzate da un *F value* estremamente elevato.

<b>Variabile</b>	<b>F value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
Giorni di fermentazione	92,03	<0,0001
Crescita su terreno Biggy	56,33	<0,0001
Glucosio consumato a 7 gg	24,6	<0,0001
Glucosio a fine fermentazione	23,88	<0,0001
Limpidezza	10,54	<0,0001
Schiuma	7,72	<0,0001
Glucosio consumato a 2 gg	6,41	<0,0001
Adesività	3,4	<0,0001

**Tab 3.3.1** Variabili fenotipiche analizzate e significatività statistica

Considerando l'analisi multivariata la variabile casuale Lambda di Wilks, che è relativa alla validità del modello applicato, è risultata altamente significativa ( $P < 0,0001$ ).

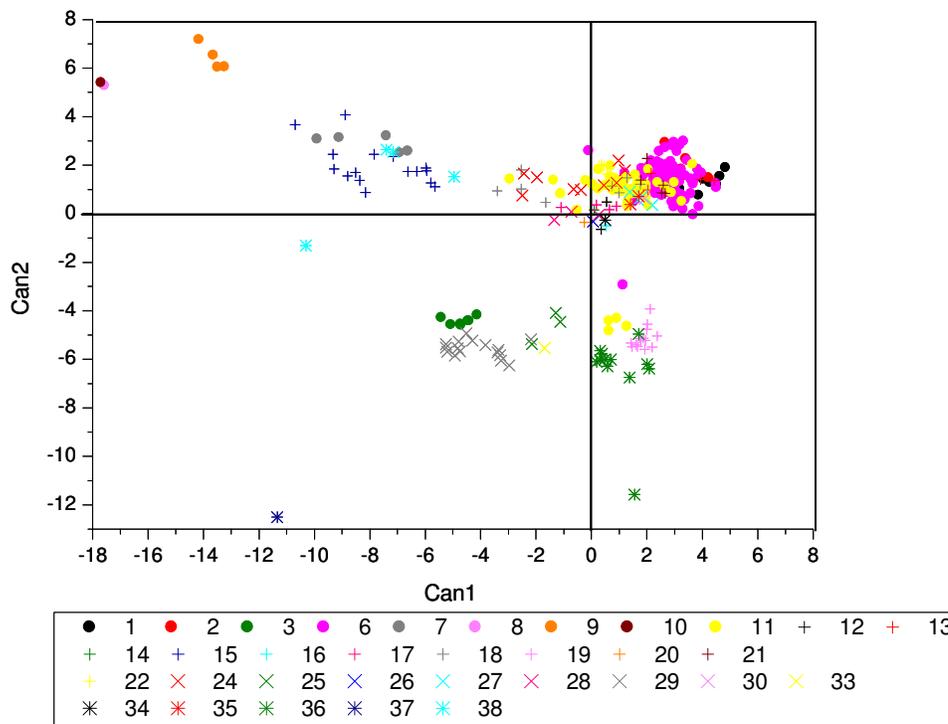
La posizione degli isolati sul grafico è determinata dal coefficiente di Pearson attribuito dall'analisi statistica alle variabili fenotipiche come riportato in tabella 2.3. In particolare l'asse CAN1 è in grado di spiegare principalmente la variabile "crescita su terreno Biggy" (gli isolati con valori elevati per questa caratteristica avranno un valore positivo) e "giorni di fermentazione" (gli isolati con un tempi di fermentazione elevati hanno sul grafico valori negativi). Analoghe osservazioni possono essere fatte in relazione alla seconda variabile canonica (CAN2).

L'asse CAN2 è in grado di giustificare, infatti, il 28,38% della variabilità, dovuta principalmente a differenze nelle variabili "crescita su terreno Biggy", "limpidezza" e "consumo di glucosio a 2 gg" con correlazioni positive.

Quindi l'asse CAN1 è il principale responsabile della distribuzione grafica dei campioni. Questa separazione può essere attribuita, in ordine di significatività statistica in base ai valori del coefficiente di Pearson, a differenze nelle variabili di "giorni di fine fermentazione" (con correlazione negativa), "glucosio consumato a 7 gg", "glucosio consumato a fine fermentazione", "schiuma", "glucosio consumato a 2 gg", "crescita su terreno Biggy" (tutti con correlazione positiva) e infine "limpidezza", "adesività" (con correlazione negativa).

Coefficiente di correlazione di Pearson		
Variabile	CAN1	CAN2
Giorni di fermentazione	-0,96284***	0,08648
Crescita su terreno Biggy	0,18990*	0,94075***
Glucosio consumato a 7 gg	0,74255***	0,04825
Glucosio a fine fermentazione	0,58176***	-0,43318***
Limpidezza	-0,09446	0,21235**
Schiuma	0,44484***	0,05223
Glucosio consumato a 7 gg	0,25948***	0,18414
Adesività	-0,03510	0,05076

**Tab 3.3.2** Coefficiente di correlazione di Pearson di ciascuna variabile per gli assi CAN1 e CAN2 (\* P<0,05; \*\* P<0,001; \*\*\* P<0,0001).



**Fig. 3.3.7** Distribuzione degli isolati in base all'analisi canonica discriminante. I diversi colori indicano i profili genetici di appartenenza.

La suddivisione in quadranti permette di definire per le caratteristiche comuni degli isolati posizionati in ciascuna delle quattro aree. Nel quadrante in alto a destra sono raggruppati gli isolati che si separano prevalentemente lungo l'asse CAN 1 e possiedono le seguenti caratteristiche: minor numero di giorni di fermentazione, maggior consumo di glucosio a due giorni, a sette giorni e a fine fermentazione e maggiore produzione di schiuma. In questo quadrante si collocano anche i due profili più frequenti (6 e 11) che hanno profilo uguale a quello di alcuni ceppi commerciali (vedi cap 2).

Nel quadrante in alto a sinistra gli isolati sono più eterogenei e si separano lungo l'asse CAN1 sempre in base ai giorni di fermentazione e al consumo di glucosio. In questo quadrante si collocano i ceppi con profilo 8, 9 e 10 che sono i più lenti dei precedenti nel concludere la fermentazione (da 28 a 35 giorni).

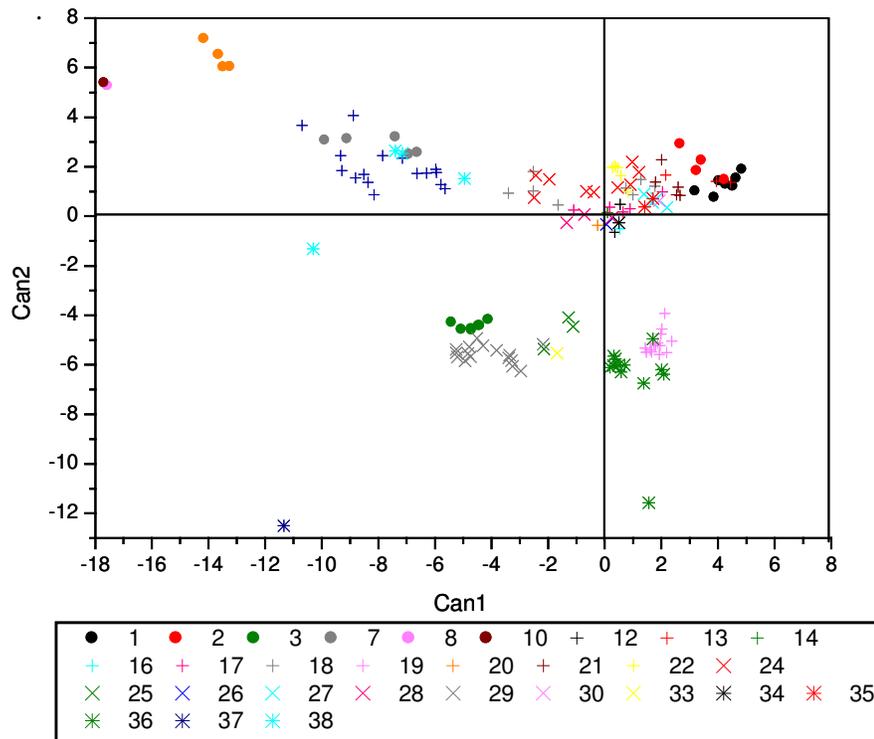
Nei due quadranti in basso si trovano gli isolati che si separano lungo l'asse CAN1 per differenze in giorni di fermentazione (più lenti a sinistra, più veloci a destra) e rispetto agli isolati che si collocano nei quadranti in alto possiedono dei valori di Biggy più bassi, quindi sono minori produttori di idrogeno solforato.

Quindi i ceppi che presentano le migliori caratteristiche cioè che concludono velocemente la fermentazione e consumano maggiori quantità di zuccheri sono collocati nella parte destra del grafico. In particolare in alto a destra ci sono gli isolati che producono quantità maggiori di idrogeno solforato, in basso a destra quelli che ne producono meno, anche se globalmente nessuno degli isolati analizzati ha mai mostrato una elevata produzione di idrogeno solforato in terreno Biggy agar.

Gli isolati con profilo commerciale (11 e 6) si collocano nella parte del grafico in cui ci sono i ceppi che possiedono le migliori performance di fermentazione. In figura 3.3.8 questi due profili sono stati omessi per evidenziare meglio i veri autoctoni.

All'interno del gruppo di isolati con profilo 11, quattro si distaccano dagli altri collocandosi nel quadrante in basso a destra. Questi isolati derivano tutti dallo stesso campione di uva ed in particolare dal campione X36. Mentre quelli con profilo 11 collocati nel quadrante in alto a destra possiedono in terreno Biggy agar una colorazione della colonia marrone chiaro (identificata nell'analisi come valore

3), gli isolati provenienti dal campione X36 possiedono una colorazione beige in Biggy agar (identificata nell'analisi come valore 2), sono caratterizzati quindi da una bassa produzione di idrogeno solforato. In particolare per due di essi, l'X36.1 e l'X36.4, è stata eseguita anche la caratterizzazione a livello di ceppo con la tecnica dei microsattelliti e sono risultati geneticamente diversi dagli altri isolati con lo stesso profilo del DNA mitocondriale che si collocano nell'altro quadrante. Per quanto riguarda invece i profili 8 e 10 essi risultano quasi del tutto sovrapposti nel grafico e sono posizionati nella parte in alto a sinistra. Questi due profili sono caratterizzati da una elevata similarità a livello di DNA mitocondriale (vedi dendrogramma figura 2.3.6), entrambi provengono dallo stesso campione, il B125, e sono stati identificati come *Saccharomyces paradoxus/cariocanus*. Questi ceppi sono i più lenti, portano a termine la fermentazione in 35 giorni. Possiamo concludere che le variabili da noi scelte sono capaci di discriminare i campioni considerati geneticamente diversi a livello di DNA mitocondriale.



**Fig. 3.3.8** Distribuzione degli isolati in base all'analisi canonica discriminante omettendo quelli identificati come commerciali. I diversi colori indicano i profili genetici di appartenenza

### 3.3.3 CARATTERIZZAZIONE FISIOLÓGICA IN MOSTO DI PROSECCO DEGLI ISOLATI SCELTI

I ceppi scelti (66) sulla base delle fermentazioni in mosto sintetico sono stati saggiati ulteriormente mediante prove di crescita in beuta in cui il terreno colturale era mosto di Prosecco, fornito dalla cantina “Masottina Spa” di Conegliano, le cui caratteristiche chimiche sono riportate in tab. 3.3.1.

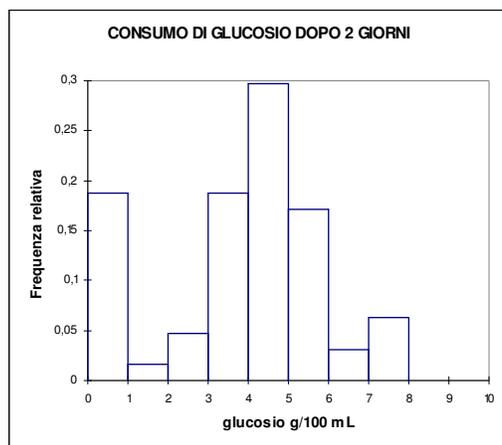
ZUCCHERI (g/l)	pH	ACIDITÀ TOTALE (g/l)	ACIDO MALICO (g/l)	ACIDO TARTARICO (g/l)	APA* (mg/l)
138,5	3,2	7,0	4,2	1,8	264,5

**Tab. 3.3.3** Caratteristiche chimiche del mosto di Prosecco usato nelle prove di fermentazione in beuta. \*APA = azoto prontamente assimilabile

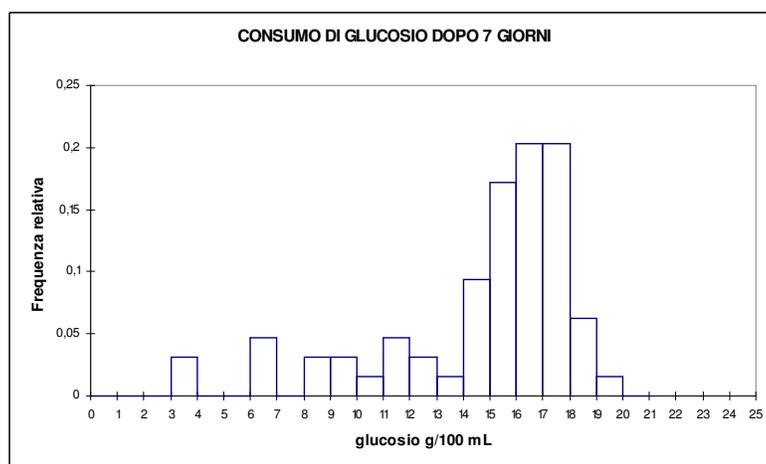
Per quest’analisi, i caratteri presi in considerazione sono stati il vigore fermentativo, valutato sia come consumo di zuccheri (2 gg, 7 gg, fine fermentazione) che come durata della fermentazione, dimensioni della schiuma e velocità di illimpidimento. Anche in questo caso è stato necessario suddividere i valori trovati in classi.

Non è stato possibile utilizzare le medesime suddivisioni operate in mosto sintetico in quanto la cinetica di fermentazione varia molto cambiando le condizioni del mezzo di crescita.

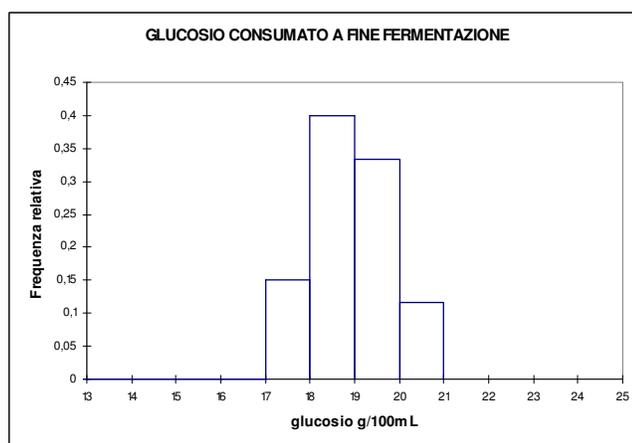
Considerando il consumo di zuccheri a due giorni dall’inizio della fermentazione (Figura 3.3.9 A) si osserva che la maggior parte degli isolati (29,7%) consuma dai 4 ai 5 g/100 mL di zuccheri, il 18,8% mostra invece un consumo inferiore a 1 g/100mL. Il 6,5 % degli isolati consuma dai 6 ai 7 g/100 mL di glucosio mostrando un vigore fermentativo decisamente elevato.



A)



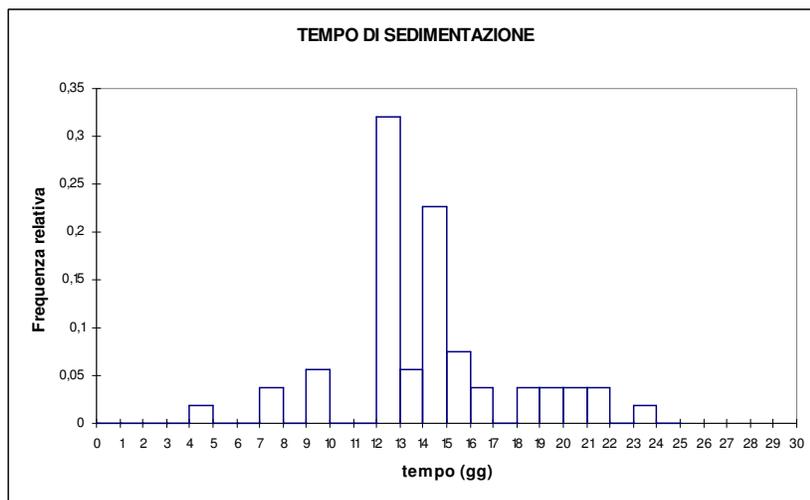
B)



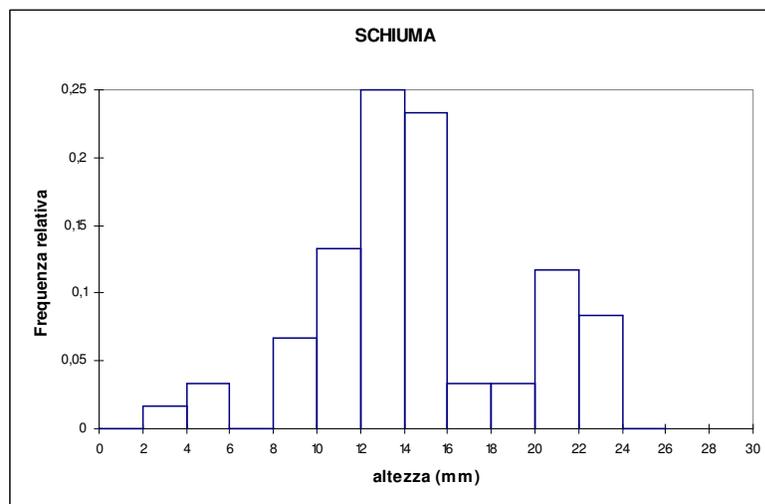
C)

**Fig. 3.3.9** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base alla quantità di glucosio consumato a 2 gg (A), a 7 gg (B) e alla fine della fermentazione (C) in mosto di Prosecco.

Per quanto riguarda il consumo di zuccheri a 7 giorni (Figura X B) e la durata della fermentazione (Figura X C), una percentuale cospicua presenta delle ottime caratteristiche di fermentazione. Questo risultato era prevedibile in quanto il principale criterio di scelta è stato proprio la capacità di trasformare velocemente gli zuccheri. Per quanto riguarda la velocità di illimpidimento, dai risultati si può dedurre che la scelta è caduta su isolati presentanti elevate velocità di sedimentazione (Figura 3.3.10).



**Fig. 3.3.10** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base tempo di sedimentazione dei lieviti durante la fermentazione in mosto di Prosecco.



**Fig. 3.3.11** Distribuzione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in base all'altezza della schiuma prodotta durante la fermentazione in mosto di Prosecco.

Infine considerando la capacità schiumogena, pur confermandosi un carattere estremamente variabile si osserva che una buona parte degli isolati saggiati (48,3%) produce una quantità intermedia di schiuma che va dai 12 ai 16 mm, fattore che può essere particolarmente interessante in fase di rifermentazione.

Nonostante la prova fosse stata condotta in beuta e il vino base prodotto fosse in quantità veramente limitate (200 ml) è stato possibile procedere ad una prova di degustazione. Vista la quantità ridotta di fermentato i 66 vini base ottenuti sono stati sottoposti ad un panel ristretto (8 giudici) di degustatori molto esperti scelti sulla base di indicazioni fornite dal Consorzio di Tutela. E' stato chiesto ai giudici di valutare il vino considerando in primo luogo le caratteristiche di tipicità, inoltre di verificare la presenza di eventuali difetti e di note organolettiche positive. La valutazione è stata riassunta in un giudizio di preferenza che aveva lo scopo di identificare i migliori 9 prodotti. Non essendo stato possibile valutare in modo statistico i risultati della degustazione, visto il numero ridotto di partecipanti, si è proceduto ad un ulteriore confronto tra i giudici una volta ristretto il numero di campioni ad una quindicina. La discussione ha ridotto la cerchia di campioni preferiti al numero richiesto. Le caratteristiche degli isolati scelti ottenute dalla crescita in mosto di Prosecco sono riportate in tab. 3.3.4.

Isolato	Profilo mtDNA	Calo peso g/100 ml			Ferm. (gg)	Schiuma (mm)	Limpidezza (gg)	Sviluppo	Biggy	Esito degustazione
		2 gg	7 gg	Fine ferm.						
<b>P304,1</b>	28	2.6	8.07	9.11	15	15	14	polverulento	MC	+++++
<b>P225,5</b>	11	2.3	8	8.99	16	11	11	polverulento	MC	++++
<b>S41</b>	13	2.35	7.88	9.07	17	14	14	polverulento	MC	++++
<b>S47</b>	4	2.01	6.67	8.99	21	22	>40	polverulento	non cresciuto	++++
<b>B173,16</b>	11	1.87	7.25	9	17	12	11	polverulento	MC	++++
<b>P293,8</b>	31	1.96	7.4	8.98	17	16	>40	polverulento	BG	++++
<b>P301,9</b>	2	3.18	8.27	9.15	15	16	14	polverulento	MC	+++
<b>P254,12</b>	27	3.09	8.75	9.07	14	18	14	polverulento	MC	++
<b>P304,13</b>	14	2.83	7	8.99	18	20	14	floculento	MC	++

**Tab. 3.3.4** Caratteristiche dei ceppi scelti per le prove di microvinificazione.

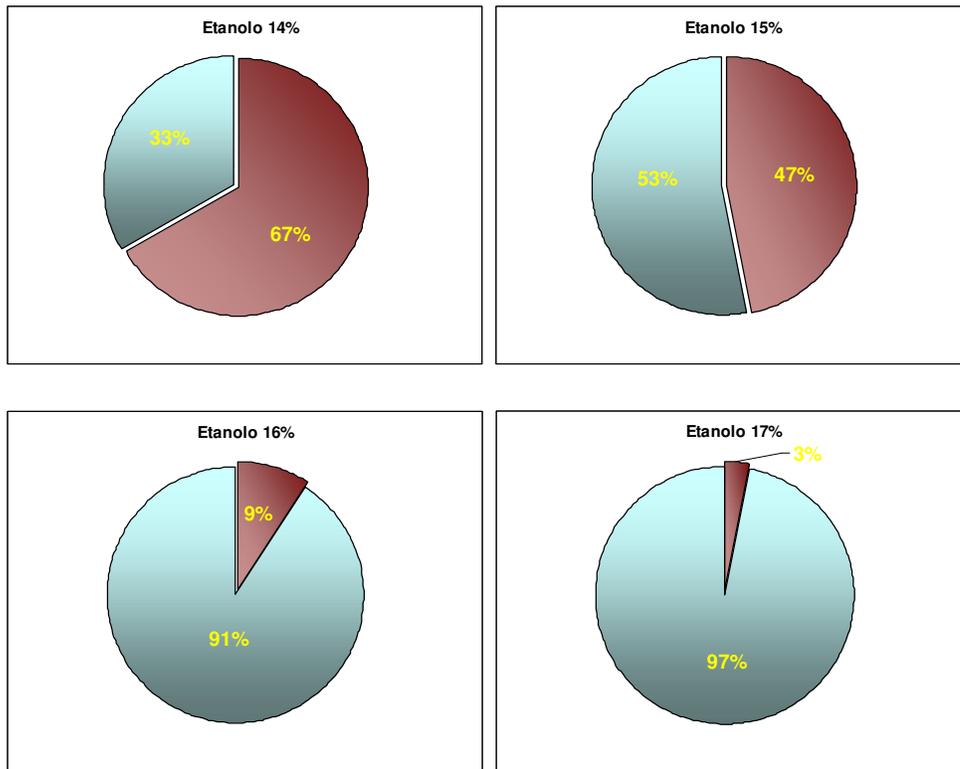
E' interessante notare che la scelta del Panel non si è sempre orientata verso ceppi che hanno dimostrato il maggior vigore fermentativo, come, *S47*, *P304,13* che sono caratterizzati da fermentazioni piuttosto lunghe. Questo risultato mette in evidenza l'importanza della valutazione organolettica nei programmi di selezione.

### **3.3.4 DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA ALL'ETANOLO**

E' stato seguito utilizzando l'inoculo tal quale e un tempo di incubazione di 24 ore. I risultati per ciascun ceppo sono riportati nella tabella 3.3.4 mentre nella fig. 3.3.12 sono raffigurate le frequenze relative gli isolati resistenti, per ogni concentrazione di etanolo saggiata.

**Tab. 3.3.4** Crescita in piastra degli isolati naturali in presenza di concentrazioni crescenti di etanolo. Il segno + indica crescita, il segno – assenza di crescita. A fianco della denominazione di ciascun isolato è riportato il numero relativo al gruppo di appartenenza ottenuto mediante l'analisi del DNA mitocondriale.

Ceppo	profilo	EtOH 0%	EtOH 14%	EtOH 15%	EtOH 16%	EtOH 17%
P301.4	1	+	+	+	-	-
P301.9	2	+	-	-	-	-
P293.1	3	+	+	+	-	-
P.293.8	3	+	+	+	-	-
S.47	4	+	+	-	-	-
B.125.2	5	+	+	-	-	-
B.125.7	5	+	+	+	+	+
P227.12	6	+	-	-	-	-
P227.15	6	+	-	-	-	-
X39.3	6	+	+	+	-	-
X39.10	6	+	+	+	-	-
X39.16	6	+	+	+	-	-
P304.8	6	+	-	-	-	-
P303.3	6	+	+	+	+	-
P303.14	6	+	+	+	-	-
X20.13	6	+	+	+	-	-
X20.16	6	+	-	-	-	-
X22bis.4	6	+	-	-	-	-
X22bis.8	6	+	+	+	-	-
X22bis.12	6	+	+	+	-	-
S.40	6	+	+	-	-	-
P148.1	7	+	+	+	-	-
B.125.9	8	+	+	-	-	-
BIG217.4	9	+	-	-	-	-
B.125.5	10	+	+	+	+	+
X36.1	11	+	-	-	-	-
X36.4	11	+	-	-	-	-
P225.2	11	+	+	-	-	-
P225.5	11	+	+	-	-	-
P.173.1	11	+	+	-	-	-
P.173.3	11	+	+	-	-	-
B.173.1	11	+	+	+	-	-
B.173.16	11	+	-	-	-	-
C261.4	11	+	-	-	-	-
C261.7	11	+	-	-	-	-
P301.12	12	+	-	-	-	-
B169.10	12	+	-	-	-	-
S.41	13	+	+	-	-	-
P304.13	14	+	+	+	+	-
P158.4	15	+	+	+	-	-
P158.8	15	+	+	+	-	-
P304.6	16	+	+	+	+	-
P304.15	17	+	+	+	+	-
P.283.4	18	+	-	-	-	-
P.283.7	18	+	-	-	-	-
P234.12	19	+	+	-	-	-
P304.3	20	+	+	+	-	-
P301.1	21	+	+	+	-	-
P138.1	22	+	+	+	-	-
S.46	23	+	+	-	-	-
P.254.3	24	+	+	+	-	-
P.254.2	25	+	+	-	-	-
P304.2	26	+	+	+	-	-
P.254.12	27	+	+	+	-	-
P304.1	28	+	-	-	-	-
BIG 223.3	29	+	+	+	-	-
BIG 223.4	29	+	+	+	-	-
P304.4	30	+	+	+	-	-
B.125.3	32	+	-	-	-	-
P234.5	33	+	-	-	-	-
P304.11	34	+	-	-	-	-
B.173.4	35	+	+	-	-	-
B.197.1	36	+	+	+	-	-
B.197.4	36	+	+	+	-	-
B.173.2	37	+	-	-	-	-
P219.1	38	+	-	-	-	-



**Fig. 3.3.12** Frequenza degli isolati sensibili (■) e resistenti(■) in relazione alle diverse concentrazioni di etanolo.

E' stato scelto di riportare solamente i risultati relativi alla valutazione di concentrazioni di etanolo superiori al 13%, in quanto prove precedenti hanno dimostrato che gli isolati naturali sono tutti resistenti a concentrazioni inferiori.

Soltanto il 33% degli isolati è sensibile a concentrazioni di etanolo pari a 14%. Questa percentuale è ovviamente destinata a salire a mano a mano che la quantità di sostanza tossica aumenta. Alla due concentrazioni più elevate provate (16 e 17%) solo una piccola parte degli isolati (rispettivamente 9 e 3%) risulta resistente indicando un elevato grado di tolleranza, situazione che non si verifica per il ceppo commerciale utilizzato come controllo (ISMA Premium 444).

Gli isolati B.125.5 e B.125.7 hanno evidenziato il grado di resistenza più elevato, e provengono entrambi dallo stesso grappolo d'uva fermentato anche se geneticamente sono diversi appartenendo rispettivamente al gruppo 5 e 10. Altri 4 isolati sono resistenti a 16 gradi alcolici ma non a 17. Il primo è il ceppo P.303.4 mentre gli altri tre sono stati isolati dal medesimo grappolo fermentato (P.304.6, P.304.13, P304.15), anche se geneticamente appartengono a gruppi diversi

(rispettivamente 16, 14, 17); il ceppo P304.13 è l'isolato utilizzato nelle prove di messa a punto del metodo e ha confermato il comportamento osservato in precedenza.

Tutti questi ceppi sono sicuramente dei buoni candidati ad essere utilizzati in rifermentazione (bottiglia o autoclave), in quanto la caratteristica più desiderata in un ceppo di lievito in questa situazione è sicuramente la capacità di svilupparsi vigorosamente in vini in cui il grado alcolico è superiore a 10.

Questi lieviti potrebbero essere inoltre particolarmente adatti ad essere utilizzati in fermentazioni con mosti ad elevate concentrazioni zuccherine, in cui è necessario ottenere un elevato grado alcolico, come si verifica nella produzione di vini passiti.

Osservando la distribuzione dei livelli di resistenza all'interno di gruppi geneticamente simili (tab. 3.3.4), è interessante notare che spesso (gruppo 5, 6, 11) vi sia un elevato livello di variabilità nel grado di resistenza. Questa situazione è stata osservata anche in precedenza quando sono stati indagati altri caratteri tecnologici quali, tra gli altri, il vigore fermentativo, la produzione di schiuma e la produzione di composti solforati. Questa disomogeneità all'interno del gruppo indica piccole differenze genetiche che i metodi molecolari utilizzati non sono stati in grado di identificare.

### **3.3.5 DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA**

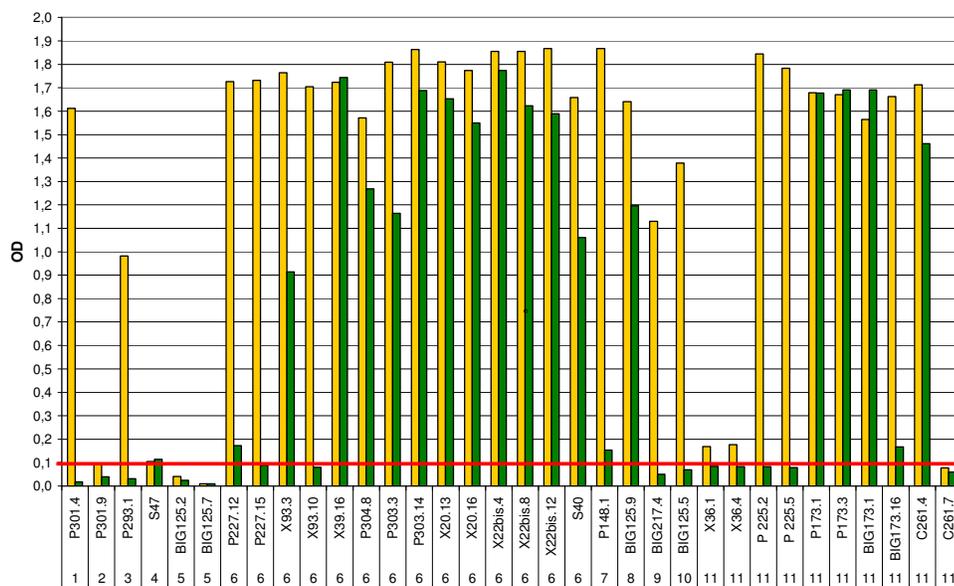
Il diossido di zolfo aggiunto ai mosti in fase prefermentativa svolge diverse azioni (antisettica, antiossidante e antiossidante). L'effetto antisettico consente di eliminare la carica microbica e i lieviti non vinari presenti nell'uva o *apportati* nelle operazioni di raccolta e pigiatura, ma ha come conseguenza il ritardo dell'inizio della fermentazione alcolica da parte dei lieviti vinari. Questo effetto di ritardo unito all'impiego del freddo è ampiamente utilizzato nelle moderne tecnologie enologiche consentendo ad esempio defecazioni statiche dei mosti e macerazioni pellicolari a temperature intorno ai 15 °C. I lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* possiedono sistemi di detossificazione dalla SO<sub>2</sub> più efficienti rispetto ad altre specie lieviti di garantendo quindi periodi di

latenza non troppo prolungati; minore è il tempo di latenza (fase lag) nell'avvio della fermentazione maggiore sarà la resistenza di questi verso la solforosa.

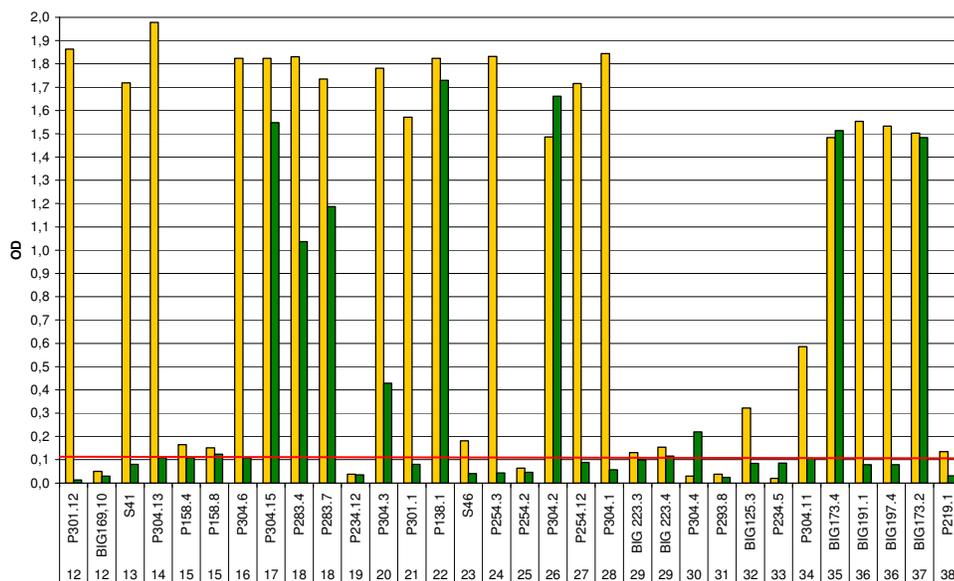
Elevate aggiunte di solforosa possono allungare i tempi di latenza istaurando quindi fermentazioni stentate, che possono condurre ad arresti fermentativi deleteri per la vinificazione. Inoltre dosi elevate di anidride solforosa causano l'insorgere di difetti olfattivi nel vino difficilmente eliminabili ed risvolti negativi per la salute del consumatore.

Con l'utilizzo sempre più diffuso di starter commerciali in dosi massicce, l'impiego della solforosa come antisettico assume sempre minore criticità.

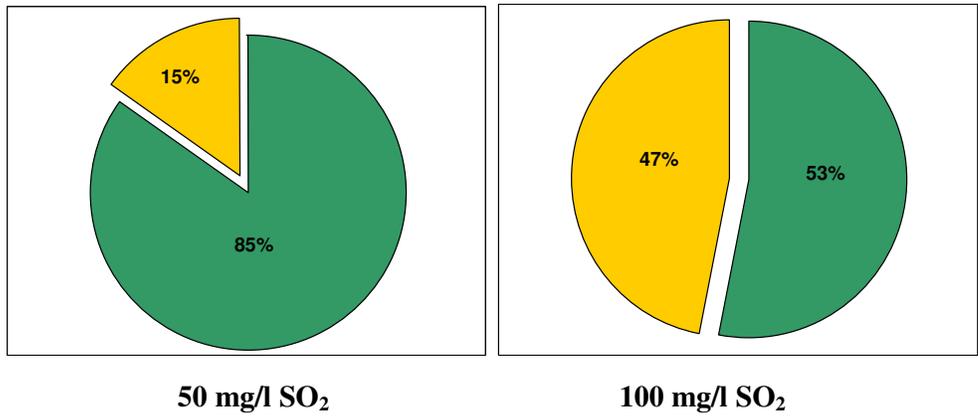
I medesimi 66 lieviti, appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, di cui è stata indagata la capacità di resistere a quantità crescenti di etanolo, sono stati saggiati per verificare la resistenza alla tossicità dell'anidride solforosa. Le colture dei lieviti da piastra sono state inoculate in terreno liquido sintetico e quindi incubate, sotto agitazione per 30 ore a 25 °C, tempo necessario per raggiungere la fase stazionaria. Le pre-colture, previa diluizione con mezzo nutritivo sintetico, sono state utilizzate per inoculare delle cuvette contenenti del mosto sintetico con una quantità di diossido di zolfo pari a 0, 50, 100, 200 mg/l. La crescita è stata osservata a 24 e 48 ore registrando la presenza di torbidità nel mezzo liquido. Le prove sono state condotte utilizzando come mezzo di crescita il mosto sintetico naturale (concentrazione di glucosio del 20%). In fig. 3.3.13 A e 3.3.13 B sono riportati i valori di densità ottica delle colture misurati dopo 48 ore in presenza di anidride solforosa, mentre in fig. 3.3.14 sono riportate le frequenze degli isolati sensibile e resistenti considerando il valore soglia di densità ottica 0,1.



**Fig. 3.3.13 A** Effetto della presenza di 50 (■) e 100 mg/l di SO<sub>2</sub> (■) sulla crescita degli isolati naturali da uva Prosecco.

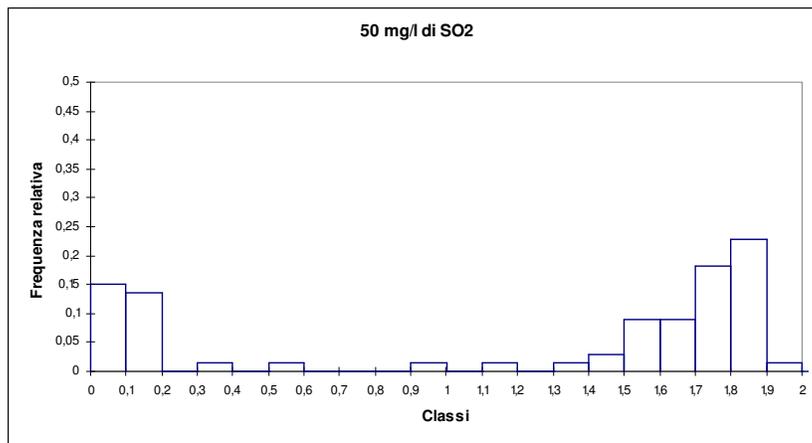


**Fig. 3.3.13 B** Effetto della presenza di 50 (■) e 100 mg/l di SO<sub>2</sub> (■) sulla crescita degli isolati naturali analizzati.

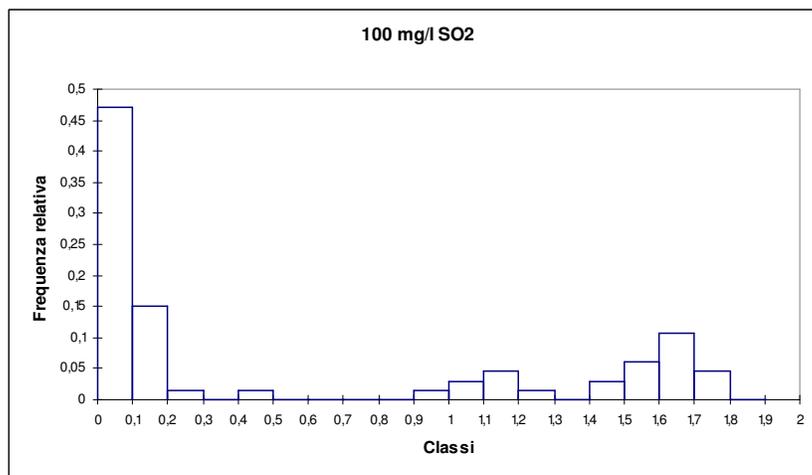


**Fig. 3.3.14** Frequenza degli isolati sensibili (■) e resistenti (■) in relazione alle diverse concentrazioni di SO<sub>2</sub>.

(A)



(B)



**Fig. 3.3.15** Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, dei valori di densità ottica ottenuti per ciascun ceppo cresciuto in presenza di 50 (A) o 100 (B) mg/l di SO<sub>2</sub>.

Considerando i valori ottenuti si osserva che la resistenza a 50 mg/l (corrispondente a uno dei dosaggi più utilizzati in cantina) è molto frequente. Infatti solo il 15% dei ceppi sono risultati sensibili (fig. 3.3.14). Inoltre il 66,3% ha una densità ottica superiore a 1,4, valore comparabile con quanto ottenuto in assenza di SO<sub>2</sub> (fig.3.3.13). Questi ceppi dimostrano una completa insensibilità alla concentrazione saggiata. Passando al dosaggio più elevato si osserva un marcato calo dei ceppi resistenti, solo il 53% riesce ad avviare la crescita in 48 ore (fig. 3.3.14). Soltanto il 24,2 % ora si colloca ad una densità ottica superiore a 1,4 indicando una velocità di sviluppo, ma soprattutto tempi di latenza comparabili, a quelli riscontrati in assenza della sostanza tossica (fig. 3.3.13). E' infine interessante notare che generalmente all'interno di ciascun gruppo genetico i ceppi dimostrano il medesimo comportamento nei confronti dell'SO<sub>2</sub>. Situazione che si verifica anche per i gruppi con maggior numero di componenti. Infatti i ceppi appartenenti al gruppo genetico 6 e 11 per la maggior parte si dimostrano molto tolleranti nei confronti della sostanza tossica. Questo risultato indica di un forte legame tra la radice genetica del ceppo e il fenotipo resistenza all'anidride solforosa.

### **3.3.6 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ B-GLUCOSIDASICA**

I medesimi 66 lieviti, appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, di cui è stata indagata la capacità di resistere a quantità crescenti di etanolo e anidride solforosa, sono stati saggiati per verificare e quantificare l'attività β-glucosidasi.. Alcune classi di aromi varietali (monoterpeni, norispronoidei, derivati benzenici) sono presenti nell'uva principalmente sotto forma glicosidata. Il rapporto tra forme libere, odorose e quelle glicosidate inodore dipende da molti fattori tra cui il vitigno. Le β glucosidasi sono delle specifiche idrolasi che scindono il legame tra l'aglicone (molecola odorosa) e il glucosio. Un lievito con spiccata attività β-glucosidica accresce maggiormente la componente aromatica di natura varietale nel vino favorendone quindi una maggiore tipicità. Per la determinazione è stato utilizzato un saggio che prevede l'uso di un terreno di crescita arricchito di un substrato che contiene un legame β-glucosidico, 4-metilumbelliferil-β-D-glucopiranoside conosciuto con la sigla MUD. L'idrolisi del composto determina la formazione di

glucosio e metilumbelliferone, una sostanza fluorescente in grado di emettere una radiazione blu. La quantità di prodotto di reazione viene determinata grazie ad uno spettrofluorimetro che fornisce la precisa radiazione elettromagnetica di eccitazione del fluoroforo (365 nm) e rivela la quantità di radiazione emessa (450 nm).

Il test sugli isolati naturali è stato condotto crescendo le colture in YPD e utilizzando un'aliquota di queste come inoculo in mosto sintetico pH 3,5. La procedura di crescita in YPD e inoculo è stata standardizzata con lo scopo di aumentare al massimo la riproducibilità del test. La prima coltura nel mezzo di laboratorio è stata incubata per 30 ore a 25°C in modo tale che la densità ottica raggiungesse valori compresi tra 1,6 e 1,7. In questo modo un'inoculo pari a 500 µl in 10 ml di mosto sintetico pH 3,5 permette di ottenere una popolazione di lieviti pari a  $2 \cdot 10^6$  CFU/ml. La standardizzazione dell'inoculo fa sì che la coltura in mosto sintetico si sviluppi a partire da una popolazione a concentrazione uguale per tutti i ceppi analizzati e comparabile con quella che normalmente si utilizza in cantina per condurre la fermentazione alcolica con lieviti selezionati. Il costante numero di cellule dell'inoculo, ottenuto secondo le modalità descritte, consente di limitare notevolmente le eventuali differenze di crescita tra i diversi lieviti.

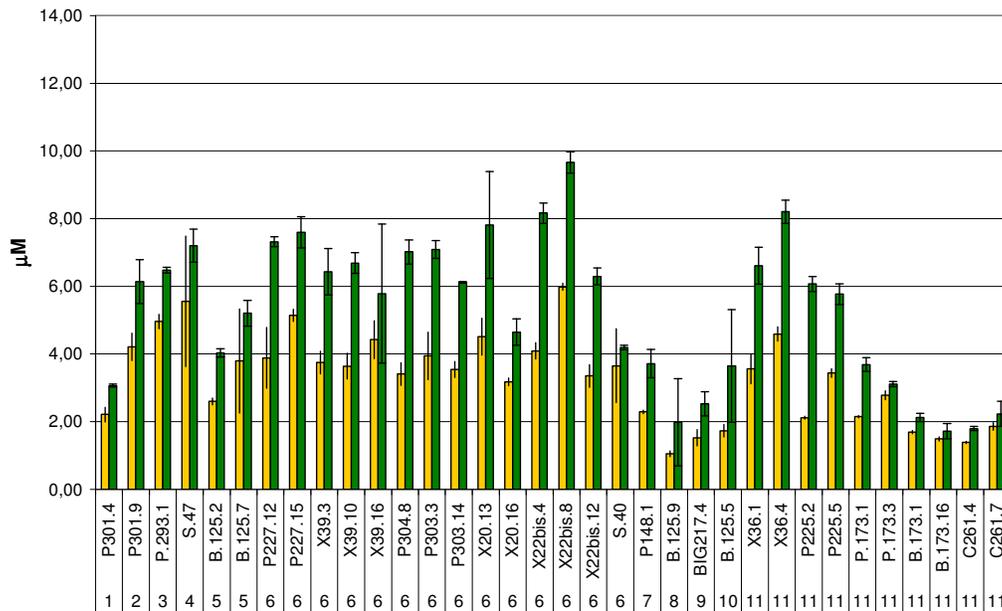
La coltura in mosto sintetico è stata incubata per 24 ore alla fine delle quali la densità ottica è stata misurata di nuovo. Per l'esecuzione del test sono stati utilizzati campioni che avevano raggiunto una densità ottica compresa tra 1,5 e 2 unità. A tali valori infatti la coltura è entrata sicuramente (ma non da troppo tempo) in fase stazionaria e il numero di cellule è di circa  $5 \cdot 10^7$  CFU/ml.

Il volume di coltura considerato per la determinazione dell'attività è stato di 100 µl e la misura eseguita in microtiter da 96 pozzetti. L'attività di ciascun ceppo è stata valutata in triplicato. Per quantificare l'attività è stato necessario utilizzare rette di taratura, costruite misurando i valori di fluorescenza di concentrazioni note e scalari del prodotto di reazione (MU). Dalla medesima coltura in mosto sintetico sono stati condotti due saggi il primo in un buffer di reazione costituito da sodio acetato a pH 5, il secondo in buffer a pH 3,5. In questo modo è stato possibile valutare l'attività enzimatica anche in un ambiente con caratteristiche più vicine a quelle enologiche. I risultati, espressi in µmoli/l di prodotto (MU), sono riportati nelle fig. 3.3.16 A e B. Si rileva chiaramente che l'attività enzimatica è ad un livello notevolmente più alto quando indagata a pH 5

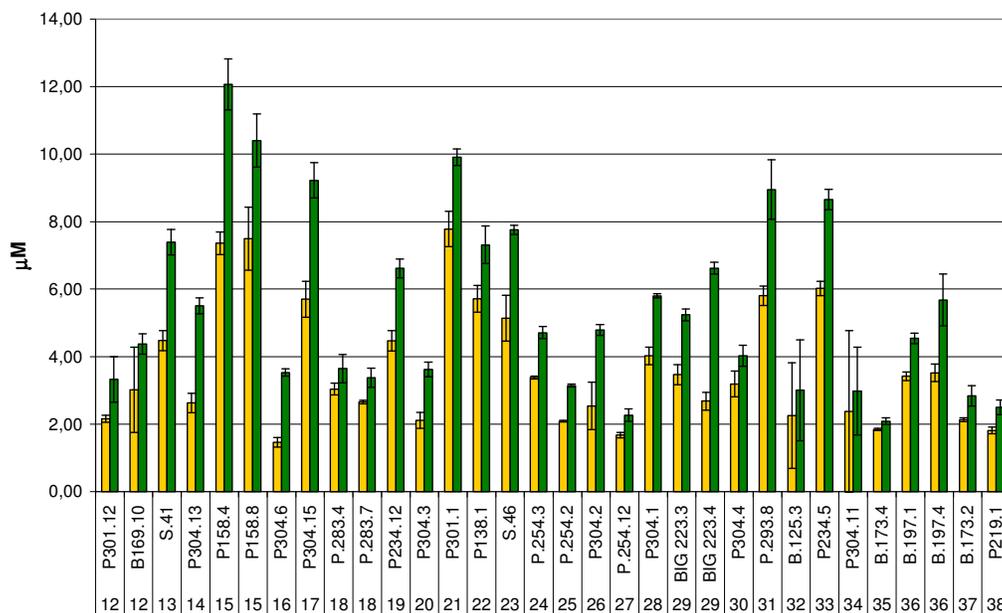
(condizione che è stata ritrovata in quasi tutti gli studi riportati in letteratura) rispetto a quanto ottenuto a pH 3,5.

E' invece interessante notare come il rapporto tra l'attività misurata a pH 5 e quella a pH 3,5 vari notevolmente da ceppo a ceppo. Considerando i valori registrati nella loro globalità, il massimo di attività a pH 5 (12,1  $\mu\text{M}$ ) è stato ottenuto nel campione P.158.54, il minimo (1,7  $\mu\text{M}$ ) è stato osservato nel campione B.173.16, mentre il valore medio è 5,4  $\mu\text{M}$ . A pH 3,5 il valore massimo (7,8  $\mu\text{M}$ ) è stato riscontrato nel ceppo P301.1, il minimo (1,0  $\mu\text{M}$ ) in B.125.9, mentre il valore medio misurato è 3,5  $\mu\text{M}$ . In fig 3.3.17 sono riportate le distribuzioni, calcolate in forma di frequenza relativa, dei valori di attività misurati a pH 5 e a pH 3,5.

E' interessante notare che ad entrambi i pH la classe di maggior frequenza (18% degli isolati a pH 5 e il 29% pH 3,5) è quella che contiene i ceppi che hanno prodotto un'attività compresa tra 3 e 4  $\mu\text{moli/l}$  di MU, anche se nel caso delle determinazioni a pH 5 solo 16,7 % degli isolati mostra un'attività più bassa, mentre a pH 3.5 questa valore sale fino al 41%. Infine osservando i gruppi genetici rappresentati dal numero più elevato di individui (11 e 6) il livello di attività misurato è piuttosto disomogeneo indicando quindi che in questo caso che la similarità genetica individuata non garantisce il medesimo comportamento fenotipico.

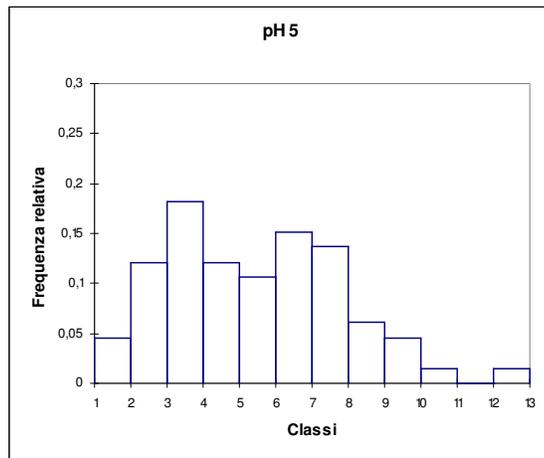


**Fig. 3.3.16 A** Attività  $\beta$ -glucosidasica rilevata nei ceppi naturali di lievito a pH 5 (■) e 3,5(■). Il valore misurato è espresso in  $\mu$ mol/l di MU. In ordinata sotto il nome del ceppo è indicato il gruppo genetico di appartenenza.

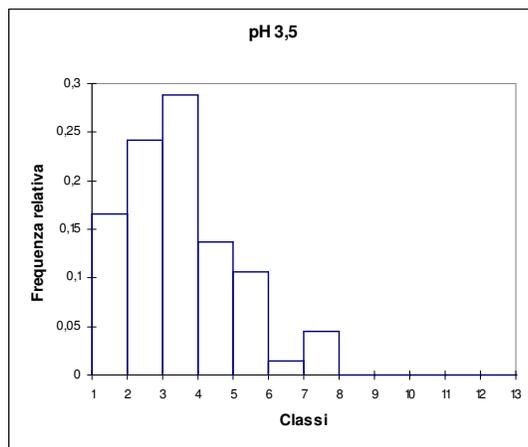


**Fig. 3.3.16 B** Attività  $\beta$ -glucosidasica rilevata nei ceppi naturali di lievito a pH 5 (■) e 3,5(■). Il valore misurato è espresso in  $\mu$ mol/l di MU. In ordinata sotto il nome del ceppo è indicato il gruppo genetico di appartenenza.

A)



B)



**Fig. 3.3.17** Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, dei valori di attività enzimatica ottenuti a pH 5 (A) e pH 3,5 (B). L'intervallo scelto per ciascuna classe è 1  $\mu$ mole/l di MU.

### 3.3.7 MICROVINIFICAZIONI

I 66 ceppi scelti sulla base sei risultati della degustazione condotta sulle prove di crescita in mosto di Prosecco sono stati saggiati in prove di microvinificazione sono state eseguite in collaborazione con Veneto Agricoltura presso la sede di Conegliano. Sono stati utilizzati i 9 ceppi migliori alla degustazione ed un ceppo di controllo, contenuto nel prodotto Premium 444, commercializzato da Vason, tra i più utilizzati nella vinificazione del Prosecco

L'inoculo è stato preparato allo scopo di ottenere una concentrazione iniziale di lieviti di circa  $10^6$  cell/ml allestendo 3l di coltura da inoculare in 30l di mosto le cui caratteristiche chimiche sono riportate in tabella. 3.3.6.

ZUCCHERI (g/l)	pH	ACIDITÀ TOTALE (g/l)	ACIDO MALICO (g/l)	ACIDO TARTARICO (g/l)	APA* (mg/l)
152,7	3,2	6,9	3,2	3,7	206

**Tab. 3.3.6** Caratteristiche chimiche del mosto di Prosecco usato nelle prove di microvinificazione. \*APA = azoto prontamente assimilabile

Tutte le analisi condotte sui mosti, comprese quelle di monitoraggio delle microvinificazioni, sono state eseguite utilizzando lo strumento Wine scan™ (FOSS) presso le strutture della cantina “Masottina S.p.A.” di Conegliano. WineScan è uno spettrofotometro dedicato all'analisi delle matrici liquide ed è utilizzato prevalentemente per l'analisi di vini, mosti, birra e aceti balsamici.

Lo strumento opera nel campo spettrale dell'infrarosso, impiegando come fascio di luce una sorgente IR e come sistema di misura delle lunghezze d'onda un particolare dispositivo ottico-elettronico chiamato interferometro, che sfrutta il principio dell'interferenza delle onde luminose, in grado di misurare le assorbanze alle varie lunghezze d'onda dei singoli componenti della matrice liquida.

Nel caso di analisi di mosti e vini lo strumento è dotato di rispettive curve di calibrazione in grado di interpretare in modo specifico i valori misurati.

Per verificare l'andamento delle fermentazioni i prelievi di mosto sono stati eseguiti ad intervalli di circa 2-3 giorni e sono stati determinati i principali parametri chimici: pH, grado zuccherino, grado alcolico, acidità volatile,

concentrazione di acido malico, acido lattico, acido tartarico, acidità totale, glicerolo. Le microvinificazioni sono state bloccate quando la concentrazione di zuccheri è risultata inferiore a 1g/l, parametro valutato utilizzando anche il metodo ufficiale che si basa sull'analisi enzimatica (EC<sup>TM</sup> Wine Glucose + Fructose Total HL/ML, Diffchamb) presso le strutture di Veneto Agricoltura.

L'andamento della fermentazione alcolica delle singole microvinificazioni è ben descritto dai grafici relativi alla degradazione degli zuccheri (figura 3.3.18 ) e alla produzione d'alcol (figura 3.3.19). Considerando il calo di zuccheri in funzione del tempo e osservando le singole curve si può concludere che pur utilizzando tempi diversi tutti i ceppi sono in grado di esaurire completamente gli zuccheri. La durata della fermentazione varia infatti da un minimo di 6 gg per il ceppo *S41* (stessa durata del ceppo di controllo Premium 444) ad un massimo di 27 gg per il ceppo *S47*. In base alla velocità con cui sono stati esauriti gli zuccheri è possibile distinguere un primo gruppo di 5 ceppi (*S41*, *P225,5*, *P301,9*, *B173,16*, *P304,1*), più vigorosi, in cui i giorni di fermentazione variano da 6 a 10 ed un secondo gruppo, meno vigoroso, di 4 ceppi (*P254,12*, *P293,8*, *P304,13*, *S47*) in cui la fermentazione si protrae molto più a lungo, da 17 a 27 giorni. In realtà se si osserva l'andamento delle curve nella prima fase di fermentazione fino ad un residuo zuccherino di 60 g/l soltanto i ceppi *S47* e *P293,8* risultano più lenti e meno vigorosi, mentre gli altri 7 hanno un andamento del tutto comparabile. I ceppi *P254,12* e *P304,13* rallentano notevolmente successivamente, quando ormai, entrati in fase stazionaria, non sono più in grado di metabolizzare bene lo zucchero.

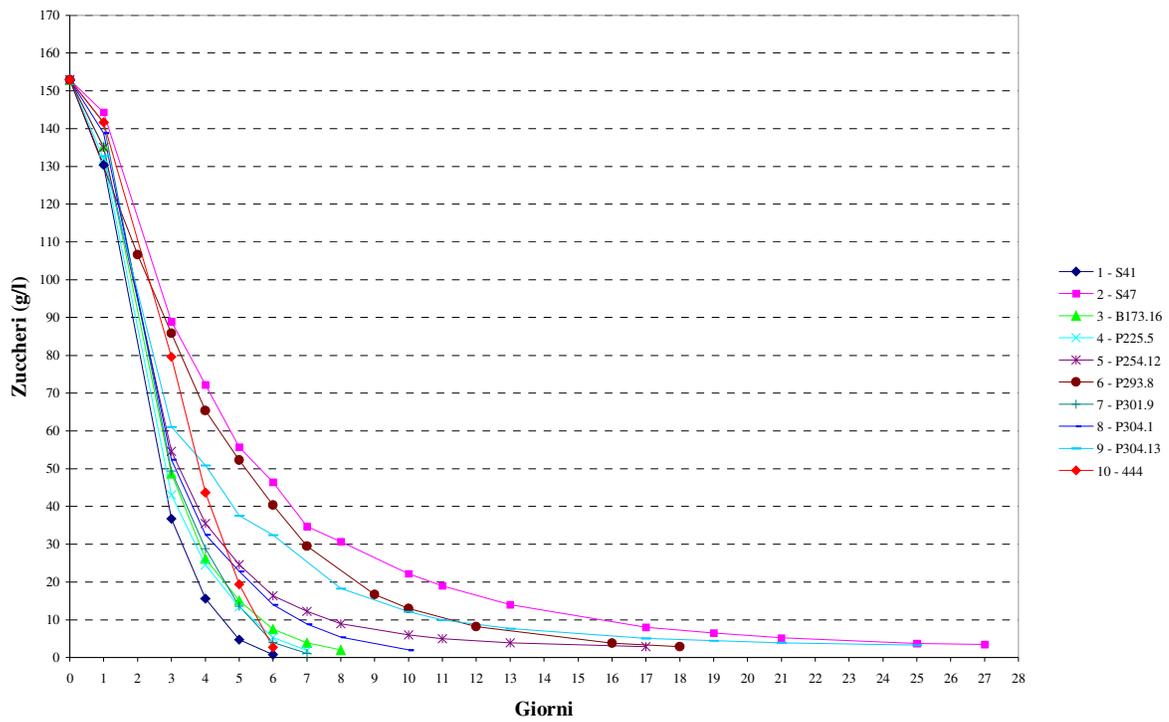
In questa fase subentra la tossicità dell'etanolo che rallenta molto il metabolismo e sembra anche interferire con la crescita degli altri due ceppi meno vigorosi *S47* e *P293,8*. La situazione è confermata dall'andamento del grado alcolico (figura 3.20). I ceppi che si sono dimostrati i più vigorosi anche sotto i 60 g/l di zuccheri residui hanno dimostrato una maggiore resistenza all'alcol ed una resa alcolica migliore.

In tabella 3.3.7 sono riportate le principali caratteristiche chimiche dei vini prodotti nelle microvinificazioni. Tra i parametri che descrivono l'acidità di un vino, acidità totale, pur mantenendosi in uno stretto range di variazione, ha registrato valori che si collocano da un minimo di 6,5 a un massimo di 7,7 g/l.

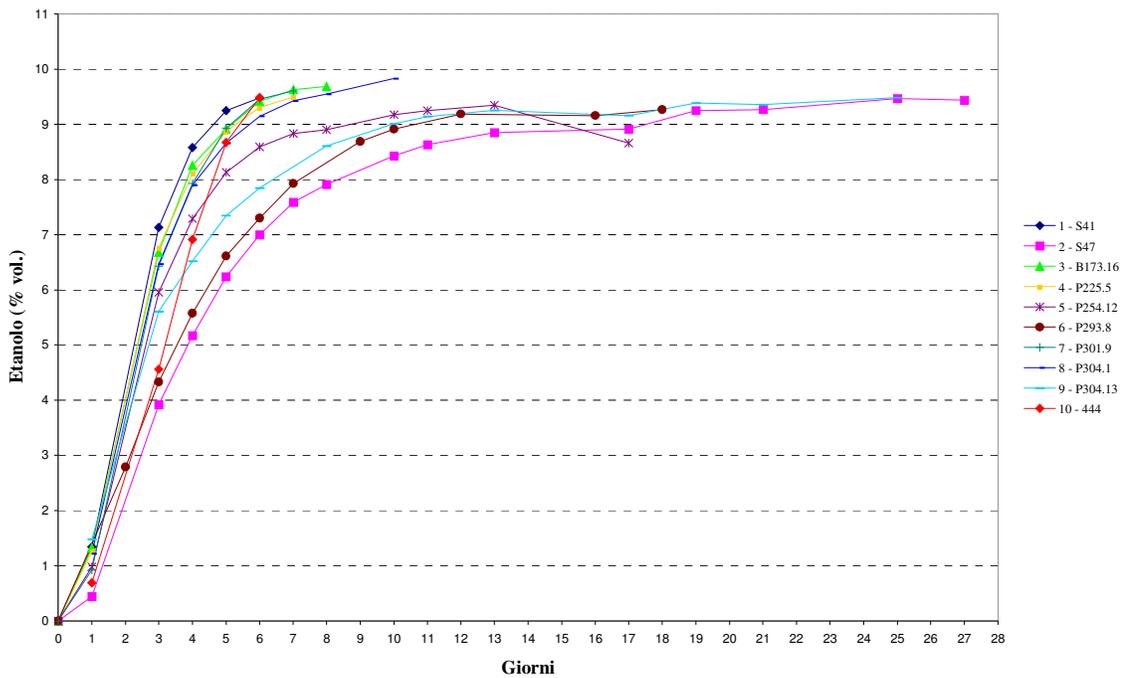
Ceppi	Profilo mtDN A	Giorni di ferm..	Etanolo %	pH	Acidità totale (g/l)	Acido tartarico (g/l)	Acido malico (g/l)	Acidità volatile (g/l)	Glicerolo (g/l)
<b>Pemiun 444</b>	R1	6	9,5	3,2	7,6	3,4	3,0	0,22	4,2
<b>S41</b>	13	6	9,5	3,2	7,3	3,3	2,8	0,16	4,1
<b>P225.5</b>	11	7	9,5	3,2	7,5	3,5	2,9	0,19	4,1
<b>P301.9</b>	2	7	9,6	3,2	7,7	3,4	2,9	0,21	4,3
<b>B173.16</b>	11	8	9,8	3,2	7,4	3,2	2,9	0,17	4,4
<b>P304.1</b>	28	10	9,8	3,2	7,4	3,2	2,9	0,16	4,0
<b>P254.12</b>	27	17	8,7	3,3	6,5	2,9	3,0	0,13	3,2
<b>P293.8</b>	31	18	9,3	3,2	7,7	2,9	3,1	0,16	4,4
<b>P304.13</b>	14	25	9,5	3,3	7,2	3,0	3,3	0,26	3,7
<b>S47</b>	4	27	9,4	3,3	7,0	2,9	3,3	0,18	3,3

**Tab 3.3.7** Caratteristiche dei vini base prodotti con le prove di microvinificazione

Una parte rilevante dell'acidità totale è dovuta alla presenza di acido tartarico e di acido malico. In *S. cerevisiae* gli acidi organici del mosto penetrano nella cellula per lo più per diffusione passiva, alcuni di essi, in particolare l'acido malico possono essere considerati nutrienti, in quanto assimilabili e metabolizzabili; l'acido tartarico, invece, non viene utilizzato dalla cellula. *S. cerevisiae* è in grado di degradare l'acido malico, ma essendo privo di specifici sistemi di trasporto, la metabolizzazione di questo composto è legata alla quantità presente: maggiore è la sua concentrazione esterna, maggiore sarà la quantità consumata. In questo caso l'acido malico ha subito delle piccole variazioni rispetto al valore iniziale del mosto, il suo contenuto è rimasto quasi inalterato nei vini ottenuti con i ceppi più lenti (*P293,8*, *P304,13* e *S47*) ed è diminuito di circa il 12% negli altri vini.



**Fig 3.3.18** Andamento del consumo degli zuccheri durante le prove di microvinificazione.



**Fig. 3.3.19** Andamento del grado alcolico durante le prove di microvinificazione.

Anche l'acidità volatile è compresa nell'acidità totale e pur rappresentandone una piccola parte il suo tenore è strettamente legato alla qualità del vino. Essa è costituita dalle forme libere e salificate degli acidi volatili ed è espressa in g/l di acido acetico. Il carattere sensoriale corrispondente ad una acidità volatile elevata è imputato ad una concentrazione eccessiva soprattutto di acido acetico ed anche di altri acidi carbossilici omologhi. La fermentazione alcolica di un mosto conduce normalmente alla formazione, nel vino corrispondente, a 0,2-0,3 g/l di acidità volatile. E' possibile quindi affermare che i ceppi considerati hanno prodotto modeste quantità di acidità volatile (compresa tra 0,13 e 0,26 g/l), e perciò del tutto accettabili, anche nei casi in cui la fermentazione è stata particolarmente lenta.

In tutti i vini prodotti il pH ha subito delle oscillazioni minime rispetto al valore iniziale del mosto (pH = 3,2). Questo risultato è prevedibile per le caratteristiche chimiche dei mosti. Infatti, vista la presenza notevole di acidi deboli e dei loro sali, mosti e vini sono considerati delle perfette soluzioni tampone ed è per questo che la fermentazione alcolica induce variazioni limitate di pH.

Il glicerolo viene prodotto dai lieviti normalmente all'inizio della fermentazione come risposta alle elevate concentrazioni di zucchero, la via di formazione di questo composto prende il nome di fermentazione gliceropiruvica. E' un composto importante dal punto di vista organolettico perchè conferisce corposità al vino. Dai dati riportati in tab. 3.3.7 è possibile osservare che tutti i ceppi producono un'accettabile quantità di glicerolo e che in generale i ceppi più veloci, cioè quelli che concludono la fermentazione in massimo 10 gg, sono i maggiori produttori (da 4 a 4,4 g/l) eccezion fatta per il ceppo P293,8 che termina la fermentazione in 18 gg e ne produce 4,4 g/l.

## **4. CONCLUSIONI**



In base ai risultati ottenuti è possibile formulare le seguenti considerazioni conclusive.

- Il campionamento in vigneto, condotto in modo capillare, è risultato appropriato alle necessità sperimentali, permettendo di suddividere il territorio di produzione del Prosecco DOC in ben 37 microaree che rappresentano in modo adeguato le diverse caratteristiche pedologiche, ampelografiche e climatiche riscontrate nel territorio.
- Il metodo molecolare, appositamente messo a punto per l'identificazione del gruppo *Saccharomyces sensu stricto*, si è rivelato rapido ed efficace nel discriminare un elevato numero di isolati, condizione richiesta dai programmi di selezione. E' stato possibile anche valutare il grado di sovrastima del metodo tradizionale basato sulla caratterizzazione della morfologia di colonia su terreno WL nella identificazione di questo gruppo microbico.
- L'analisi del DNA mitocondriale, scelta per la caratterizzazione ceppo-specifica dei 308 isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto*, si è dimostrata un valido strumento per descrivere la biodiversità dei lieviti autoctoni raccolti. Sulla base della similarità del profilo elettroforetico è stato possibile raggruppare gli isolati analizzati e individuare le loro relazioni con il territorio. In particolare è stata evidenziata la presenza di due profili che sono diffusi in modo ubiquitario, mentre i rimanenti appaiono specifici per le microaree campionate, indicando la presenza di una forte tipicità territoriale. E' stato inoltre possibile, mediante l'utilizzo della medesima tecnica di caratterizzazione elettroforetica applicata ad una rosa dei più diffusi ceppi commerciali, identificare profili perfettamente sovrapponibili ai due gruppi ubiquitari. In questo modo è stato anche valutato il grado di diffusione sul territorio di ceppi commerciali di provenienza alloctona comunemente utilizzati nella DOC. Questo risultato rafforza ulteriormente l'importanza dell'utilizzo di ceppi autoctoni in questa regione e del relativo progetto di selezione soprattutto in relazione all'effetto che ceppi stranieri possono determinare sulla biodiversità presente nel territorio.

- Le ulteriori indagini molecolari (analisi dei micorsatelliti) condotte su una rappresentanza degli isolati con profili elettroforetici sovrapponibili ad alcuni ceppi commerciali, ha messo in luce i limiti delle indagini basate sull'analisi del DNA mitocondriale. Questo approccio, sicuramente molto valido in quanto analizza la frazione di DNA che per sua natura è più soggetta a mutazioni e quindi meglio evidenzia le piccole differenze associate al ceppo, necessariamente non tiene conto delle caratteristiche del resto del genoma e di eventuali trasferimenti laterali di materiale genico. Mediante analisi dei micorsatelliti è stato possibile identificare all'interno di uno dei due gruppi di isolati con profili ubiquitari alloctoni tre profili di amplificazione diversi. Questi risultati confermano non solo che il relativo ceppo commerciale è stato in grado di insediarsi stabilmente nel territorio, ma permettono di ipotizzare che i diversi profili identificati possano essere frutto di modificazioni genetiche successive di tale ceppo nell'ambiente del rilascio.
- La crescita in mosto sintetico ha permesso una prima caratterizzazione tecnologica degli isolati raccolti, ed ha inaspettatamente evidenziato un'elevata eterogeneità fenotipica fra lieviti dotati dello stesso profilo elettroforetico ottenuto dall'analisi del DNA mitocondriale. Questa fase del progetto è stata particolarmente utile per selezionare gli isolati di maggior interesse.
- La rielaborazione statistica, mediante l'utilizzo dell'analisi canonica discriminante (CDA), ha permesso di mettere in relazioni le caratteristiche genetiche dei 38 ceppi, identificati con il profilo elettroforetico del DNA mitocondriale, con le caratteristiche di fermentazione ottenute crescendo gli isolati in mosto sintetico, valutando anche l'attitudine alla produzione di idrogeno solforato. Considerando l'elevata significatività ottenuta per tutte le variabili analizzate è possibile affermare che questo strumento statistico si è rivelato particolarmente adatto ad interpretare i dati sottoposti all'indagine. La rappresentazione grafica ottenuta ha permesso di valutare il grado di variabilità fenotipica associato ai singoli profili e di identificare in modo immediato i ceppi e gli isolati con le migliori

caratteristiche di fermentazione. In alcuni casi, inoltre, è stato possibile mettere in relazione le similarità genetiche con le attitudini alla fermentazione.

- La successiva crescita in mosto di Prosecco ha permesso di analizzare in modo più puntuale le caratteristiche tecnologiche dei 66 isolati scelti e di operare un'ulteriore selezione sulla base di valutazioni organolettiche.
- L'indagine fenotipica è stata ulteriormente approfondita sottoponendo gli isolati scelti ad una serie di caratterizzazioni fenotipiche con lo scopo di valutare la capacità di resistere a concentrazioni crescenti di etanolo e di anidride solforosa. E' stata inoltre quantificata l'attività  $\beta$ -glucosidasica, importante per la produzione di aromi primari durante il processo di vinificazione. Nel caso delle prime due caratterizzazioni è stata necessaria una approfondita fase messa a punto dei metodi di screening, nella quale sono stati valutati i seguenti parametri: terreni di crescita, volumi di coltura da saggiare, tempi di reazione, dosi della sostanza tossica. Sono state inoltre standardizzate le condizioni di crescita della precoltura e della coltura su cui è stato eseguito il test in modo da svincolare il più possibile il saggio dalla diversa velocità di crescita dei ceppi.

In relazione alla resistenza all'etanolo, il test in piastra utilizzato ha permesso di individuare 5 ceppi particolarmente dotati in grado di resistere alla presenza di etanolo al 16%, 2 dei quali si sviluppano anche a 17° alcolici.

Considerando invece la resistenza all'anidride solforosa, la resistenza a 50 mg/l, corrispondente a uno dei dosaggi più utilizzati in cantina, è stata riscontrata molto frequentemente. Infatti solo il 15% dei ceppi sono risultati sensibili. A concentrazioni più elevate (100mg/l) è stato osservato un marcato calo dei ceppi resistenti, solo il 53% è riuscito ad avviare la crescita in 48 ore e soltanto il 24,2 % ha rivelato una velocità di sviluppo, ma soprattutto tempi di latenza, comparabili a quelli riscontrati in assenza di sostanza tossica.

L'attività  $\beta$ -glucosidasica è stata valutata sui ceppi cresciuti in mosto sintetico a pH 3,5. Aliquote delle colture sono state utilizzate per la quantificazione effettuata sia a pH 5 che a pH 3,5, situazione più vicina

alle condizioni enologiche. Tutti i ceppi saggiati hanno presentato attività ad entrambi i pH. I valori determinati sono sempre stati più elevati a pH 5, mentre il rapporto tra l'attività misurata a pH 5 e quella a pH 3,5 varia notevolmente da ceppo a ceppo.

- Tramite le prove di microvinificazione è stato possibile ottenere informazioni sull'attitudine di crescita dei ceppi con le migliori caratteristiche enologiche in condizioni di cantina.

## **5. BIBLIOGRAFIA**



- Aguilera A, Chavez S, Malagon F (2000) Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast*. **16**: 731-754.
- Baleiras Couto MM, Eijsma B, Hofstra H, Huis In't Velad JHJ, Van Der Vossen JMB (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 41-46.
- Barre P, Vezinhet F, Dequin S, Blondin B (1993) Genetic improvement of wine yeasts. In: Fleet GR (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic, Newark, pp 265-287.
- Bely M, Lagarrigue L, Marullo P, Msneuf-Pomarede D, Lonvaud A (2007a) *Evaluation des propriétés physiologiques et des caractères technologiques de l'espèce Torulaspora Delbrueckii* ŒNO 2007 the 8th International Symposium of Oenology – Bordeaux.
- Bely M., Stoeckle P, Msneuf-Pomarede D, Dubourdieu D, Lonvaud A (2007b) *Impact of mixed culture Torulaspora Delbrueckii - Saccharomyces Cerevisia culture on botrytized must fermentation* ŒNO 2007 the 8th International Symposium of Oenology – Bordeaux
- Bernardini M. (2005) *Valutazione mediante i metodi molecolari dell'andamento di popolazione di lieviti in vinacce destinate alla produzione di grappa*. Tesi di laurea.
- Bosca E, Zapparoli G, Suzzi G, Torrioni S, Dell'aglio F (2004) Selezione di ceppi di *S. cerevisiae* autoctoni per la produzione del vino Bardolino Docg. *Vigne Vini* **10**: 81-85.
- Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1996) Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In *Principles and Practices of Winemaking*, Boulton B, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (eds). Chapman and Hall: New York; 139-172.
- Budroni M. (2001) Metodologie di monitoraggio per le colture starter. *Industrie delle bevande*. **2**: 25-30.
- Budroni M., Giordano G., Pinna G. and Farris GA. (2000) A genetic study of natural flor strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated during biological ageing from Sardinian wines. *J Appl Microbiol.* **89**: 657-62.
- Cai J., Roberts I.N. and Collins M.D. (1996) Phylogenetic relationships among members of the *ascomycetous* yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 542-549.

- Calò A., Costacurta A., Cancellieri S., Crespan M., Milani N., Carraro R., Giust M., Sartori E., Anaclerio, Forti R., Ciprian L., Di Stefano R., Pigelle R., Bottero S. e Gentilini N.(2000) *Delle viti Prosecche*. Edizioni Libra.
- Caridi A, Curari A, Ramondino D (2002) Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *J Gen Appl Microbiol.* 48: 261-267.
- Carrasco P Querol A (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol.* **175**: 450-457.
- Carrau F M.,Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, Versini G, Henschke P. A. (2005) *De novo synthesis of monoterpenes by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts* FEMS Microbiology Letters **243**, 107 –115
- Casaregola S., Nguyen H.V., Lapathitis G., Kotyk A. and Gaillardin C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbio.* **51**: 1607-1618.
- Cavazza A., Grando M.S. e Zini C. (1992) Rilevazione della flora microbica in mosti e vini. *Vignevini* **9**: 17-20.
- Ciani M. e Martini A. (1998) *Selezione di starter vinari autoctoni da varie zone di produzione di vino DOC*. Atti 4° Congresso Nazionale Biodiversità,Alghero. 971-974.
- Ciani M., Maccarelli F., Martini A. e Vettorello G. (1997) Selezione di starter di vinificazione autoctoni della DOC prosecco di Conegliano-Valdobbiadene. *L'Enotecnico.* **33**: 81-88.
- Ciani M., Mannazzu I., Marinangeli P., Clementi F. and Martini A. (2004) Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leuwenhoek.* **85**: 159-164.
- Cocolin L., Bisson L.F. and Millis D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 81-87.
- Cocolin L., Pepe V., Comitini F., Comi G. and Ciani M. (2004) Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res.* **5**: 237-245.
- Combina M., Mercado L., Borgo P., Elia A., Jofre V., Ganga A., Martinez C. and Catania C. (2005) *Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina*, *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1055-1061.

- Cordonnier RE, Gunata Z, Baumes RI, Bayonove CL (1989) Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arômes de nature glucosidique du raisin. *Conn Vigne Vin* **23**; 7-23
- De Barros Lopes M., Bellon J.R., Shirley N.J. and Ganter P.F. (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* **1**: 323-331.
- De Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P.A. and Langridge P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 915-924.
- De Barros Lopes M., Soden A., Martens A.L., Henschke P.A. and Langridge P. (1998) Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 279-286.
- De Barros Lopez M, Soden A, Henschke P, Langridge P (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 4514-4520.
- De Rosa T. (1964) *Tecnica dei vini spumanti*. Stazione Sperimentale di Viticoltura ed Enologia di Conegliano.
- De Rosa T. (1993) *Tecnologia dei vini bianchi*. Ed AEB, Brescia.
- Deak T. (1995) Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 287-292 .
- Delfini C. (1995) *Scienza e tecnica di microbiologia enologica*. Edizioni Il Lievito, Asti.
- Di Stefano e Garcia (1995) Attività idrolitica di preparati enzimatici da foglie e acini di Moscato su glucosidi terpenici. *Riv Vit Enol* **48**; 53-58
- Di Stefano R (1989) Evoluzione dei composti terpenici liberi e glucosidici e degli actinidioli durante la conservazione dei mosti e dei vini in funzione del pH *Riv Vit Enol* **2**:11-13
- Esteve-Zaezoso B., Belloch C., Uruburu F. and Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 329-337.
- Farris GA, Budroni M, Vodret T, Deiana P (1990) Sull'origine dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, delle foglie e degli acini di alcuni vigneti sardi. *L'Enotecnico.* **6**: 99-108.

- Fatichenti F., Farris G.A., Deiana P., Ceccarelli S. and Serra M. (1981) Commercial trial of winemaking using two selected starters of *Saccharomyces cerevisiae* which do not reduce malic acid content. *Am J Enol. Viticult.* **32**: 236-240.
- Fernandez-Espinar M.T., Esteve-Zaezoso B., Querol A. and Barrio E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**: 87-97.
- Fleet GH, Heard GM (1993) Yeasts: growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH Ed) pp 27-55. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**: 11-22.
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B.,(1998), The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 440: 325-331.
- Frezier V, Dubourdieu D (1992) Ecology of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am J Enol Vitic.* **43**: 375-380.
- Fugelsang KC (1996) *Wine microbiology*. Ed Chapman and Hall. New York.
- Gallego FJ, Perez G, Martinez I, Hidalgo P (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture.* **43**: 375-380.
- Gil, J. V.; Manzanares, P.; Genove´s, S.; Valle´s, S.; Gonzalez-Candelas, L. (2005) Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* led to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.*, **103**,57-68.
- Giudici P and Zinnato A (1983) Influenza dell'uso di mutanti nutrizionali sulla produzione di alcoli superiori. *Vignevini* **10**: 63-65.
- Giudici P, Rainieri S, Pulvirenti A, Zambonelli C (2005) Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*

- Giudici P, Rainieri S, Pulvirenti A, Zambonelli C (2006) Strategie di selezione e miglioramento di lieviti di interesse enologico: tradizione e nuovi approcci. *Industrie delle bevande* **2**: 22-30.
- Gomes L.H., Duarte K.M.R., Argueso J.L., Echeverrigaray S. and Tavares F.C.A. (2000) Methods for yeast characterization from industrial products. *Food microbiol.* **17**: 217-223.
- González Techera A., Jubany S., Ccrru F.M. and Gagger C. (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 71-75.
- Green S.R. and Gray P.P. (1950) A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein. Lab. Comm.* **13**: 357-366.
- Guimon J.F., Ingraahm J.L. e Crowell E.A., (1961), The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **95**: 163-168.
- Gunata Z., Bayonaove C.L., Tapiero C. and Cordonnier R.E. (1990) Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -glycosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1232.
- Gunata Z (2002) Flavor enhancement in fruit juice and in beverages in exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparation. In *Whitaker JR (ed) Handbook of food enzymology Marcel Dekker*, New York pp 303-330
- Gunata Z, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier RE (1985). The aroma of grapes. I Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some aroma components. *J Chromatogr.* **331** ;83-90
- Gunata Z, Blondeel C, VallierMJ , Lepoutre JP, Sapis JC, Watanabe N (1998) An endoglycosidase from grape berry skin of cv M. Alexandre, hydrolysing potentially aromatic disaccharide glycosides *J. Agric Food Chem* **46**: 2748-2753.
- Hannequin C, Thierry A, Richard GF, Lecointre G, Nguyen HV, Gaillardin C, Dujoon B (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology.* **39**: 551-559.
- Heard G. (1999) Novel yeast in wine making — looking to the future. *Food Australia* **51**: 347–352.

- Hernandez, L. F.; Espinosa, J. C.; Fernandez-Gonzalez, M.; Briones, A.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. (2003) *Int. J. Food Microbiol.*, **80**, 171-176.
- Hernán-Gómez S., Espinosa J.C. and Ubeda J.F. (2000) Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 45-50.
- Hierro N., González Á., Mas A. and Guillamón J.M. (2004) New PCR-based methods for yeast identification. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 792-801.
- Ingraham JL and Guymon JF (1960) The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**: 157-166.
- James S.A., Collins M.D. and Roberts I.N. (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspore*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 189-194.
- Jiranek V, Langridge P, Henschke PA (1995a) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol.* **61** : 461-467.
- Jiranek V, Langridge P, Henschke PA (1995b) Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am J Enol Vitic.* **46**: 75-83.
- Josepa S., Guillamon J.M. and Cano J. (2000) PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 255-259.
- Kurtzman C.P. and Fell J.W (1998) *The Yeasts - A taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.
- Lambrechts, MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S Afr J Enol Vitic* **21**:97-129.
- Las Heras-Vazquez F.J., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J.M. and Rodriguez-Vico F. (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research.* **3**: 3-9.
- Lavalley F, Salvat Y, Lamy S, Thomas DY, Degre R, Dulau L (1994) PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine strains. *Am J Enol Vitic.* **45**: 86-91.

- Legras JL, Ruh O, Merdinoglu D, Kasrt F (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Food Microbiology*. **102**: 73-83.
- Lieckfeldt E., Meyer W. and Borner T. (1993) Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* **33**: 413-426.
- Lilly M., Lambrechts M.G., Pretorius I.S., (2000), Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavour profiles of wine and distillates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 744-753.
- Lodder JL (1970) *The Yeasts, A Taxonomy study*, 2<sup>nd</sup> edn. Elsevier North-Holland: Amsterdam. 95.
- Longo E, Cansado J, Agrelo D, Villa TG (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am J Enol Vitic.* **42**: 141-144.
- Longo E, Vèzinhet F (1993) Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 322-326.
- Lopez V., Fernandez-Espinar M.T., Barrio E., Ramon D. and Querol A. (2003) A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 63-71.
- Lopez V., Querol A., Ramon D. and Fernandez-Espinar M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **68**: 75-81.
- Lurton I, Snackers G, Roulland C, Galy B, Versavaud A (1995) Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J Sci Food Agric* **67**:485-491
- Manzano M, Cocolin L, Iacimin L, Cantoni C and Comi G (2005) A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol.* **101**: 33-339
- Martini A (1993) The origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res* **4**:165-176
- Martini A (2003) Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res* **4**: 165-176
- Martini A, Frederichi F, Rosini G (1980) A new approach to the study of yeast ecology on natural substrates. *Can. J. Microbiol.* **26**, 856-859.

- Masneuf I., Aigle M. and Dubourdieu D. (1996) Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 239-244.
- Mewes H.W., Albermann K., Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., Pfeiffer F., Zollner A. (1997), Overview of the yeast genome, *Nature*, 387 supp: 7-8.
- Monteil H, Blazy-Mangen F, Michel G (1986) Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Science des Aliments.* **6**: 349-360.
- Morris E.O. and Eddy A.A. (1957) *J. Inst. Brew.* **63**: 34-35.
- Mortimer R. and Polsinelli M. (1999) On the origins on wine yeast. *Res. Microbiol.* **150**: 199-204.
- Nardi T, Carlot M, De Bortoli E, Corich V, Giacomini A (2006) A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. *FEMS microbiology letters* **264**: 168–173
- Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J. and Roberts I.N. (2000a) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1931-1942.
- Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S., Aigle M. and Dubourdieu D. (2000b) Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.* **151**: 683-691.
- Naumov G.I., Nguyen H.V., Naumova E.S., Michel A., Aigle M. and Gaillardin C. (2001) Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **65**: 163-171.
- Naumova E.S., Korshunova I.V., Jespersen L. and Naumov G.I. (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research.* **3**: 177- 184.
- Ness F, Lavallee F, Dubordieu D, Aigle M, Dulau L (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain rection. *J Sci Food Agric.* **62**: 89-94
- Nguyen H.V., Lépingle A. and Gaillardin C. (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* and reveals the

existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 71-85.

- Nikolaou E, Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tzanetakis N (2006) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.* **23**: 205-211.
- Oda Y., Yabuki M., Tomomura K. and Fukunaga M. (1999) Sequence analysis of 18S-28S rRNA spacer region from *Saccharomyces kunashirensis*, *S. martiniae*, *S. rosinii* and *S. Transvaalensis*. *Curr. Microb.* **38**: 61-63.
- Parish ME e Carroll DE (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am J Enol Vitic.* **47**: 435-440.
- Paterna B. (1990) *Trattato di viticoltura italiana*. Edizioni Agricole.
- Perez MA, Gallego FJ, Martnez I, Hidalgo P (2001) Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology.* **33**: 461-466.
- Perez-Coello MS, Perez AIB, Pranzo JFU, Alvarez PJM (1999) Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolate from La Mancha region. *Food microbiol* **16**:563-573
- Pramateftaki P.V., Lanaridis P. and Typas M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level : a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 236-248.
- Pretorius I. S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* **16**: 675-729.
- Pretorius IS, Westhuizen TJ (1991) The impact yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – a review. *S Afr J Enol Vitic* **12**:3-31
- Pronk JT et al (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
- Puig S, Querol A, Barrio E, Perez-Ortin JE (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 2057-2061.

- Querol A. and Ramon D. (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Tech.* **7**: 73-78.
- Rachidi N, Barre P, Blondin B (2000) Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Curr Genet.* **37**: 1-11.
- Rankine B.C., (1967), Formation of higher alcohols by wine yeast, and relation to taste and thresholds, *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 585.
- Rapp A e Mandery H (1986) *Wine Aroma. Experienta* **42**: 873-884.
- Rauhut D. (1993) Yeasts-Production of sulfur compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. pp183-223. Fleet (ed.) Gordon and Breach Science.
- Regodon JA, Perez F, Valdes ME, deMiguel C, Ramirez M (1997) A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* **14**: 247-254.
- Riberau-Gayon P, Dubordieu D, Doneche B, and Lonvaud A (2006) Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. Handbook of Enology, Vol 1, The microbiology of wine and vinifications. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 1-52.
- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Donèche B. and Lonvaud A. (2003) *Trattato di enologia I, Microbiologia del vino, Vinificazioni*. Edizioni Agricole.
- Ribéreau-Gayon P., Dubordieu D., Doneche B., Lonvaud A., (2000), Handbook of Enology Volume 1 *The Microbiology of Wine and Vinification*, John Wiley & Sons Ltd.
- Rorato G. (2002) *Il prosecco di Conegliano-Valdobbiadene*. Morganti editori.
- Rosini G (1982) Influenza della microflora saccaromicetica della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva. *Vigne Vini* **9**: 43-46.
- Rous CV, Snow R, Kunkee RE (1983) Reduction of higher alcohols by fermentation with leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. *J Inst Brew.* **89**: 274-278.
- Rousseau S. and Doneche B. (2001) Effects of water activity ( $a_w$ ) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry. *Vitis.* **40**: 75-78.

- Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, Guillamon JM (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res.* **157**: 267-274.
- Schuller D., Valero E., Dequin S. and Casal M. (2004), Survey of molecular methods for the typing of wine yeasts strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**: 19-26.
- Schwartz D.C. and Cantor C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**: 67-75.
- Sefton M. A., Francis I. L, Williams P. J. (1993) The Volatile Composition of Chardonnay Juices: A study by flavor Precursor Analysis *Am. J. Enol. Vitic .* **44**: 369-371.
- Shuller D, Casal M (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl Microbio Biotechnol.* **68**: 292-304.
- Sniegowski PD, Dombrowski, Fingerman E (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecific. *FEMS Yeast Res.* **1**: 299-306
- Snow R (1983) Genetic improvement of wine yeast. In *Yeast Genetics-Fundamental and Applied Aspects*, Spencer JFT, Spencer DM, Smith ARW (eds). Springer-Verlag: New York; 439-459.
- Techera AG, Jubany S, Carrau FM, Gaggero C (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology.* **33**: 71-75.
- Tomasi D., Flamini R., Calò A., Pol M. e Dalla Vedova A., Costacurta A.(2000) Studio dei precursori di aromi varietali contenuti nel mosto di uva prosecco. *L'Enologo.* **6**: 97-102.
- Török T., Mortimer R.K., Romano P., Suzzi G. and Polsinelli M. (1996) Quest for wine yeast – an old story revisited. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 303-313.
- Ugliano M, Bartowsky , McCarthy J., Moio L., Henschke P. A (2006) hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains, *J. Agric. Food Chem.* **54**: 6322-6331
- Valente P., Gouveia F.C., De Lemos G.A., Pimentel D., Van Elsas J.D., Mendonça-Hagler L.C. and Hagler A.N. (1996) PCR amplification of the

rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**: 253-256.

- Valero E., Shuller D., Cambon B., Casal M. and Dequin S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* **5**: 959-969.
- Vaughan-Martini A and Martini A (1998) *Saccharomyces Meyen ex Reess. The yeasts: a Taxonomy Study* (Lodder J ed) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Vettorello G. (2005) *Il prosecco DOC di Conegliano Valdobbiadene*, Primo rapporto di Distretto.
- Vezinhet F, Dulau L, Hallet JN (1994) Comparaison de différentes méthodes d'identification moléculaire de levures d'intérêt œnologiques. *Rev Fr Oenol.* **115**: 7-11.
- Vincenzini M., Romano P. e Farris G.A. (2005) *Microbiologia del vino*. Edizioni Ambrosiana.
- Wan der Walt JP (1970) *Saccharomyces Meyen emend Reess. The yeasts: a Taxonomy Study* (Lodder J, ed). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990) PCR protocols. A guide to methods and applications. In *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, pp. 315-322. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds) Academic Press, San Diego.
- Wickerham L.J. (1951) *US Dep Agr Tech Bull.* **1029**: 1-19
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. and Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids res.* **18**: 6531.
- Winterhalter P, Skouromounis GK, (1997) *Glyconjugated aroma compound, occurrence, role and biotechnological transformation In Scheper T (ed) Advances in biochemical engineering/biotechnology, Springer, Berlin Heidelberg New York pp 74-105*
- Woehrmann K and Lange P (1980) The polymorphism of esterases in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Inst Brew.* **86**: 174-177.
- Zambonelli C. (2003) *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*. Edizioni Agricole.

- Zambonelli C., Tini V. and Castellari L. (2000), Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia (a cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali) Edagricole.
- Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WPC, Cardayré SB (2002) Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*. **415**: 644-646.
- Zilio F, Lombardi A, De Dea P, Tosi E (2000) Caratterizzazione e selezione di lieviti per il vino Soave DOC *Vigne Vini* 6: 98-104
- Zilio F, Tosi E, Lombardi A, Delfini C (2004) Contributo alla valorizzazione del vino Valpolicella D.O.C. mediante l'isolamento, la caratterizzazione ed il successivo impiego di lieviti specifici. *Vigne Vini* **7/8**: 1-5
- Zilio F., Lombardi A., Galeotto A. e Comi G. (1998) Profili di restrizione del DNA mitocondriale di ceppi di *Saccharomyces* isolati nella zona di produzione del vino Soave D.O.C. *Riv. Vitic. Enol.* **3**: 33-41.
- Castelli T (1954) Les agents de la fermentation vinarie. *Archiv für Mikrobiologie* **20**: 323– 342.
- Ugliano M, Bartowsky E, McCarthy J, Moio L (2006) Hydrolysis and Transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during three *saccharomyces* yeast strains. *J Agric Food Chem.* **17**: 6322-31.
- Riou C, Salmon JM, Vallier MJ, Günata Z, Barre P (1998) Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae* *Appl Environ Microbiol.* **64**: 3607–3614.
- Boido E, Lloret A, Medina K, Carrai F, Della cassa E (2002) Effect of b-glucosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannant wine during the malolactic fermentation. *J Agr Food Chem* **50**: 2344-2349.