



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

DOTTORATO DI RICERCA IN
VITICOLTURA, ENOLOGIA E MARKETING
DELLE IMPRESE VITIVINICOLE
CICLO XXI

SELEZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICRORGANISMI DESTINATI
ALLA PRODUZIONE DI DISTILLATI

Coordinatore : Prof. Giorgio Ponchia

Supervisore : Prof. Alessio Giacomini

Dottorando : Dott.ssa Barbara Bovo

*“Una risposta è il tratto di
strada che ti sei lasciato
alle spalle.
Solo una domanda può
puntare oltre.*

ABSTRACT

Grappa is an alcoholic beverage obtained from the distillation of grape pomace derived from grapes produced exclusively in Italy. The process of production of Grappa starts in the winery where winemaking takes place: after harvesting and grape crushing, the must is separated from grape marcs mainly composed by grape skins and seeds, with or without rasp. In the case of red winemaking, separation of marcs takes place after maceration when fermentation has already started, so that they contain alcohol and a low quantity of sugar. On the contrary, marcs obtained from white winemaking contain sugars not yet fermented. For this reason in this second case the raw vegetable material conferred to the distillery is stored for a variable period to allow alcohol production to occur. Marcs can be conserved in different manners, using silos or smaller containers such as plastic tunnels, for period lasting from few days to several weeks. During this period, the main chemical process is sugar degradation and alcohol production, carried out by yeasts, although a large number of other molecules with positive (aromatic substances) or negative (off-flavours and toxic compounds) effect can rise from the activity of the indigenous microflora. Among the technological supports (pH improvement, temperature control, anaerobic environment) developed by modern distilleries to avoid spoiling of the raw material due to unsuitable storing conditions the management of microbial populations by means of selected yeast introduction is pursued. Concerning the case of grappa, international studies are almost absent, as its production is limited by the legislation to our national territory.

This study is part of a wider project, supported by Regione Veneto, concerning the selection of an yeast to be inoculated in grape marcs destined to the production of grappa. The first objective to be achieved was about the study of the composition and population dynamics of the yeast microflora of grape marcs using conventional and molecular methods present in literature or studied by the Microbiology Unit working at the Department of Agricultural Biotechnology. Two white grape varieties, namely Moscato and Prosecco, from two distinct areas of the Veneto Region, were used. Yeast counts were made at the beginning, after 4 and after 15 days of marc storage under anaerobic conditions. Seventy isolates

from each sampling time were identified to species by RAPD-PCR analysis and subsequent ITS region sequencing. A good biodiversity of yeasts occurred in both marcs at the beginning of fermentation, with high presence of *Hanseniaspora opuntiae*, but without detectable presence of *Saccharomyces* strains, which instead became the dominant yeast after just 4 days of fermentation, remaining at that level until the end of fermentation. Colonization of Moscato marc by *S. cerevisiae* resulted better, in relation to its higher sugar content. Characterization of *S. cerevisiae* isolates by mitochondrial DNA restriction analysis revealed the presence of 66 different strains in the marc from the Moscato grapes, without the occurrence of a clearly dominant strain, while in the marc from the Prosecco grapes only 23 different profiles were scored, with a dominant strain that accounted for 62.7% of the *Saccharomyces* population after 4 days of fermentation.

Subsequently, the effects of refrigeration and acidification treatments of grape pomace on dynamics of yeast populations during the storage period have been studied. A total of 200 isolates were collected from Prosecco grape marcs acidified and non acidified, after 4 and 15 days from the beginning of storage. Identification of enological yeasts belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group was performed by means of a multiplex PCR, and their characterization at strain level was achieved by mitochondrial DNA restriction analysis. Genetic analyses evidenced the development of different microbial strains in the acidified environment and in the non-acidified control. Acidification treatment, applied to inhibit bacterial microflora, disclosed to be able to influence yeast population from a qualitative rather than quantitative point of view. pH decreasing caused a great effect of selection, indeed only 18 out of 121 identified strains were found in both conditions.

A total of 104 isolates identified as belonging to *Saccharomyces cerevisiae* group were chosen from a pool of about 1000 yeasts collected in various experimentations, from marcs of different origin or submitted to technological treatments during the ensilage period. Such isolates were grown in a synthetic must formulation in order to investigate their fermentation performances. Yeast strains isolated from Moscato grape marcs showed the best features in terms of vigour, expressed as sugar consumption after 2 and 7 days of fermentation. The

level of foam production was also investigated and a sensory evaluation was conducted at the end of fermentation, mainly to evaluate possible off-flavour production. Other technological traits such as the level of resistance to the antioxidant sulphur dioxide and the hydrogen sulphide production were tested. Considering SO₂ resistance all isolates are able to tolerate the concentration of 50 mg/l, commonly used in the winery. At the intermediate dose of 100 mg/l the most resistant strains come from non acidified Prosecco marc.

Moreover, it is stated that microbial glycosidase activity contributes to wines and distillates aroma through the hydrolysis of non-volatile flavourless glycoconjugate precursors, which releases free terpenols and other aromatic compounds. Glycosides, composed of a terpenic hydrocarbon (aglycon) and a carbohydrate moiety, are concentrated in grape berries hence contribution of glycosidase activity is determinant for the expression of Grappa aroma. So, from all these isolates β -glucosidase activity was rapidly screened both by using a newly developed fluorimetric method and by growing the cells in a minimal medium containing the disaccharide cellobiose as the only carbon source.

Both the technological and quality traits found for all the isolates were submitted to a statistical analysis in order to detect yeast strains with the best overall characteristics, to be used as starter for distillate production.

Recently the β -glucosidase activity was suggested to be related to the major exo- β -1,3-glucanase *EXG1* of *Saccharomyces cerevisiae*, which is involved in processes like growth, budding and mating. For this reasons the molecular approach based on construction of mutant strains in exoglucanases genes was recently considered. In particular two deletion mutant for *EXG1* and *EXG2* genes respectively has been constructed, following a protocol essentially based on homology recombination. The effect of gene knock-out on β -glucosidase activity was ascertained through fluorimetric assays, showing a little reduction in *exg1* null mutant. Growth in Prosecco must was also performed, in 1L bioreactors, but fermentation curves did not reveal significant differences among strains, showing that probably deletion of exoglucanase genes do not influence yeast growth.

All the showed results indicate that grape marcs of different origins or submitted to different technological treatments are a variable source of yeasts that can be selected to be inoculated as starter for grappa production.

RIASSUNTO

La grappa è una bevanda alcolica ottenuta dalla distillazione di vinacce derivate da uve prodotte esclusivamente in Italia. Il processo produttivo comincia in cantina dove ha luogo la vinificazione: dopo la raccolta e la pigiatura dell'uva, il mosto è separato dalle vinacce, costituite principalmente dalle bucce e dai vinaccioli, con o senza raspi. Le vinacce ottenute dalla vinificazione in bianco contengono zuccheri non ancora fermentati. Per questo motivo il materiale vegetale conferito alla distilleria è conservato per un periodo variabile per consentire lo svolgimento della fermentazione alcolica. Le vinacce possono essere conservate da pochi giorni ad alcune settimane in diversi modi, in silos o in tunnel di plastica. Durante questo periodo, il principale processo chimico che avviene ad opera dei lieviti è la degradazione degli zuccheri con produzione di alcol, anche se un numero elevato di altre molecole con effetti positivi (sostanze aromatiche) e negativi (composti tossici), può originare dalla microflora indigena. Con lo scopo di evitare il deterioramento del materiale vegetale dovuto a inopportune condizioni di stoccaggio, le moderne distillerie hanno introdotto l'uso di alcuni trattamenti tecnologici (miglioramento del pH, controllo della temperatura, assenza di ossigeno), e recentemente ha trovato interesse anche l'impiego di lieviti selezionati per il controllo della popolazione microbica. A questo proposito, studi internazionali nel campo della grappa sono pressochè assenti, essendo la sua produzione limitata per legge al nostro territorio nazionale.

Questo studio si inserisce nell'ambito di un più ampio progetto, finanziato dalla Regione Veneto, di selezione di lieviti da usare come starter da inoculare nella vinaccia destinata alla produzione di grappa. Il primo obiettivo da perseguire era lo studio della composizione e delle dinamiche di popolazione della microflora di lieviti, mediante metodi convenzionali e molecolari presenti in letteratura o studiati dal gruppo di Microbiologia del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie. Sono state scelte due varietà di grappa, Moscato e Prosecco, provenienti da due distinte aree della Regione Veneto. Le conte della popolazione di lieviti sono state effettuate all'inizio, dopo 4 e 15 giorni di stoccaggio in condizioni di anaerobiosi. Una settantina di isolati per ogni campionamento sono stati identificati a livello di specie mediante analisi RAPD-PCR e successivo sequenziamento della regione ITS. All'inizio dello stoccaggio si è osservata una buona biodiversità in entrambe

le vinacce, con un'alta percentuale di *Hanseniaspora opuntiae*, ma assenza di ceppi di *Saccharomyces*, che invece diventano dominanti dopo soli 4 giorni di fermentazione, attestandosi allo stesso livello fino alla fine della fermentazione.

Successivamente sono stati studiati gli effetti dei trattamenti di refrigerazione e acidificazione sulle dinamiche delle popolazioni di lieviti durante lo stoccaggio. Sono stati collezionati un totale di 200 isolati da vinacce di Prosecco acidificate e non acidificate, dopo 4 e 15 giorni di stoccaggio. L'identificazione di ceppi enologici appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* è stata effettuata mediante multiplex PCR, e la loro caratterizzazione a livello di ceppo è stata ottenuta con l'analisi del DNA mitocondriale. Le analisi genetiche hanno evidenziato lo sviluppo di ceppi diversi nell'ambiente acidificato e nel controllo non acidificato. Il trattamento di acidificazione, applicato per inibire la microflora batterica, si è rivelato in grado di influenzare la popolazione di lieviti dal punto di vista qualitativo piuttosto che quantitativo. La diminuzione del pH ha provocato un grosso effetto di selezione, infatti solo 18 dei 121 ceppi identificati sono stati trovati in entrambe le condizioni.

Un totale di 104 isolati identificati come appartenenti al gruppo *Saccharomyces cerevisiae* sono stati scelti da un *pool* di circa 1000 lieviti, collezionati nel corso delle diverse sperimentazioni, da vinacce di diversa origine o sottoposta a trattamenti tecnologici durante il periodo di insilamento. Gli isolati sono stati cresciuti in mosto sintetico per verificare le loro *performance* di fermentazione. I lieviti isolati da vinacce di Moscato mostrano le caratteristiche migliori in termini di vigore fermentativo, espresso come consumo di zucchero dopo 2 e 7 giorni di fermentazione. E' stato indagato anche il livello della produzione di schiuma, e alla fine della fermentazione è stata condotta una valutazione sensoriale per individuare i possibili odori sgradevoli. Sono stati esaminati anche altre caratteristiche tecnologiche, quali la resistenza all'antiossidante e antisettico anidride solforosa e la produzione di idrogeno solforato. Considerando la resistenza alla SO₂ tutti gli isolati sono in grado di tollerare una concentrazione di 50 mg/l, comunemente usata in cantina. Alla dose intermedia di 100 mg/l i ceppi più resistenti provengono da vinacce di Prosecco non acidificate.

Inoltre, è noto che l'attività glicosidasica microbica contribuisce all'aroma di vini e distillati attraverso l'idrolisi di precursori glicoconiugati non volatili e inodori,

che rilasciano terpenoli e altri composti aromatici. I glicosidi, composti di un'idrocarburo terpenico (aglicone) e di un carboidrato, sono concentrati nella buccia, perciò il contributo dell'attività glicosidasica è determinante per l'espressione dell'aroma della grappa. L'attività β -glucosidasica pertanto, è stata rapidamente testata in tutti gli isolati sia utilizzando un metodo fluorimetrico appositamente messo a punto, sia crescendo le cellule in un terreno minimo contenente il disaccaride cellobiosio come sola fonte di carbonio.

I caratteri tecnologici e di qualità monitorati per tutti gli isolati sono stati sottoposti ad analisi statistica con lo scopo di individuare i lieviti con le caratteristiche complessive migliori per essere utilizzati come starter nella produzione di distillati.

Recentemente è stato suggerito che l'attività β -glucosidasica sia correlata alla maggiore β -1,3- glucanasi *EXG1* di *Saccharomyces cerevisiae*, coinvolta in processi come crescita, gemmazione e mating. Per questi motivi è stato preso in considerazione un approccio basato sulla costruzione di mutanti per i geni codificanti per esoglucanasi. In particolare sono stati costruiti due mutanti di delezione per i geni *EXG1* ed *EXG2* rispettivamente, seguendo un protocollo basato essenzialmente sul principio della ricombinazione omologa. L'effetto della delezione sull'attività β -glucosidasica è stato provato con il saggio fluorimetrico, evidenziando una lieve diminuzione nel mutante nullo *exg1*. Inoltre i ceppi mutati sono stati cresciuti in mosto naturale di Prosecco, in fermentatori da 1L, ma le curve di fermentazione non hanno rivelato differenze significative tra i ceppi. E' possibile concludere perciò che probabilmente la delezione dei geni per le esoglucanasi non influenza la crescita dei lieviti.

I risultati ottenuti complessivamente indicano che le vinacce di diversa origine o sottoposte a trattamenti tecnologici rappresentano una fonte ampia di lieviti che possono essere selezionati come starter nel campo della produzione della grappa.

INDICE

1. Introduzione	17
1.1 I DISTILLATI.....	19
1.2 LA GRAPPA.....	20
1.2.1 Le origini.....	20
1.2.2 La grappa e la legge.....	21
1.2.3 Il mercato della grappa e i consumi.....	22
1.2.4 Il processo produttivo.....	23
1.2.4.1 Stabilizzazione.....	25
1.2.5 Tipologie di grappa.....	26
1.2.6 La degustazione.....	27
1.3 LA VINACCIA.....	28
1.3.1 Composizione chimica della vinaccia.....	30
1.3.2 Sistemi di conservazione della vinaccia.....	34
1.4 I LIEVITI.....	36
1.4.1 La cellula di lievito.....	36
1.4.2 La classificazione.....	37
1.4.3 I lieviti presenti nel grappolo.....	37
1.4.4 Il gruppo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	41
1.4.5 Il metabolismo energetico dei lieviti.....	44
1.4.5.1 Il metabolismo degli zuccheri.....	44
1.4.5.2 Il metabolismo dell'azoto.....	47
1.4.5.3 Il metabolismo lipidico.....	48
2. Caratterizzazione della microflora naturale di lieviti isolati da vinaccia	51
2.1 INTRODUZIONE.....	53
2.1.1 CARATTERIZZAZIONE E IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E CEPPI DI LIEVITO ENOLOGICI.....	54
2.1.1.1 Metodi molecolari.....	54
2.2 MATERIALI E METODI.....	59
2.2.1 CEPPI DI LIEVITO.....	59
2.2.1.1 Ceppi di collezione.....	59
2.2.1.2 Isolati da vinaccia.....	59
2.2.2 MEZZI COLTURALI E CONDIZIONI DI CRESCITA.....	60
2.2.2.1 Mezzo di isolamento.....	60
2.2.2.2 Mezzi di propagazione ordinaria.....	60
2.2.2.3 Soluzioni.....	60
2.2.2.4 Condizioni di crescita.....	60
2.2.3 CAMPIONAMENTO E ISOLAMENTO DI LIEVITI DA VINACCIA.....	61
2.2.3.1 Campionamento.....	61
2.2.3.2 Isolamento.....	61
2.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE.....	61
2.2.5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'AMPLIFICAZIONE.....	62
2.2.6 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI.....	62
2.2.6.1 Amplificazione mediante analisi RAPD.....	63
2.2.6.2 Condizioni di amplificazione della regione ITS1-5,8S-ITS2 del rDNA.....	63
2.2.6.2 Condizioni di amplificazione della regione codificante l'actina.....	64
2.2.7 RESTRIZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE.....	65
2.2.8 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO.....	65
2.2.9 SEQUENZIAMENTO DI DNA.....	65
2.2.10 PROGRAMMI PER L'ANALISI DEL DNA.....	66
2.3 RISULTATI.....	67
2.3.1 ISOLAMENTO DEI LIEVITI E CONTA MICROBICA.....	67
2.3.2 IDENTIFICAZIONE SPECIE-SPECIFICA DELLA POPOLAZIONE DI LIEVITI.....	69
2.3.3 CARATTERIZZAZIONE CEPPO-SPECIFICA DEI <i>S. sensu stricto</i> : ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE.....	74
3. Effetti di trattamenti tecnologici sull'evoluzione della popolazione di lieviti durante lo stoccaggio delle vinacce	81
3.1 INTRODUZIONE.....	83

3.1.1 MODIFICAZIONI CHIMICHE DELLA VINACCIA DURANTE LO STOCCAGGIO	83
3.1.2 TRATTAMENTI TECNOLOGICI PER LA CONSERVAZIONE DELLA VINACCIA	85
3.2.1 CEPPI DI LIEVITO	89
3.2.2 MEZZI COLTURALI E CONDIZIONI DI CRESCITA	89
3.2.3 CAMPIONAMENTO E ISOLAMENTO DI LIEVITI DA VINACCIA	90
3.2.3.1 Campionamento	90
3.2.3.2 Isolamento	90
3.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE	91
3.2.5 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI	91
3.2.5.1 Identificazione di <i>Saccharomyces sensu stricto</i> (Multiplex PCR)	91
3.2.6 RESTRIZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE	92
3.2.7 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO	92
3.3 RISULTATI	95
3.3.1 ALLESTIMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE E RACCOLTA DEI LIEVITI DA CARATTERIZZARE	95
3.3.2 ISOLAMENTO DEI LIEVITI E CONTA MICROBICA	96
3.3.3 IDENTIFICAZIONE DEI LIEVITI APPARTENENTI AL GRUPPO <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	97
3.3.4 CARATTERIZZAZIONE CEPPO-SPECIFICA DEGLI ISOLATI APPARTENENTI AL GRUPPO <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	99
3.3.3.1 Vinaccia acidificata	101
3.3.3.2 Vinaccia non acidificata	107
4. Caratteristiche tecnologiche e di qualità di <i>Saccharomyces</i> tecnologici isolati da vinaccia	115
4.1 INTRODUZIONE	117
4.1.1 CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEI LIEVITI	118
4.1.2 CARATTERISTICHE DI QUALITÀ	120
4.1.2.1 Gli alcoli superiori	121
4.1.2.2 Gli esteri	122
4.1.2.3 I composti solforati	123
4.1.2.4. Gli aromi primari o varietali	123
4.1.3 INFLUENZA DEI LIEVITI NELLA PRODUZIONE DI AROMI PRIMARI: GLI ENZIMI B-GLUCOSIDASICI	126
4.1.3.1 Caratteristiche dell'enzima microbico	126
4.1.3.2 Metodi di caratterizzazione dell'attività β -glucosidasica	127
4.2 MATERIALI E METODI	129
4.2.1 CEPPI DI LIEVITO	129
4.2.2 MEZZI COLTURALI	129
4.2.2.1 Mezzi di propagazione ordinaria	129
4.2.2.2 Mezzi per la determinazione dei caratteri fenotipici dei lieviti	130
4.2.3 PROVE DI FERMENTAZIONE IN MOSTO SINTETICO	131
4.2.3.1 Preparazione dell'inoculo	131
4.2.3.2 Monitoraggio del calo in peso delle beute	131
4.2.3.3 Valutazione del potere schiumogeno	132
4.2.4 PRODUZIONE DI IDROGENO SOLFORATO	132
4.2.5 TEST DI RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA	132
4.2.5.1 Preparazione della brodocoltura	132
4.2.5.2 Allestimento del test	132
4.2.6 CRESCITA SU CELLOBIOSIO	133
4.2.6.1 Ceppi di lievito	133
4.2.6.2 Allestimento del test	133
4.2.7 TEST IN FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ β -GLUCOSIDASICA	133
4.2.7.1 Ceppi di lievito	133
4.2.7.2 Condizioni di crescita dei ceppi di lievito	134
4.2.7.3 Test in piastra	134
4.2.7.4 Inoculo per il test in liquido	134
4.2.7.5 Preparazione delle soluzioni	135

4.2.7.6 Test in microtiter	136
4.2.7.7 Retta di taratura	136
4.2.8 ANALISI FATTORIALE DISCRIMINANTE	137
4.3 RISULTATI	139
4.3.1 SCELTA DEI LIEVITI	139
4.3.2 CRESCITA IN MOSTO SINTETICO	139
4.3.3 PRODUZIONE DI IDROGENO SOLFORATO	159
4.3.4 RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA	161
4.3.5 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA MEDIANTE CRESCITA SU CELLOBIOSIO	166
4.3.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA MEDIANTE TEST IN FLUORESCENZA	169
4.3.6.1 Test in piastra	170
4.3.6.1 Test in liquido	174
4.3.6.2 Standardizzazione dell'inoculo in mosto sintetico	178
4.3.6.3 Screening dell'attività dei ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolati da vinacce	179
4.3.7 ANALISI FATTORIALE DISCRIMINANTE	187
5. Costruzione di mutanti di delezione per geni codificanti per esoglucanasi coinvolte nell'attività β-glucosidasiaca	193
5.1 INTRODUZIONE	195
5.1.1 IL RUOLO DELLE ESUGLUCANASI NELLA PRODUZIONE DI AROMI PRIMARI	195
5.1.1.2 Le esoglucanasi Exg1p ed Exg2p di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	196
5.1.2 METODI DI TRASFORMAZIONE E DELEZIONE	197
5.2 MATERIALI E METODI	200
5.2.1 CEPPI DI LIEVITO	200
5.2.2 PLASMIDI	200
5.2.3 MEZZI E SOLUZIONI	200
5.2.3.1 Mezzi di propagazione ordinaria e mezzi minimi	200
5.2.3.2 Soluzioni	201
5.2.3.3 Condizioni di crescita	201
5.2.4 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO SU LARGA SCALA DA <i>E. Coli</i>	202
5.2.5 TRASFORMAZIONE DI LIEVITI	203
5.2.6 ELIMINAZIONE DEL MARCATORE DI SELEZIONE INTEGRATO NEL GENOMA	204
5.2.7 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI	204
5.2.8 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO	207
5.2.9 TEST PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA	207
5.2.10 FERMENTAZIONI	208
5.3 RISULTATI	211
5.3.1 SCELTA DEI LIEVITI	211
5.3.2 DELEZIONE GENICA MEDIANTE IL METODO "SHORT FLANKING HOMOLOGY"	211
5.3.3 COSTRUZIONE DELLE CASSETTE DI DELEZIONE	212
5.3.4 VERIFICA DELL'ELIMINAZIONE DEL GENE	213
5.3.5 ELIMINAZIONE DEL MARCATORE DI DELEZIONE INTEGRATO NEL GENOMA	215
5.3.6 TRASFOMAZIONI SUCCESSIVE PER LA DELEZIONE COMPLETA DEL GENE	217
5.3.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA	220
5.3.7 FERMENTAZIONE IN MOSTO NATURALE	222
6. Conclusioni	227
7. Bibliografia	237

1.Introduzione

1.1 I DISTILLATI

Un distillato, o "acquavite" (dal latino aqua vitae, cioè "acqua della vita"), è una bevanda spiritosa contenente etanolo prodotto attraverso la distillazione di fermentati di sostanze zuccherine o saccarificate, in modo che mantenga i principi aromatici delle sostanze fermentate.

Numerose qualità di acqueviti sono prodotte nel mondo, e possono essere divise in due gruppi: i distillati ottenuti dai frutti, tra i quali la Grappa (la più diffusa in Italia) e il Brandy (distillato di vino), e quelli derivati dalla fermentazione di cereali e altri vegetali, Whisky, Vodka, Rum (dalla canna da zucchero), Gin (essenzialmente dal ginepro). Nella preparazione delle acqueviti di frutta è consentita l'aggiunta del frutto intero dalla cui distillazione è stata ottenuta la bevanda. E' caratteristica comune a tutti i distillati di frutta un contenuto in alcol metilico, pur nei limiti massimi consentiti dalla legge, superiore a quello dei prodotti del secondo gruppo, essendo tale composto derivante dall'idrolisi delle pectine, maggiormente rappresentato nella parte solida della frutta. Il confronto tra Brandy e Grappa mette in risalto il maggior contenuto di quest'ultima in termini appunto di alcol metilico e di alcoli superiori; il Brandy inoltre non è mai incolore in quanto lo attinge dalla permanenza in botti di rovere.

In generale la Grappa ha un contenuto in impurezze, sia quantitativamente che come numero di componenti, nettamente maggiore rispetto a tutti questi distillati, tanto più se il prodotto viene invecchiato in fusti di legno (De Rosa T. e Castagner R., 1994).

Alcuni paesi del Mediterraneo producono bevande alcoliche tradizionali a partire da diversi materiali grezzi (Christopoulou M. *et al.*, 2005). Molto popolari sono i liquori ottenuti dalla fermentazione di vinacce, quali i greci Tsipouro e Tsikoudia, i portoghesi Bagaceiras e Aguardiente, lo spagnolo Orujo, la francese Eau-de vie de marc. Gli standard legali Europei per la quantità di composti volatili dannosi quali metanolo e acetaldeide consentiti nelle bevande sono piuttosto restrittivi. Negli ultimi anni le esportazioni di queste bevande spiritose sono state ostacolate da severi standard di qualità alimentare imposti nella maggiorparte dei paesi Europei (EC, 1989, Regolamento n° 1576/89). A livello extraeuropeo non esiste alcun regolamento che salvaguardi le origini della grappa, perciò in alcuni mercati extraeuropei si possono trovare in commercio distillati denominati grappa, prodotti negli Stati Uniti oppure in Sud Africa, paese che per diversi anni è stato

in conflitto con l'Unione Europea fino a quando ha accettato alla rinuncia dell'utilizzo del termine grappa per i suoi distillati di vinaccia (Koch K. 2008).

1.2 LA GRAPPA

1.2.1 Le origini

L'origine di questo distillato non ha una collocazione ben precisa nei secoli così pure l'etimologia del nome, ma quasi certamente è nato nelle regioni settentrionali italiane. La distillazione in genere ha verosimilmente avuto inizio tra l'VIII ed il VI secolo a.C. in Mesopotamia, mentre quella applicata soprattutto al vino per ottenerne acquavite risulta citata dagli alchimisti solo dal XII secolo d.C. in avanti. D'Agostino *et al.*, 2001, sostengono la probabile origine siciliana dell'acquavite di vino come conseguenza della conquista araba dell'isola dalla seconda metà del secolo VIII. In "*De distillazione*" G.Battista Della Porta (1608) riferisce che gli alchimisti arabi inventarono il serpentino refrigerante ed i termini alambicco ed alcool.

Lo storico Luigi Papo fa risalire la prima produzione in Friuli nel 511 d.C. ad opera dei Burgundi che dalla vicina Austria fecero una fugace apparizione a Cividale, applicando le loro tecniche della distillazione delle mele, con le vinacce, ottenendo un prodotto chiamato "krappa".

La grappa, in quanto acquavite, è stata concepita nell'ambito degli studi della Scuola Salernitana che, intorno all'anno Mille, codificò le regole della concentrazione dell'alcol attraverso la distillazione e ne prescrisse l'impiego per svariate patologie umane. Le vinacce, materia prima alcoligena povera (rispetto al vino, ad esempio, contengono i due terzi di alcol in meno), ma molto diffusa, furono immediatamente prese in considerazione e, della loro acquavite, si parlò già nel Medio Evo. Il primo trattato sull'ottenimento dell'acquavite fu pubblicato dal medico padovano Michele Savonarola, il quale nel testo "*De arte confectionis aquae vitae*" descrive tre tipi di acquavite in uso nel XV secolo in Italia: l'acquavite semplice, l'acquavite comune e la quintessenza.

Nel 1443 si possono trovare le prime citazioni alla grappa in Piemonte rinvenute in documenti del dazio. In passato non si chiamava ancora grappa, bensì dialettalmente branda, il termine grappa è entrato nell'uso corrente solo nel secolo

scorso, ma sicuramente le citazioni di cui sopra consentono di collocare il Piemonte tra le più antiche regioni produttrici di acquavite di bandiera.

Le prime testimonianze dello studio sulla distillazione delle vinacce risalgono però al 1600 e sono dovute ai Gesuiti, tra i quali va ricordato il bresciano Francesco Terzi Lana. Nel XVII secolo sorse a Venezia la "Corporazione degli Acquavitieri" , il che denota il diffuso uso di tale prodotto nel Nord-Ovest del nostro Paese. Fino agli inizi del XIX secolo non vi è però una distinzione tecnologica netta tra i distillati alcolici, poi l'Italia della grappa scelse una propria strada che portò alla creazione di una bevanda con caratteristiche uniche e irripetibili.

1.2.2 La grappa e la legge

Secondo quanto riportato nel Regolamento CEE n. 1576/89 del 29 maggio 1989 si definiva con il termine “grappa”, l’acquavite di vinaccia (un sottoprodotto del processo di vinificazione) ottenuta da materie prime ricavate da uve prodotte e vinificate in Italia.

Il Decreto del Presidente della Repubblica n. 237 del 1997 ha poi stabilito nei particolari le norme di produzione e di designazione: La distillazione deve essere effettuata in impianti ubicati sul territorio nazionale, direttamente mediante vapore acqueo o dopo aggiunta, nell’alambicco, di vinacce fermentate o semifermentate. Le acquaviti risultanti dal processo di distillazione e di eventuali distillazioni di affinamento, per poter essere immesse al consumo, devono avere un titolo alcolometrico non inferiore al 37,5% in volume nè superiore all’ 86%. Il tenore in sostanze volatili (ossia quelle diverse dall’acqua e dagli alcoli etilico e metilico) non deve essere inferiore a 140 mg/100ml di alcol puro e la quantità di alcol metilico non superiore a 1 g/100ml di alcol puro (Da Porto *et al.* 2006).

Nella preparazione della grappa è consentito l’impiego di fecce naturali di vino, che sedimentano nel fondo delle cisterne dopo il travaso, in quantità non superiore al 35% del contenuto finale in etanolo della bevanda e il 25% in peso sulla materia prima (Da Porto, 2002). Sono ricche di frammenti di tessuti vegetali, lieviti, batteri, ed etere enantico che conferisce un sapore vinoso. E’ consentita l’aggiunta di zuccheri (con un massimo di 20 g/l) e di caramello, solo per la grappa sottoposta ad invecchiamento di almeno 12 mesi.

n

1.2.3 Il mercato della grappa e i consumi

Nonostante il mercato italiano rappresenti l'83% (in ettanidri riferiti all'anno 2006) del mercato globale la grappa non è più un prodotto che interessa solamente il panorama nazionale, ma ha iniziato ad essere conosciuta ed apprezzata in diverse parti del mondo. Il mercato più importante è quello tedesco, seguono Stati Uniti, Belgio, Olanda e Regno Unito, ma si tratta comunque di cifre minime se confrontate con quelle di altri distillati.

La tabella 1.1 riporta la produzione totale italiana di grappa e acquaviti dal 1999 al 2006. Come si può notare la produzione delle grappe negli ultimi anni è in aumento quasi continuo rispetto quella di altri distillati derivati da una matrice di frutta e può vantare una crescita del 42,7% (Koch K. 2008, AssoDistil, 2006). La produzione di acquaviti di vino varia da anno ad anno in quanto è il risultato delle distillazioni di vino in eccesso, e quindi la sua produzione non è strettamente legata alla domanda di mercato. L'acquavite d'uva invece mostra una forte crescita nel periodo tra il 1999 e il 2003 per poi scendere di nuovo.

TIPOLOGIA	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Grappe	82.000	99.000	96.000	100.000	112.000	125.000	125.000	117.000
Acquaviti di vino	207.000	100.000	150.000	100.000	75.000	140.000	175.000	198.000
Acquaviti d'uva	1.500	3.400	5.000	6.000	6.400	5.800	4.000	4.300
Acquaviti di frutta	12.800	10.400	10.000	10.000	9.600	9.200	9.000	8.700
TOTALE	303.300	212.800	261.000	216.000	203.000	280.000	313.000	328.000

Tab 1.1 Produzione italiana di grappe e acquaviti (in ettanidri, corrispondenti a 100 litri di alcol anidro o 100° alcolici) (Fonte: AssoDistil, 1999-2006).

Pur essendo quello della distillazione della grappa un settore soggetto a controlli severi da parte del Ministero delle Finanze, non esistono statistiche precise riguardo il numero di aziende produttrici di grappa in quanto il mondo produttivo è molto articolato e numerosi nuovi marchi sono apparsi sul mercato negli ultimi anni. Il comparto produttivo è caratterizzato essenzialmente da tre categorie di imprese:

- le distillerie vere e proprie, circa 135;

- gli imbottiglieri, che acquistano grappa in genere ad alto grado, da diverse distillerie, le miscelano secondo le loro ricette e compiono tutte le operazioni necessarie per rendere il prodotto idoneo al consumo, attualmente sono oltre 600;
- i commercianti con marchio proprio, che si fanno confezionare il prodotto da una distilleria o da un imbottigliatore. Sono oltre 1000; e tra di essi vi sono anche coloro che producono grappa di fattoria, ovvero aziende vitivinicole che fanno ricavare da un distillatore di fiducia la grappa dalle proprie vinacce (Odello L., 1999).

In Italia, la grappa è un prodotto fortemente di nicchia: con circa 40 milioni di bottiglie equivalenti essa rappresenta una quota di mercato molto minoritaria rispetto agli altri distillati che vantano produzioni di molte centinaia di milioni di pezzi (www.agroalimentarenews.com). In principio il consumatore era tipicamente l'uomo dai 35 ai 50 anni con maggiore concentrazione nei grandi centri cittadini, successivamente la fascia di età si è allargata andando a comprendere i giovani, a partire dai 18 anni, e le donne. Questo mutamento è non solo dovuto al cambio generazionale e culturale degli ultimi anni ma anche alla produzione diversificata di grappe con aromi più adatti a più fasce di età (Camera di Commercio di Treviso, 2004). Il 69% dei consumatori ha un'età compresa tra i 18 e i 49 anni, il 44% risiede nelle regioni del Nord, aree tipicamente vocate alla produzione di grappa, ma ben il 35% risiede nel Sud del paese.

1.2.4 Il processo produttivo

Il ciclo di produzione della grappa inizia in cantina, dove ha luogo la vinificazione: dopo la raccolta e la pigiatura dell'uva, il mosto viene separato dalle vinacce composte essenzialmente di bucce, vinaccioli, residui di polpa e talvolta raspi. Nel caso della vinificazione in rosso, la separazione delle vinacce avviene dopo la macerazione quando la fermentazione è già cominciata, pertanto esse contengono alcol e pochi zuccheri. Al contrario, le vinacce ottenute dalla vinificazione in bianco contengono zuccheri non ancora fermentati. Per questo motivo, il materiale vegetale conferito alla distilleria viene conservato in diversi modi per un periodo variabile da pochi giorni a parecchie settimane favorendo così la formazione di alcol.

Successivamente ha luogo la distillazione che è in sintesi l'operazione che porta all'estrazione dell'alcol e dei principi aromatici della vinaccia, concentrando il primo di 20-30 volte (partendo da vinacce con gradazione sui 3-4 gradi alcolici) e selezionando i secondi mediante un opportuno taglio delle teste e delle code.

Per la produzione della grappa vengono utilizzati due sistemi di distillazione: l'impianto discontinuo e l'impianto continuo. La scelta dell'impianto di distillazione è influenzata da vari fattori quali la quantità ed il tipo di vinacce a disposizione, il sistema d'insilamento, il livello qualitativo ricercato ed il tipo di grappa (tipica, delicata, aromatica, neutra), nonché la produzione giornaliera ed i relativi costi. In linea di massima è consigliabile utilizzare un impianto di distillazione discontinuo quando si dispone con certezza di vinacce di elevato pregio e di un ottimo sistema di conservazione delle stesse. Ciò a causa degli alti costi di produzione e della semplicità delle rettificazioni che l'impianto consente.

Nel caso di vinacce di qualità media, le quali quasi sempre completano la fermentazione nei silos delle distillerie e vengono insilate per tempi medio-lunghi, è più adatto un impianto di tipo continuo, con buona produzione oraria, allo scopo di ridurre i tempi di permanenza delle vinacce nei silos.

I sistemi tradizionali per la distillazione discontinua prevedono l'impiego di tre tipi di alambicchi, nei quali la vinaccia viene caricata, lavorata e poi scaricata:

- Alambicchi a fuoco diretto, costituiti da una caldaia in rame, di piccola capacità. Attualmente ne esistono ormai pochissimi esemplari perché essenzialmente l'uso del fuoco diretto comporta spesso gusti di cotto e di bruciato nella grappa.
- Alambicchi a bagnomaria, basati sul lento e delicato riscaldamento della vinaccia che in questo caso non viene a contatto con il metallo poiché dotati di una doppia caldaia nella cui intercapedine viene immessa acqua in ebollizione o vapore. La qualità della distillazione è di alto livello e capace di donare aromi delicati e note morbide al prodotto finale.
- Alambicchi a vapore diretto, costituiti da due o più caldaiette collegate in serie, la colonna di distillazione ed un condensatore. In ciascuna caldaia, al fondo delle quali è collegato un iniettore di vapore, possono essere caricati 180-350 kg di vinaccia. Il vapore passa attraverso le vinacce e produce una "flemma" contenente il 20-25% in alcol (Da Porto C., 2006).

La flemma passa attraverso una colonna di distillazione che permette di eliminare le impurità concentrando la frazione alcolica, generando tre frazioni: testa, corpo e coda. La prima è per lo più formata da sostanze che possiedono un punto di

ebollizione inferiore a quello dell'alcol etilico (le prime ad uscire dall'alambicco) come l'acetato di etile, acetaldeide, acetato di metile, che sono spesso negative per la qualità del distillato. Il corpo contiene i costituenti più apprezzati per l'aroma che evaporano tra i 78,4°C e i 100°C. Le code sono composte dalle sostanze con punti di ebollizione superiore ai 100 °C, in particolare alcoli superiori e furfurolo; questa componente contiene solo il 10 % di etanolo.

A partire dagli anni '70 per favorire l'abbassamento dei costi di produzione, si sono diffusi gli alambicchi continui, caratterizzati dall'introduzione ininterrotta di materia in caldaia e dalla produzione continua di distillato. Nella prima fase (disalcolazione) è prodotta una "flemma" che nella seconda (distillazione) viene rettificata al fine di ottenere un liquido a gradazione alcolica più elevata (fig. 1.1)

Alla fine del processo il distillato, caratterizzato da un contenuto alcolico pari al 70-80 %, viene immagazzinato all'interno di recipienti in acciaio e vetroresina, dotati di agitatori termici che favoriscono l'ossigenazione e mantengono la temperatura a valori costanti. Il tutto è posto sotto sigillo dagli ufficiali del Ministero della Finanza per circa 5-6 mesi.



Fig. 1.1 Impianto di distillazione in cui sono visibili la caldaia e le colonne di distillazione e demetilazione.

1.2.4.1 Stabilizzazione

Prima dell'imbottigliamento vengono eseguite delle analisi per accertare le caratteristiche stabilite dalla legislazione. Il titolo alcolometrico volumico per il consumo, compreso tra i 40°-60°, è ottenuto mediante diluizione con acqua demineralizzata (D.P.R n. 236/1988). Segue un periodo di refrigerazione, che

comporta un intorbidimento della grappa dovuto all'insolubilizzazione della frazione aromatica rancido-oleosa, a temperature variabili da $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ in relazione al tipo di distillato (grasso, delicato, aromatico, semi-aromatico o neutro). Per eliminare l'intorbidamento sono necessarie le operazioni di filtrazione e chiarifica, trattamenti che possono però asportare quote significative di profumi e di impurità essenziali al bouquet, ma non eliminano difetti derivanti da uno scorretto insilamento delle vinacce. Una volta resa brillante e cristallina, la grappa è sottoposta ad imbottigliamento; il prodotto finito va stoccato per un periodo di riposo e di recupero organolettico non inferiore ai sessanta giorni e solo dopo può essere immesso nel mercato.

Nel caso di grappe invecchiate o aromatizzate è necessario un periodo di maturazione in recipienti di legno non inferiore ai 12 mesi. Durante l'invecchiamento hanno luogo dei fenomeni chimico-fisici: il distillato è in grado di estrarre dal legno sostanze polifenoliche e avviare reazioni di etanolisi a carico della lignina, un polimero fenolico simile alla plastica (potere solvente dell'alcol). Si possono verificare inoltre reazioni ossidative favorite dalla permeabilità del legno all'ossigeno e processi di evaporazione di piccole molecole.

1.2.5 Tipologie di grappa

La classificazione delle grappe avviene essenzialmente in relazione alla durata dell'invecchiamento e alla vinaccia utilizzata (Odello L., 1999).

- Grappa giovane o bianca, viene imbottigliata al termine della distillazione o dopo aver riposato per un periodo variabile in contenitori di materiale impermeabile e inerte, come l'acciaio inox, la vetroresina e il vetro. E' incolore, dal profumo delicato e dal gusto secco.
- Grappa affinata: è mantenuta in botti di legno per un periodo di 3-8 mesi, inferiore a quello prescritto dalla legge per essere denominata "invecchiata".

Per essere invecchiabile una grappa dovrebbe possedere alcune caratteristiche ideali di partenza quali l'equilibrio tra prodotti di testa e di coda, la concentrazione di acetato di etile e acetaldeide inferiore a $100\text{ mg}/100\text{ ml a.a.}$, quella del 2-3 metilbutanolo attorno ai $150\text{-}200\text{ mg}/100\text{ ml a.a.}$, al massimo 30 mg di 2-butanolo e 2 mg di furfurolo.

- Grappa invecchiata, rimane in recipienti di legno per un periodo minimo di 12 mesi, quella denominata stravecchia o "riserva" almeno 18 mesi, in

botti di legno non verniciato (rovere, frassino, ciliegio, gelso). Tramite l'invecchiamento, la grappa assume dal legno una tonalità che va dal giallo paglierino al giallo carico, dorato o ambrato.

- Grappa aromatica: ottenuta da varietà di uve quali Moscato, Malvasia, il cui aroma varietale viene trasmesso al distillato.
- Grappa aromatizzata, imbottigliata con erbe, infusi, diversi tipi di frutti come ribes o bacche di sambuco, o altre sostanze naturali.

La grappa, sia essa giovane, invecchiata o riserva, viene classificata anche in base al vitigno da cui provengono le vinacce. Il clima, la composizione del terreno, l'esposizione e i metodi di coltivazione dei vigneti incidono sulla qualità dell'uva, le cui buone annate non interessano solo il vino ma anche la grappa. La grappa può dirsi di monovitigno quando è ottenuta dalla distillazione di vinaccia proveniente per almeno l'85% da un'unica varietà d'uva, o di polivitigno quando contiene invece il distillato di due varietà; il secondo vitigno citato nell'etichetta rappresenta almeno il 15% della materia prima totale utilizzata. Le grappe che non riportano l'indicazione dei vitigni in etichetta sono ottenute da più varietà d'uva differenti.

1.2.6 La degustazione

L'aroma di una grappa è la risultante di una serie di fattori che trova inizio nella vite, in grado di sintetizzare e di immagazzinare in un acino d'uva una serie di sostanze organoletticamente attive e si completa con la corretta conservazione e distillazione delle vinacce.

La grappa va servita non troppo fredda, ma soprattutto non troppo calda: tra i 9 e i 13°C si colloca la temperatura ideale per le grappe giovani e giovani aromatiche, intorno ai 17°C quelle invecchiate. Il bicchiere più indicato è a forma di tulipano di medie dimensioni (100-150 ml), in fine di cristallo.

Una valutazione organolettica completa della grappa prevede innanzitutto un esame visivo: l'acquavite giovane deve risultare trasparente e incolore, la tonalità della grappa invecchiata deve essere sempre comunque limpida. Eventuali velature e sospensioni indicano un'errata refrigerazione e filtrazione.

Si passa quindi all'esame olfattivo: è possibile distinguere i vari componenti presenti se la loro concentrazione supera il valore di "soglia olfattiva", con cui si intende il limite minimo di contenuto di una sostanza, espresso in ppm (parti per

milione), che ne consenta la percezione. Va detto però, che sebbene ciascuna sostanza possa essere contenuta in dose inferiore alla propria soglia, nell'insieme esse interagiscono tra di loro olfattivamente e degustativamente, creando una sensazione complessiva variabile come quantità e qualità.

Gli aromi riconoscibili durante l'analisi olfattiva (le sostanze odorose giungono direttamente alla mucosa nasale) e retroolfattiva (per via retronasale dopo aver deglutito la grappa), derivano direttamente dall'uva, soprattutto per le varietà a frutto aromatico, dalla trasformazione degli zuccheri in alcol e dal processo di distillazione. La qualità comincia dall'assenza di difetti che derivano dalla cattiva conservazione della vinaccia e da errati procedimenti di distillazione, e comprendono odori di aceto, muffa, fumo, rancido o cera. Un altro difetto comune a molte grappe è quello di essere troppo pungenti: l'alcol etilico, assieme ad altre sostanze volatili, può aggredire la mucosa nasale provocando una sensazione dolorosa. Le grappe invecchiate sono ricche anche di componenti odorose estratte dal legno. Piacevoli sono i profumi percepibili, dalle note fruttate di fragola, mela, banana, lampone e pesca alla frutta esotica, dalla nocciola alle note fiorite, dal moscato al profumo d'erba.

Sotto il profilo gustativo i sapori nella grappa sono ridotti a due, il dolce e l'amaro (imputabile all'acido butirrico e propionico), essendo il salato praticamente assente e l'acido non percepito come tale ma mascherato nell'aggressività alcolica.

Secondo gli assaggiatori professionisti un'acquavite di vinaccia di qualità risulta limpida e cristallina alla vista, intensa, fine e franca all'olfatto, armonica al gusto, ancora fine, fragrante e persistente nelle sensazioni retroolfattive (Odello L., 2007).

1.3 LA VINACCIA

La produzione di grappa è strettamente legata alla produzione italiana di uve. Di fatto meno di un terzo della vinaccia è utilizzata per produrre grappa, ma si tratta della vinaccia migliore, la più selezionata. La notevole quantità di materia di scarto (attorno a 240.000 tonnellate in paesi come Italia, Spagna, Francia) rappresenta un problema economico ed ecologico, ed il suo trattamento è regolamentato da norme restrittive. Viene frequentemente impiegata come concime animale e come fertilizzante (Ruberto G. *et al*, 2008), o per la produzione di alcol.

Analizzando il loro potenziale alcolico, le vinacce possono essere differenziate in 3 diverse tipologie: vinacce vergini, fermentate e parzialmente fermentate:

Le vinacce vergini: provengono da vinificazioni nelle quali le parti solide vengono allontanate dal mosto appena completata la pigiatura dell'uva (vinificazione in bianco) e quindi non contengono alcol ma solo zuccheri. Esse sono caratterizzate da un odore erbaceo o addirittura piatto, un colore vivo e una buona consistenza al tatto. Queste vinacce vengono fatte fermentare in contenitori d'acciaio cercando di controllare l'andamento e la velocità del processo fermentativo, responsabile in buona misura della qualità finale del distillato (Chinnici F. *et al.*, 2001).

Le vinacce fermentate: iniziano e completano la fermentazione alcolica insieme con il mosto durante la vinificazione "in rosso", pur conservando qualche residuo zuccherino. Quindi, esse partecipano alla caratterizzazione del futuro vino e acquisiscono, d'altro canto, vinosità e sapori non riscontrabili nelle vinacce vergini.

La grappa che deriva da questo tipo di vinificazione si presenterà più pulita nel corpo, con sapori più netti e più delicati. Infatti in questo tipo di vinacce, che fermentano nel proprio mosto-vino, la trasformazione degli zuccheri avviene a valori di pH compresi tra 3,0-3,2, ottimali per una buona selezione dei lieviti a scapito dei batteri, ad una buona acidità e ad una temperatura che varia tra i 20-30°C, consentendo quindi un decorso regolare di tutta la fermentazione alcolica e favorendo il formarsi dei vari prodotti secondari in un contesto organolettico equilibrato.

Le vinacce parzialmente fermentate: presentano caratteristiche intermedie rispetto alle precedenti. E' necessario fare un'ulteriore distinzione tra le vinacce semifermentate nel proprio mosto-vino e quelle che, in assenza del liquido, hanno portato avanti parzialmente una dannosa fermentazione nel silos di stoccaggio in attesa del trasporto in distilleria. Le prime generalmente sviluppano solo un 20-30 % del loro grado alcolico potenziale e sono soggette a possibili degradazioni e perdite di alcol durante le fasi di lavorazione; nonostante ciò possono comunque essere considerate una materia prima di discreto livello. Le seconde, invece, possono seriamente pregiudicare la possibilità di ottenere un distillato di buona qualità in quanto in esse non si verifica una fermentazione, ma una vera e propria

combustione degli zuccheri che dà origine a composti organoletticamente sgradevoli a scapito dello sviluppo di alcol (De Rosa T. *et al.*, 1994).

1.3.1 Composizione chimica della vinaccia

La vinaccia è il residuo solido che si ottiene dopo l'estrazione del succo d'uva durante il processo di vinificazione e comprende bucce, vinaccioli e in alcuni casi raspi. Questi componenti rappresentano il 10-20% della massa totale dell'uva (De Pina C. e Hogg T. 1999).

La composizione chimica della vinaccia è piuttosto complessa e varia a seconda di fattori quali l'andamento stagionale, il luogo di provenienza, la varietà del vitigno, il periodo della vendemmia e la diversa tecnica di vinificazione. Acqua, alcoli, zuccheri acidi, aldeidi, esteri, pectine, polifenoli, sostanze minerali, coloranti ed aromatiche, sono le classi di composti maggiormente rappresentate.

Acqua

E' presente in grande quantità, come del resto in qualsiasi tessuto vegetale, essendo elemento indispensabile all'attività fisiologica. La sua percentuale dipende dallo stato di maturazione al momento della raccolta e dalle condizioni vegetative in cui la pianta si trova. La quantità d'acqua della vinaccia è un parametro diverso dal valore dell'umidità di queste, il quale risente della presenza di mosto. Le vinacce migliori sono quelle non completamente pressate, ricche in liquido vinoso, con un grado di umidità che varia dal 55 al 70%, che consente di sfruttare meglio il materiale vegetale estraendo le caratteristiche organolettiche dal vitigno (Ruberto G. *et al.*, 2008).

Cellulosa

Il 10-20 % delle bucce è composto da cellulosa, un polisaccaride e più precisamente un polimero lineare costituito da molecole di D-glucosio (circa 2800 unità) unite con legami β -1,4-glicosidici. Le fibre di cellulosa sono costituite da fasci di catene polisaccaridiche parallele unite da legami idrogeno tra i gruppi ossidrilici su catene adiacenti. Questo tipo di struttura conferisce alle fibre di cellulosa un'elevata resistenza meccanica.

Zuccheri

Gli zuccheri presenti nelle vinacce sono il glucosio e il fruttosio in pari concentrazione, anche se i lieviti nella demolizione glucidica attaccano

preferibilmente il glucosio trasformandolo in alcol etilico, con un rendimento teorico del 60 %.

Acidi

Rispetto al mosto, le vinacce presentano minore acidità titolabile ed un più elevato valore di pH. L'acidità fissa (1-2 %) è per lo più dovuta all'acido tartarico (non fermentato né dai lieviti né dai batteri) e in minor misura agli acidi malico, citrico, succinico in gran parte salificati da potassio, calcio e magnesio (De Rosa T. e Castagner R., 1994).

Il grado di acidità dipende dalla varietà dell'uva, dall'andamento stagionale (annate piovose corrispondono a valori più alti di pH) e dalla quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce. Infatti, il pH del mosto oscilla tra valori di 2,8 e 3,2 e di conseguenza, la vinaccia fermentata insieme al mosto avrà valori più bassi rispetto alla vinaccia che può toccare livelli di pH compresi tra 3,8 e 5,5. A questi valori sono inoltre più attivi gli enzimi pectin-metil-esterasici che idrolizzano le pectine liberando l'alcol metilico, e quelli lipoossigenasici che attaccano gli acidi grassi insaturi della buccia con formazione di aldeidi dall'odore rancido (Odello L. *et al.*, 1997).

Sostanze pectiche

Le sostanze pectiche presenti nella buccia, sono costituite da lunghe catene lineari di condensazione di acido galatturonico, le cui funzioni acide sono in parte libere ed in parte esterificate con gruppi metilici.

L'azione enzimatica della pectin-metil-esterasi di origine vegetale durante il periodo di stoccaggio, favorita dalle temperature di fermentazione e di distillazione, può contribuire a liberare una frazione elevata di alcol metilico (De Rosa T. e Castagner R., 1994). La presenza di alcol metilico nelle vinacce è influenzata pertanto dalle modalità d'insilamento (si forma più rapidamente nelle uve bianche che nelle rosse), dal metodo di lavorazione in cantina e dal tipo di vitigno (nelle vinacce Pinot e Chardonnay è presente in quantità tra 1,5-1,8 ml/100 ml a.a.).

Composti polifenolici

I polifenoli sono composti che rivestono un ruolo primario in enologia. Durante la vinificazione vengono estratti dalle differenti parti dell'acino in cui risiedono (nelle bucce in percentuale compresa tra l'1 e il 2 %, nei vinaccioli 5-6 %), e subiscono variazioni di struttura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino. I composti fenolici si suddividono dal punto di vista chimico in quattro categorie (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 2004):

Acidi fenolici e loro derivati

Comprendono gli acidi di tipo benzoico e cinnamico, presenti per lo più in forma glicosilata, e localizzati nei vacuoli delle cellule della buccia. Per azione di microrganismi o nel caso di vini conservati in barriques, si formano fenoli volatili caratterizzati da un odore sgradevole. A questi composti si può associare il tirosolo prodotto durante la fermentazione alcolica a partire dalla tirosina, sintetizzata dal lievito. Gli stilbeni, appartenenti ad una famiglia di polifenoli complessi, comprendono tra gli altri il resveratrolo, localizzato nelle bucce in concentrazione compresa tra 1-3 mg/l, ed estratto durante la vinificazione in rosso.

Flavoni

I composti più comuni di questa categoria sono i flavonoli, pigmenti gialli delle bucce delle uve nere e bianche, che si differenziano per l'aglicone laterale (campferolo, quercetina, miricetina).

Antociani

Gli antociani sono i pigmenti rossi delle uve, presenti in soluzione nel vacuolo delle cellule della buccia. In forma eterosidica sono più stabili e prendono il nome di antocianine (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, dominante in tutte le varietà). Il profilo degli antociani nell'uva viene determinato mediante cromatografia liquida associata a spettrometria di massa (LC/MS) (Flamini R., 2005). La maggiorparte di questi pigmenti si associa con i tannini per formare una classe di molecole dal colore più stabile.

Tannini

Sono molecole fenoliche raggruppate in base alla natura delle unità monomeriche che li compongono. Possono combinare stabilmente con le proteine ed altri polimeri vegetali, tra cui le glicoproteine della saliva, determinando la sensazione di astringenza. Si distinguono in tannini idrolizzabili, tannini condensati e tannini

complessi. I primi costituiscono i principali tannini commerciali e liberano acido gallico ed ellagico. I secondi invece, sono polimeri dei flavan3-oli o catechine. In ambiente acido il riscaldamento di questi polimeri genera dei prodotti di condensazione detti procianidine, che si differenziano in base alla struttura. Sono localizzati nei raspi e in tutti i tessuti dell'acino, nei semi e nella buccia dove svolgono una funzione antifungina, contrastando lo sviluppo del micelio di funghi privi di laccasi (unico enzima in grado di degradare i tannini senza essere inattivato), e dove si possono ulteriormente suddividere in:

- tannini situati nei vacuoli, sottoforma di ammassi condensati, nelle cellule prossime all'epidermide, e di granulazioni diffuse, nelle cellule interne del mesocarpo;
- tannini legati fortemente al tonoplasto, insensibili all'azione degli ultrasuoni;
- tannini integrati nella parte cellulosopectica.

Sostanze aromatiche

Gli strati più interni della buccia sono sede della maggior parte degli aromi varietali o primari, molecole odorose come linalolo (responsabile dell'aroma del vino Moscato), nerolo, citronellolo e geraniolo appartenenti per lo più alla famiglia dei terpeni. Questi, pur avendo un punto di ebollizione elevato (dai 150°C ai 198°C), sono in grado di passare dalla vinaccia all'acquavite rendendola riconoscibile organoletticamente (De Rosa T. e Castagner R., 1994; Odello L. *et al.*, 1997). Non tutti i vitigni posseggono molecole aromatiche e questo consente la distinzione tra varietà a frutto neutro e varietà a frutto aromatico come Moscato, Malvasia, Müller Thurgau, Riesling, Silvaner, Sauvignon e Traminer. La dotazione aromatica delle uve dipende anche dalla fase di maturazione e dall'andamento stagionale, in particolare, le annate piovose influiscono negativamente sul livello dei terpeni.

I terpeni, sostanze aromatiche primarie localizzate negli strati più interni dell'epicarpo, si ritrovano, per il loro elevato punto di ebollizione, nelle code del distillato. Reazioni di ossidazione che possono intervenire durante la fermentazione alcolica possono modificare queste molecole aromatiche, producendo composti completamente privi di interesse organolettico ed un prodotto alquanto scadente.

Gli aromi secondari che evaporano soprattutto nelle prime fasi della distillazione e in quelle finali, sono costituiti da alcuni alcoli, esteri, acidi, aldeidi e chetoni, prodotti durante la fermentazione alcolica o dai lieviti. Tra questi, i maggiori responsabili di ciò che viene definito aroma secondario dei distillati sono sicuramente gli alcoli superiori e gli esteri etilici di alcuni acidi grassi a corta e media catena, saturi e insaturi (Ruberto G. *et al.*, 2008).

1.3.2 Sistemi di conservazione della vinaccia

Non essendo sempre possibile distillare immediatamente la vinaccia conferita dalle cantine alle distillerie, essa viene stoccata in silos prima del processo di distillazione. Sono stati sperimentati diversi sistemi di conservazione; quelli maggiormente utilizzati (Odello L. *et al.*, 1997) sono:

- Contenitori aperti in cemento: è il sistema più tradizionale che prevede l'utilizzo di "vasconi" interrati o sopraelevati, chiusi su tre, quattro o cinque lati. Nei primi i camion scaricano direttamente la vinaccia che viene poi sistemata e compressa manualmente. I silos interrati presentano aspetti negativi quali le difficoltà di pulizia e di estrazione delle vinacce, ma anche una fermentazione maggiore per effetto coibente del terreno.

Nel secondo caso si utilizzano ruspe sia per la stratificazione sia per la compressione (fig.1.2), avendo l'accortezza di creare una cunetta nei punti di contatto tra la parete e le vinacce. Infine, queste ultime vengono ricoperte con teli di nylon ben tesi e bloccati da cumuli di sabbia, allo scopo di evitare il contatto con l'aria. Tanto più perchè nei giorni successivi, quando ha inizio la fermentazione e sino alla fine, si verifica un calo di volume della vinaccia anche del 10-15 % rispetto all'altezza iniziale. Ciò è dovuto appunto alla fermentazione alcolica degli zuccheri con produzione di alcol e di CO₂ (che si disperde nell'atmosfera) e allo sgrondo di vinello che non può essere stoccato.

- Sacconi di plastica (fig.1.3): utilizzati sia per piccole partite di pregio sia in sostituzione di altre metodologie, con lo scopo di conservare aroma e freschezza. Si tratta di lunghi tunnel orizzontali nei quali la vinaccia viene spinta e compressa da una macchina ad avanzamento automatico, consentendo così di ottenere condizioni di severa anaerobiosi ed eventuali pratiche di acidificazione ed inoculo della vinaccia con lieviti selezionati (Da Porto C. 2002). L'intero sistema che prende il nome di "Grappa-system" permette alle distillerie di gestire in modo ottimale gli spazi anche in periodi di grande afflusso di vinaccia dalle cantine.

- Contenitori cilindrici o cubici: di piccole dimensioni (150-700 kg) chiusi con coperchio o nel caso dei più grandi con film plastico ricoperto di sabbia.
- Serbatoi in acciaio inox: dotati di dispositivi meccanici automatizzati per il loro riempimento e svuotamento; consentono una buona conservazione delle vinacce per tempi brevi e minori perdite di alcol (De Rosa T. e Castagner R., 1994). La compressione soffice delle vinacce causa però incameramento d'aria e si verifica un'eccessiva velocità di fermentazione.



Fig. 1.2 Silos in cemento per la conservazione della vinaccia.



Fig. 1.3 Sacchi di nylon per la conservazione della vinaccia.

Per ridurre le perdite di fragranza, del grado alcolico ed in particolare, per impedire l'innescò di dannose fermentazioni batteriche, è necessario limitare il tempo di permanenza delle vinacce nei silos; in questo modo è possibile ottenere composti di grande interesse organolettico originati da un'equilibrata e corretta fermentazione alcolica.

1.4 I LIEVITI

I lieviti sono microrganismi unicellulari conosciuti da migliaia di anni, utilizzati in processi fermentativi come la produzione di bevande alcoliche (birra e vino) e la lievitazione del pane. Al giorno d'oggi i lieviti sono sfruttati anche come fonte alternativa di proteine, enzimi e vitamine ad alto valore nutrizionale ed hanno numerose applicazioni nell'industria alimentare come additivi, agenti determinanti l'aroma, nella produzione di terreni microbiologici e di estratti, ma anche mangimi animali.

1.4.1 La cellula di lievito

I lieviti sono funghi unicellulari aventi 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 μm di lunghezza e 1-5 μm 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* ci sono due opposti mating type, α e **a**, specializzati nel fondersi l'un l'altro; il riconoscimento avviene tramite specifiche molecole segnale diffusibili (fattori di accoppiamento) e recettori proteici di superficie. La cellula diploide che ne deriva, chiamata **a/ α** , si riproduce per gemmazione e può formare spore in caso di necessità.

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.

1.4.2 La classificazione

Attualmente i lieviti si collocano nel complesso Regno dei Funghi all'interno del phylum Mycota, e in base alla modalità di riproduzione sessuale si suddividono all'interno delle classi di Ascomiceti e Basidiomiceti.

Le classificazioni dei lieviti, fino al 1984 curate da 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 revisione cartacea di Kurtzman e Fell del 1998, in cui le specie riconosciute sono passate da 500 a 700 circa e i generi da 60 a 100.

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.

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 stata oggetto recentemente di ulteriori modifiche, soprattutto a livello di specie: alcune sono state assimilate con altre o sopprese, e ne sono state create di nuove.

1.4.3 I lieviti presenti nel grappolo

Non vi sono in letteratura studi riguardanti in modo specifico le popolazioni di lieviti che vivono nell'ambiente della vinaccia. Tuttavia, essendo quest'ultima

costituita principalmente dalle bucce degli acini, una parte dei lieviti presenti è quella che si può isolare sulla superficie della bacca.

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 P.V. *et al.*, 2000).

- La pioggia 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).
- La presenza di lieviti sulle uve mature venne dimostrata già da Pasteur, il quale osservò che apparivano solamente quando gli acini erano completamente maturi. Inoltre poiché i lieviti non sono dotati di movimento, devono dipendere da qualche mezzo di dissemina per raggiungere le uve, escludendo l'aria come agente di trasporto. Vari insetti, soprattutto *Drosophila* ospitano come normali simbionti i lieviti, non tanto nel tratto gastrointestinale dove non riescono a sopravvivere quanto nell'apparato boccale, 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).

Rosini G. (1982) ha studiato la distribuzione della microflora di lieviti sulla superficie della bacca e nel grappolo. La zona vicino al peduncolo costituisce un substrato favorevole per i lieviti, e gli acini che circondano quest'area ospitano una popolazione da 10 a 100 volte più alta di quella presente nella parte centrale e inferiore del grappolo.

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).

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 *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium* che sono presenti in generale nell'ambiente vigneto (suolo, foglie, corteccia) (Barata A. *et al.* 2007). Questi si ritrovano anche nei grappoli maturi, ma in minor quantità rispetto ai lieviti apiculati a metabolismo ossidativo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, che sembra dominano anche sui frutti danneggiati, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*.

I lieviti non-*Saccharomyces* rappresentano il 50-75% della popolazione totale e nonostante la loro incapacità a completare la fermentazione, persistono durante le fasi iniziali (Mendes A. *et al.*). Tra le specie più frequenti appartenenti ai generi già citati sono state isolate: *Rhodotorula glutinis*, *Candida stellata*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens* e *kluuyveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Taphrina spp.*, una specie ancora non del tutto caratterizzata (Rousseau S. *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).

Il principale agente della fermentazione *Saccharomyces cerevisiae* non è presente oppure viene rilevato a bassissime concentrazioni sul grappolo (Fleet G. H. , 2003). Tuttavia, le specie di *Saccharomyces* sono ampiamente diffuse nelle superfici vinarie, ad esempio nei barili, nei contenitori di fermentazione, nell'attrezzatura per l'imbottigliamento, e nel suolo della cantina.

Sono riportate di seguito alcune caratteristiche dei generi più diffusi (Zambonelli C., 2003; Kurtzman C.P. e Fell J.W., 2000).

Hanseniaspora

I lieviti di questo genere, appartenenti alla famiglia delle *Saccharomycoidaceae*, sono tutti dotati di attività fermentativa, hanno cellule vegetative apiculate od ovali allungate. Ad essi è attribuita principalmente l'alta acidità volatile (acido acetico e i suoi esteri) presente in alcuni vini.

La loro relazione con i lieviti del genere *Kloeckera* di cui rappresentano la forma perfetta (sporigena) è stata stabilita da Meyer S. *et al.* (1978). Il genere comprende attualmente 11 specie, ed è suddiviso in due cluster, il primo include le specie *H. vineae*, *H. osmophila* e *H. occidentalis*, il secondo *H. valbyensis*, *H. clermontiae*, *H. meyeri*, *H. uvarum*, *H. pseudoguilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. lachancei*, (Cadez *et al.*, 2003).

Pichia

Genere appartenente alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*, comprende lieviti quasi totalmente privi di attività fermentativa, che producono basse concentrazioni di alcol (0,2-4,5 %), grandi quantità di acido acetico (1-2 g/l) ed etil-acetato. Possiedono notevoli capacità ossidative per cui sono in grado di sviluppare alla superficie dei liquidi insieme ad alcune specie del genere *Candida*, provocando la fioretta dei vini. Il gruppo più rilevante è rappresentato da *Pichia membranaefaciens*, costituito da un insieme numeroso ed eterogeneo di specie.

Candida

Il genere è molto eterogeneo e comprende alcune specie di interesse enologico. Non tutte sono dotate di attività fermentativa; alcune come *C. stellata* possono essere dominanti in fermentazioni a basse temperature (10 °C) perché a queste temperature aumenta la resistenza all'alcol.

Zygosaccharomyces

Le cellule sono globose, ellittiche o cilindriche, si riproducono per gemmazione multilaterale; la sporificazione, di norma, è preceduta da coniugazione tra cellule. Il genere comprende 9 specie: *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. cidri*, *Z. fermentati*, *Z. florentinus*, *Z. mellis*, *Z. microellipsoides*, *Z. mrakii*, *Z. rouxii*. Questi lieviti sono importanti per la loro fermentazione preferenziale del fruttosio rispetto al glucosio ed in particolare per la loro osmotolleranza: essi sono infatti capaci di sviluppare a

concentrazioni zuccherine tra il 50- 60 %. Sono inoltre resistenti ad alti livelli di SO₂ , di etanolo (18 %) e ai conservanti (acido ascorbico e benzoico). Possono essere presenti nei mosti in cui è avviata la fermentazione spontanea essendo dotati di buon vigore fermentativo.

Rhodotorula

Attualmente a questo genere appartengono 8 specie, sei delle quali sono in grado di assimilare nitrati, e non sono dotate di attività fermentativa. Sono lieviti anamorfi assegnati al gruppo dei Basidiomiceti. Le cellule sono sferoidali, ovoidali o allungate con riproduzione vegetativa multilaterale o polare; talvolta possono svilupparsi ife o pseudoife e non presenta ballistoconidi. Su piastra di Malt agar le colonie sono rosa, arancioni, rosse, giallognole, di consistenza dal burroso al mucoide; la colorazione della colonia è determinata dalla produzione di pigmenti carotenoidi.

Sono state evidenziate in alcuni casi le corrispondenti forme perfette tra le specie appartenenti ai generi *Rhodospordium* e *Leucospordium*.

Cryptococcus

I lieviti appartenenti a questo genere sono Basidiomiceti caratterizzati, dal punto di vista morfologico e fisiologico, dall'assenza di pseudomicelio e pigmentazione delle colonie; non si riproducono per via sessuata e non possiedono attività fermentativa. A differenza delle specie di *Rhodotorula* sono in grado di assimilare l'inositolo (Esteve-Zarzoso B. *et al*, 1999).

1.4.4 Il gruppo *Saccharomyces sensu stricto*

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

Un approccio multigenico che ha preso in considerazione l'analisi del DNA ribosomale, del fattore di elongazione EF-1 α , della subunità piccola dell'rDNA mitocondriale, della COXII (citocromo ossidasi II, mitocondriale) ha determinato l'eliminazione dell'intero gruppo *sensu stricto*. Le 10 specie *S. barnetti*, *S.*

castelli, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. rosinii*, *S. servazzii*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis*, *S. unisporus* sono state riclassificate all'interno dei generi *Kazachstania*, *Naumovia* e *Lachancea* (Kurtzman C.P. 2003).

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^T sembra essere il prodotto di ibridazione ottenuto da *S. cerevisiae* e l'antico *S. uvarum* (Nguyen H. *et al.*, 2000); mentre *S. pastorianus* si è generato dalla fusione di *S. cerevisiae* con *S. bayanus* (Casaregola S. *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 L. *et al.*, 2002).

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. *S. bayanus* var. *uvarum* è un ceppo dotato di caratteristiche peculiari quali la criotolleranza e la produzione di alti quantitativi di glicerolo (Naumov *et al.*, 2001), di acido succinico e malico. *S. pastorianus* è una specie rappresentativa dei lieviti freddo-fermentanti isolata dalle birre Lager.

Le tre specie aggiunte recentemente sono *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* (Naumov G. *et al.*, 2000b), la prima isolata in Brasile e le altre in Giappone. Questi lieviti sono simili agli altri per caratteristiche genotipiche e fenotipiche, in particolare la capacità di fermentazione. Nel 2008 Wang e Bail hanno isolato un'altra specie classificata all'interno di questo gruppo, *S. arboricolus*, proveniente dalla corteccia di alcuni alberi appartenenti alla famiglia delle Fagaceae.

Saccharomyces cerevisiae

All'interno dei *S. sensu stricto* è sicuramente il più studiato per le sue caratteristiche di vigore fermentativo, di potere alcoligeno, di resistenza agli antisettici e di adattabilità alle più varie condizioni. È il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato, grazie alla collaborazione fra numerosi laboratori di ricerca (Mewes H. *et al.*, 1997).

Le cellule vegetative possono essere globose o subglobose, ellittiche o cilindriche. All'atto della sporificazione le cellule si trasformano direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 spore.

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.*, 2004).

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 I.S. *et al.*, 2000).

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 F. *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 F. *et al.*, 1998; Pretorius I.S. *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 2004).

1.4.5 Il metabolismo energetico dei lieviti

La cellula di lievito per svilupparsi di carboidrati semplici, di una fonte azotata (aminoacidi, ammonio ed urea), fosfati, solfati, ossigeno, ioni metallici come K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Mn e in certi casi una piccola quantità di vitamine: biotina, piridossina, acido pantotenico, nicotinamide, diammina, acido aminobenzoico.

1.4.5.1 Il metabolismo degli zuccheri

I lieviti utilizzano come fonte energetica preferibilmente da zuccheri a 6 atomi di carbonio come glucosio, fruttosio (entrambi presenti abbondantemente in mosto e vinaccia), e metabolizzati rapidamente; 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 come le invertasi, localizzate nello spazio periplasmico. Lo stesso discorso vale per il raffinoso, e maltotriosio. I polisaccaridi quali maltotetraosio o le destrine non vengono fermentati. Gli esosi sono trasportati attraverso la membrana mediante un sistema di proteine codificato dalla famiglia multigenica *HXT* la cui espressione è regolata dalla disponibilità di glucosio nel mezzo (fig 1.4).

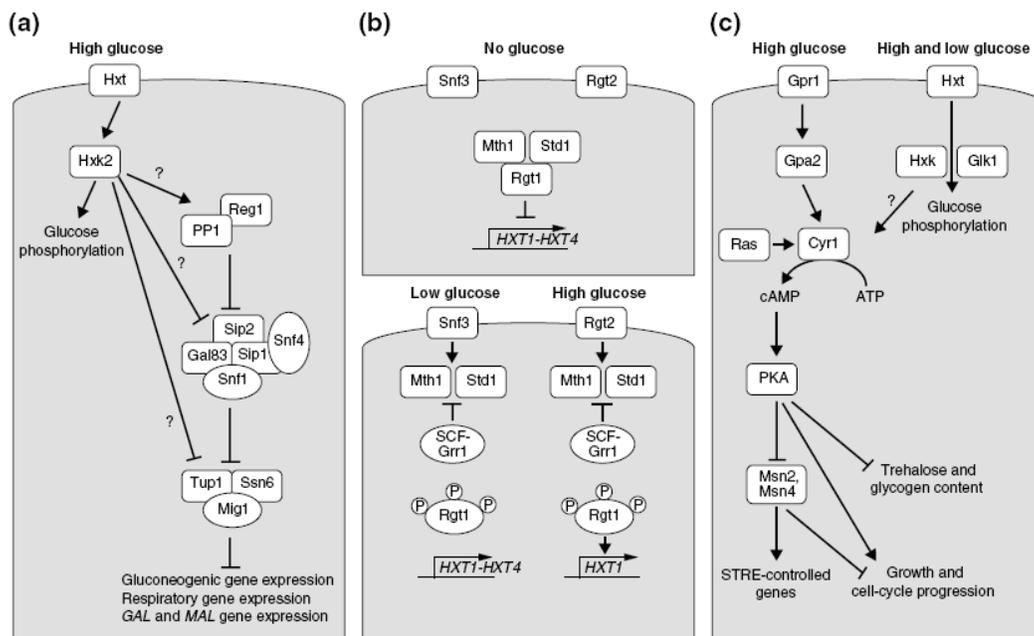


Fig 1.4 Rappresentazione schematica delle tre principali vie di regolazione del glucosio in *S. cerevisiae*.

La prima via di regolazione, maggiormente studiata in *S. cerevisiae*, ha luogo quando il glucosio è presente ad alte concentrazioni (almeno 9 g/l nei mosti). Anche in presenza di ossigeno *S. cerevisiae* degrada il glucosio solo attraverso la fermentazione, fenomeno noto come effetto Crabtree. Un complesso contenente la chinasi Snf1 ed altre subunità regolatorie si attiva reprimendo il complesso di proteine Mig1, Ssn6 e Tup1 che quindi reprime la trascrizione dei geni coinvolti nella respirazione, nella gluconogenesi e nel metabolismo di fonti alternative di carbonio (galattosio e maltosio). A basse concentrazioni di glucosio la protein fosfatasi PP1 assieme a Reg1 inibisce Snf1 (Geladé R., *et al.* 2003).

Il secondo meccanismo di regolazione è coinvolto nell'espressione dei geni per il trasporto del glucosio. Le proteine Snf3 e Rgt2 sono omologhi di trasportatori non attivi, ma agiscono da regolatori dei geni HXT. Nove di questi 17 geni sono espressi in condizioni enologiche, ciascuno codifica per una proteina in grado di trasportare l'esoso sfruttando la forza proton-motrice (Slaughter J., 2003). In assenza di glucosio il complesso di cui fa parte il fattore di trascrizione Rgt1 agisce come repressore dei geni HXT1-HXT4. Quando è presente, Rgt1 viene represso attraverso l'inattivazione di SCF-Grr1, la degradazione delle proteine Mth1 e Std1 e l'iperfosforilazione da parte di una chinasi non nota. Ne consegue la dissociazione di Rgt1 dai promotori HXT. Alti livelli di glucosio aumentano l'espressione di HXT1 attraverso Rgt2 in un processo che determina l'attivazione di Rgt1.

Quando al mezzo viene aggiunto glucosio i lieviti, prima cresciuti in fonti di carbonio non fermentabili, attivano la terza via metabolica, caratterizzata dal rapido aumento dei livelli di cAMP mediato dall'adenilato ciclasi Cyr1, la cui attivazione a sua volta dipende dalla proteina Ras. L'attivazione di questa via richiede sia la rilevazione del glucosio extracellulare attraverso il sistema di proteine accoppiate Grp1/Gpa2, sia la fosforilazione di quello intracellulare. Ne consegue l'attivazione della protein chinasi A (PKA) che determina la modulazione di una serie di geni coinvolti nella risposta allo stress, nell'inibizione dell'attività respiratoria e nell'attivazione di quella di demolizione del glicogeno, nell'inibizione e dei trasportatori Hxt6 e Hxt7 a favore di quelli ad alta capacità di trasporto del glucosio.

La fase iniziale di demolizione del glucosio, la glicolisi, in cui sono individuabili due stadi successivi, ha luogo nel citosol. Nel primo, endoergonico perché richiede ATP, il glucosio è convertito in fruttosio 1,6 difosfato in tre passaggi, il primo dei quali porta alla fosforilazione di glucosio e fruttosio da parte di una esochinasi. *S. cerevisiae* ne possiede due, PI represso da glucosio e inattivo durante la fase stazionaria e PII, attivo prevalentemente durante la fase log in un mezzo con alta concentrazione di zucchero.

Nel secondo stadio, la fosforilazione ossidativa, vengono prodotte due molecole di ATP e piruvato. A seconda delle condizioni ambientali, in particolare la quantità di glucosio e la concentrazione di ossigeno, il piruvato può andare incontro a fermentazione alcolica, fermentazione gliceropiruvica (entrambe hanno luogo nel citoplasma) e respirazione (nel mitocondrio) che servono a rigenerare il potere riducente del NAD⁺ da NADH (terzo stadio). In presenza di ossigeno il processo continua dapprima con la decarbossilazione del piruvato ad acetato legato al coenzima A, che viene poi demolito ossidativamente attraverso il ciclo dell'acido citrico.

Come descritto in precedenza, in condizioni di anaerobiosi o ad elevate quantità di zuccheri il lievito porta a termine la fermentazione alcolica tramite la decarbossilazione dell'acido piruvico ad acetaldeide da parte dell'enzima piruvato decarbossilasi, di cui esistono due isoforme, PDC5 e PDC1 (la forma più attiva).

Quando si verifica un blocco a livello di acido piruvico o acetaldeide, determinato ad esempio dall'uso di anidride solforosa in grado di sequestrare il composto sottraendolo alla fermentazione alcolica, la ricostituzione del NAD⁺ avviene attraverso la via alternativa rappresentata dalla riduzione del diidrossiacetonefosfato a glicerofosfato con produzione di glicerolo. La fermentazione gliceropiruvica può avvenire anche all'inizio della fermentazione: quando i lieviti per un breve periodo crescono in presenza di ossigeno, gli enzimi della fermentazione alcolica sono debolmente espressi. Questo prodotto, conferisce corposità e dolcezza ai vini, dove è presente in quantità comprese tra 3 e 15 g/l.

L'acido acetico, principale acido volatile responsabile di effetti organolettici negativi, può derivare dall'idrolisi dell'acetil coenzima A, oppure in presenza di elevate concentrazioni di acetaldeide e pH alcalini, l'aldeide deidrogenasi provoca l'ossidazione dell'aldeide acetica (responsabile dell'odore di frutta matura) con formazione sia di etanolo che di acido acetico. Maggiore è la concentrazione

iniziale di zuccheri, maggiore è la produzione di acido acetico, indipendentemente dalla quantità di zucchero fermentato. Per condensazione di una molecola di piruvato e una di acetaldeide, i lieviti producono diacetile che viene poi ridotto a 2,3 butandiolo e acetoino dal caratteristico odore di burro (Ribéreau-Gayon P. *et al.*, 2004).

La degradazione dell'acido malico

Il lievito *Schizosaccharomyces pombe*, possiede un sistema di trasporto attivo del malato e riesce a completare la fermentazione maloalcolica che prevede la trasformazione del malato in piruvato mediante l'enzima malico, poi decarbossilato ad etanale e quindi ridotto ad etanolo. Il suo impiego durante la fermentazione però presenta alcuni svantaggi quali la scarsa competitività del lievito e la crescita ottimale a 30°C che comporta una limitata liberazione di aromi varietali. *S. cerevisiae* è in grado di metabolizzare solo parzialmente l'acido malico (intermedio del ciclo di Krebs) abbassando l'acidità del vino. Un ceppo maloetanolico di *S. cerevisiae* altamente efficiente è stato ottenuto clonando e co-esprimendo i geni di *S. pombe mae1*, che codifica per una permeasi, e l'enzima malico *mae2* (Pretorius I. 2000).

1.4.5.2 Il metabolismo dell'azoto

Carenze nell'assimilazione di composti dell'azoto rappresentano uno dei fattori di stress più importanti per il lieviti poichè determinano l'arresto del trasporto degli esosi, comportando spesso scarse performance e arresti di fermentazione. Il contenuto totale di azoto nel succo d'uva varia tra 60 e 2400 mg/l. I maggiori composti azotati presenti nel mosto sono lo ione ammonio, che costituisce la fonte principale di azoto, piccoli peptidi, urea e amminoacidi, assimilati più o meno rapidamente attraverso permeasi generali (GAP) o specifiche. *S. cerevisiae* è incapace di idrolizzare adeguatamente le proteine e nitrati. L'ammonio viene assimilato principalmente assieme all' α -chetoglutarato, prodotto durante il ciclo di Krebs, tramite l'enzima glutammato deidrogenasi (GDP) NADPH-dipendente. Il prodotto della reazione è il glutammato, il cui gruppo amminico può essere trasferito ad un altro α -chetoacido per transaminazione, formando un nuovo aminoacido (tirosina, alanina, valina, leucina, isoleucina) rilasciando α -chetoglutarato. Quando cala il contenuto di azoto inorganico nel mosto, la reazione principale per la sua assimilazione diviene la conversione del glutammato in glutamina attraverso l'enzima glutammina sintasi. Ciò comporta

però il completo esaurimento del glutammato all'interno della cellula, pertanto l'enzima glutammato ossi-glutarato amino transferasi catalizza una reazione di aminazione dell' α -chetoglutarato con il gruppo amminico della glutammina, ottenendo così due molecole di glutammato. Un altro composto chiave del metabolismo è l'aspartato, che viene sintetizzato a partire dall'ossalacetato del ciclo di Krebs (in aerobiosi), che per transaminazione con il glutammato genera aspartato e α -chetoglutarato poi convertito in asparagina, metionina, treonina, isoleucina e lisina. Nel lievito, un complesso sistema di controllo metabolico assicura prima l'assimilazione degli aminoacidi (e piccoli peptidi) presenti nel mosto, poi eventualmente la loro sintesi.

Come per il glucosio esiste un sistema di rilevazione dell'azoto, in questo caso due trasportatori fungono anche da sensori: Mep2, che introduce ioni ammonio, attivo quando l'azoto inorganico è l'unica fonte disponibile, e Gap1, permeasi non specifica in grado di trasportare aminoacidi. Essi segnalano la disponibilità di azoto all'esterno della cellula attivando la proteina Sch9 che a sua volta attiva il complesso PKA coinvolto anche nella regolazione del glucosio. Sch9 è il punto di contatto dei due sistemi, di risposta al glucosio e all'azoto: è infatti la proteina target anche di Gpa2 che viene attivato in presenza di alte concentrazioni di glucosio via Gpr1.

1.4.5.3 Il metabolismo lipidico

La frazione lipidica è concentrata maggiormente nelle bucce rispetto alla polpa, e cambia a seconda della varietà delle uve. I composti lipidici necessari per l'adattamento di *S. cerevisiae* possono perciò provenire dal mosto o essere sintetizzati dal lievito stesso. Oltre a costituire i principali componenti strutturali delle membrane, fungono anche da cofattori o attivatori degli enzimi associati alla membrana e rivestono un ruolo fondamentale nei meccanismi di comunicazione cellulare. L'incremento della quantità cellulare di acidi grassi insaturi (palmitoleico e oleico), di ergosterolo (in rapporto elevato rispetto ai fosfolipidi), e di acidi grassi a lunga catena, sono fattori responsabili della resistenza all'etanolo e agli stress in generale. Per la produzione di lipidi è necessario che i lieviti siano in presenza di adeguate concentrazioni di ossigeno molecolare, come avviene nei primi 2-3 giorni di fermentazione. Durante la fermentazione le condizioni prolungate di anaerobiosi rendono impossibile la desaturazione degli acidi grassi e comportano, di conseguenza, l'arresto della biosintesi lipidica con

rilascio nel mezzo di intermedi (acidi grassi saturi a corta e media catena) ad azione tossica nei confronti delle cellule (Bardi L. *et al.* 1999).

SCOPI DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un ampio progetto pluriennale che prevede lo studio del comportamento delle popolazioni microbiche (lieviti e batteri) presenti nella vinaccia destinata alla produzione di grappa durante le fasi critiche di stoccaggio. Non essendovi in letteratura studi specifici in questo campo, l'obiettivo è stato quello di indagare le potenzialità di ceppi destinati ad essere impiegati come starter microbici nella produzione di questo distillato tipicamente italiano. Mediante metodi convenzionali e molecolari appositamente messi a punto o presenti in letteratura, è stato possibile innanzitutto fornire un quadro delle specie e dei ceppi di lieviti che evolvono naturalmente durante l'insilamento. La sperimentazione successiva ha previsto la refrigerazione della vinaccia durante il tragitto alla distilleria, mentre in fase di conservazione una parte è stata sottoposta ad acidificazione con lo scopo di rallentare l'attività microbica, in particolare lo sviluppo dei batteri che generalmente apportano difetti al materiale vegetale. Un totale di 200 lieviti isolati a 4 e 15 giorni di stoccaggio, sono stati sottoposti ad analisi genetiche che hanno consentito di identificare gli appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* e caratterizzarli a livello di ceppo, confermando la dominanza di questa specie sulle altre meno alcoligene presenti all'inizio.

Da una collezione di circa 1000 ceppi isolati nel corso di queste sperimentazioni, ne sono stati scelti 104 in base alla loro provenienza da vinacce di diverso tipo (da uva Moscato o Prosecco) oppure per il tipo di trattamenti eseguiti in fase di stoccaggio (acidificazione della vinaccia al momento dell'insilamento, conservazione a temperature superiori di 35°C, insilamento immediato in cantina prima del trasporto in distilleria). Sono stati quindi sottoposti ad una serie di prove fisiologiche per valutare le caratteristiche tecnologiche e di qualità del lievito, che maggiormente influiscono sulla qualità prodotto finale. Sono state indagate le *performance* di fermentazione in mosto sintetico (vigore fermentativo, durata della fermentazione, produzione di schiuma), la resistenza all'antisettico anidride solforosa, la produzione di idrogeno solforato. Inoltre è stata valutata, tramite saggio fluorimetrico, l'attività β -glucosidasi, principale responsabile della liberazione dei composti volatili

aromatici dai precursori glicosidici. Infine, poiché questa attività è stata di recente correlata alle esoglucanasi di lievito, sono stati costruiti mutanti nulli per due geni che le codificano, con lo scopo di valutare l'effetto sul livello di attività enzimatica.

2. Caratterizzazione della microflora naturale di lieviti isolati da vinaccia

2.1 INTRODUZIONE

Come si è detto in precedenza la vinaccia, il materiale vegetale impiegato per la produzione della grappa, è costituita dalle parti solide che rimangono dopo la pigiatura dell'uva e la successiva separazione del mosto durante il processo di vinificazione, e contiene bucce, vinaccioli, e in alcuni casi raspi. Dopo la separazione del mosto, la vinaccia viene solitamente pressata per drenare il liquido in eccesso, quindi trasportata in distilleria. Le vinacce provenienti da uve rosse che hanno già parzialmente fermentato a contatto col mosto, possono essere distillate in pochi giorni, mentre quelle vergini provenienti da varietà a bacca bianca e immediatamente separate dal mosto, sono praticamente prive di alcol. E' necessario pertanto un periodo di stoccaggio in cui vengono lasciate fermentare. Durante questo periodo si verifica lo sviluppo di un'abbondante microflora indigena dovuto alle condizioni favorevoli per la crescita quali la presenza di zuccheri e composti nutritivi, il valore di pH relativamente più alto di quello del mosto, l'aumento delle temperature connesso alla fermentazione in atto (Corich V. *et al.* 2007). La degradazione degli zuccheri in alcol etilico ed altri composti che possono influenzare la qualità del prodotto finito sono condotte principalmente dai lieviti.

Questa parte preliminare del lavoro rappresenta il primo studio microbiologico condotto sulla fermentazione di vinaccia italiana impiegata per la produzione di grappa. Esso ha portato alla caratterizzazione con metodi molecolari delle dinamiche di popolazioni naturali di lievito, sia a livello di specie che di ceppo, che si sviluppano durante la fermentazione di vinacce ottenute da due varietà d'uva bianca tipica della regione Veneto, e rappresenta un punto di partenza per lo sviluppo di strategie per il miglioramento della qualità del prodotto finale, e per la selezione di potenziali ceppi di lievito da utilizzare come colture starter in questo tipo di fermentazione. Uno studio simile è stato condotto sulla vinaccia utilizzata però per la produzione di un tipico distillato portoghese (De Pina C. *et al.* 1999), monitorando l'andamento della popolazione di lieviti e batteri lattici durante il periodo di insilamento.

2.1.1 CARATTERIZZAZIONE E IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E CEPPI DI LIEVITO ENOLOGICI

Tradizionalmente i lieviti sono stati identificati e caratterizzati in base alle loro proprietà morfologiche, fisiologiche e biochimiche. Queste caratteristiche possono però variare all'interno della stessa specie (Barnett J.A. *et al.*, 1990) in base alle condizioni del mezzo colturale o durante il processo vegetativo, e forniscono risultati poco affidabili.

2.1.1.1 Metodi molecolari

Per superare tutte le incertezze e le difficoltà, i ricercatori hanno sviluppato una tassonomia molecolare che è in grado di differenziare i microrganismi a livello di specie e talvolta anche di ceppo. Questi metodi comprendono: l'elettroforesi tramite SDS-PAGE delle proteine totali, il profilo degli acidi grassi volatili mediante gas cromatografia, il profilo delle tossine killer, la marcatura genetica dei ceppi per la resistenza a certi antibiotici. Un'altra tecnica basata sull'immunofluorescenza e che richiede la produzione di anticorpi specifici per i diversi ceppi, ha permesso l'identificazione di alcuni ceppi di lievito del vino (Bouix M., 1990). I più utilizzati si basano però sull'analisi degli acidi nucleici: la determinazione della percentuale in guanina e citosina (GC%), l'ibridazione DNA-DNA, l'analisi del cariotipo mediante elettroforesi in campo pulsato, l'analisi del polimorfismo del DNA mitocondriale e genomico mediante l'uso di endonucleasi di restrizione (RFLP), e vari metodi basati sulla PCR.

PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Il principio della PFGE è stato applicato per la prima volta ai lieviti da Schwartz e Cantor (1984) e rappresenta tuttora un metodo molto utilizzato per l'identificazione interspecifica (Budroni M., 2001).

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 le diverse specie di lieviti e talvolta anche differenze a livello di ceppo; in genere il limite per l'appartenenza alla stessa specie è rappresentato dall'85 % di omologia

dei profili (Oda *et al.*,1999). La PFGE ha permesso recentemente di dimostrare che all'interno del genere *Saccharomyces* si può distinguere la specie *cerevisiae* dalla specie *bayanus*, e in particolare, che le “varietà *bayanus* e *uvarum*” rappresentano due entità ben differenziabili (Naumov G.I. *et al.*, 2000).

Questo metodo, abbastanza rapido e poco costoso, ha lo svantaggio di non consentire di individuare mutazioni puntiformi o piccole lesioni, quanto soprattutto grossi cambiamenti genetici (Pramateftaki P.V. *et al.*, 2000).

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 è possibile effettuare direttamente il taglio sul DNA totale del lievito. Questa tecnica sfrutta la diversa composizione in guanina e citosina del DNA mitocondriale (17% circa) di *S. cerevisiae* rispetto al DNA nucleare (39-41%), e la maggiore velocità di mutazione del DNA mitocondriale rispetto a quello nucleare. Utilizzando enzimi di restrizione che riconoscono siti ricchi in guanina e citosina si ottengono frammenti di dimensioni maggiori provenienti dal DNA mitocondriale che migrano più lentamente rispetto a quelli provenienti dal DNA nucleare. Confrontando i profili elettroforetici è possibile identificare ceppi diversi (Querol A. *et al.*, 1996).

L'analisi del DNA mitocondriale è il sistema di caratterizzazione genetica più utilizzato per identificare ceppi appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* in particolare impiegando *HinfI* come endonucleasi di restrizione (Lopez V. *et al.*, 2003; Shuller D. *et al.*, 2004).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Questa tecnica utilizza corte sequenze casuali di nucleotidi (5-15 bp) come primer che a basse temperature di annealing ibridano con diversi loci del DNA genomico (Williams J. *et al.*, 1990). 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. La reazione va quindi standardizzata per aumentare la riproducibilità dell'esperimento (Budroni M. *et al.*, 2000).

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

Amplificazione della regione ITS

Questo sistema di identificazione prende in considerazione le informazioni ricavate analizzando la regione di DNA codificante l'RNA ribosomale che per le sue caratteristiche funzionali, risulta particolarmente conservata tra gli organismi viventi. In *S. cerevisiae* questa zona è presente nel cromosoma XII, ripetuta in un centinaio di copie poste in tandem, (Johnston M. *et al* 1997), e viene trascritta in un unico tratto di dimensioni 35S. E' suddivisa in 3 unità principali codificanti le molecole di RNA che vanno a costituire le seguenti subunità del ribosoma:

- 25S (subunità grande, LS), con dimensioni del frammento di 3392 bp,
- 18S (subunità piccola, SS), con dimensioni del frammento di 1799 bp,
- 5,8S, con dimensioni del frammento di 155 bp.

A queste subunità si deve aggiungere un componente (5S) il cui RNA, di 120 bp, è codificato da una regione indipendente sul filamento complementare. Compreso tra le regioni SS rDNA e LS rDNA si trova un tratto, 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 18 e 25S (Cai J. *et al* 1996; James S.A. *et al.*, 1996; Kurtzman C.P., 1993). Questa variabilità è estremamente alta, se si considerano organismi appartenenti a specie diverse, mentre scende drasticamente quando si considerano ceppi della stessa specie.

A questo approccio si fa quasi sempre seguire l'analisi dei profili di restrizione ottenuti tagliando i frammenti amplificati con endonucleasi opportunamente scelte, in grado di discriminare in modo più preciso a livello di specie.

Altri approcci basati sulla tecnica PCR

Varie sono le applicazioni della PCR sviluppate con l'obiettivo di risolvere problemi di classificazione e caratterizzazione.

Una di esse è l'AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), tecnica basata sull'amplificazione selettiva tramite PCR di frammenti di restrizione derivanti da digestione del DNA totale. L'efficacia di tale approccio è stata già dimostrata in numerosi sistemi biologici; nel caso dei lieviti ci sono studi che rivelano come essa sia in grado di identificare isolati a livello di specie e di ceppo (De Barros Lopes M. *et al.*, 1999).

L'utilizzo di primer complementari a regioni di genoma opportunamente scelte apre inoltre tutta una serie di altre possibilità. Sono stati sperimentati, ad esempio, primer complementari ai siti di splicing presenti in corrispondenza degli introni di *S. cerevisiae*. Essi danno origine a profili di bande capaci di distinguere in particolare fra le specie appartenenti al gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto*, ed è dimostrato che la risoluzione di tale tecnica può spingersi a livello intraspecifico. Poiché le sequenze introniche di splicing (ISS) sono abbastanza conservate, questi primer teoricamente possono essere utilizzati per la caratterizzazione di tutti i lieviti (De Barros Lopes M. *et al.*, 1998).

Similmente sono stati sviluppati primer complementari a regioni di DNA note come mini e microsatelliti, o SSR (simple sequence repeats): esse consistono in ripetizioni dirette in tandem di corti motivi di DNA, di solito inferiori alle 10 paia di basi. 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; combinazioni di tali primer sono risultati efficaci a fini della differenziazione (Lieckfeldt E. *et al.*, 1993). 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; inoltre i risultati vengono espressi oggettivamente come lunghezze degli alleli, potendo così essere trattati in modo più quantitativo rispetto alle immagini dei profili di bande, come nel caso della RAPD o dell'AFLP (González-Techera A. *et al.*, 2001).

Largamente utilizzate come bersaglio di amplificazione tramite PCR sono le regioni altamente ripetute del genoma di *S. cerevisiae*, note come interdelta: gli elementi δ sono spesso associati alla regione LTR (long terminal repeats) fiancheggiante i retrotrasposoni TY1 e TY2 nei lieviti, ma possono anche essere separati. Sono stati descritti circa 300 elementi δ 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 F. *et al.*, 1994).

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 V. *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 (Hierro N. *et al.*) 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

2.2.1.1 Ceppi di collezione

Per la messa a punto dei metodi di caratterizzazione sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Specie microbica	Ceppo	Provenienza*
<i>Saccharomyces sensu stricto</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1171 (ATCC 18824).	CBS
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 380	CBS
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DSM 6580 (ATCC 12752)	DSMZ
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CBS 432	NRRL
Specie di interesse enologico		
<i>Hanseniasspora guilliermondii</i>	CBS 465	CBS
<i>Hanseniasspora uvarum</i>	CBS 104	CBS
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CBS 817	CBS
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CBS 5833	CBS

*CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany.

2.2.1.2 Isolati da vinaccia

Sono stati analizzati in totale 414 isolati così suddivisi:

- M-T₀-NI dal 21 al 70: campioni provenienti da vinaccia di Moscato non inocolata, prelevati al tempo T₀ (inizio stoccaggio).
- M-T₄-NI da 1 a 70: campioni provenienti dalla medesima vinaccia prelevati al tempo T₄ (dopo 4 giorni).
- M-T₁₅-NI da 1 a 70: campioni provenienti dalla medesima vinaccia prelevati al tempo T₁₅ (fine stoccaggio).
- P-T₀-NI da 26 a 70: campioni provenienti da vinaccia di Prosecco non inocolata, prelevati al tempo T₀.
- P-T₄-NI da 1 a 70: campioni provenienti dalla medesima vinaccia, prelevati al tempo T₄.
- P-T₁₅-NI da 1 a 70: campioni provenienti dalla medesima vinaccia prelevati al tempo T₁₅.

2.2.2 MEZZI COLTURALI E CONDIZIONI DI CRESCITA

2.2.2.1 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.

2.2.2.2 Mezzi di propagazione ordinaria

YM - Yeast and Mould (Wickerham L.J., 1951)

Dosi per 1 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 20 g/l di Bacto Agar (Difco).

2.2.2.3 Soluzioni

Soluzione ringer (1/4 strength) (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.

2.2.2.4 Condizioni di crescita

I ceppi di lievito sono stati cresciuti in liquido in provette tipo Falcon da 50 ml contenenti 10ml di mezzo YM. La coltura è stata sottoposta ad una temperatura di 30 °C con agitazione (80-100 rpm/min) per 24 h.

I ceppi di lievito cresciuti su piastra sono stati incubati a 25 °C per 4-5 giorni.

2.2.3 CAMPIONAMENTO E ISOLAMENTO DI LIEVITI DA VINACCIA

2.2.3.1 Campionamento

Le vinacce sono state collezionate durante la vendemmia 2002, immediatamente dopo pressatura, da due cantine della regione Veneto (Italia). Sono state scelte due varietà di uva bianca, tipiche di due diverse località a circa 100 km di distanza l'una dall'altra, Prosecco (*Vitis vinifera* cv. Prosecco, raccolta a Conegliano, Treviso) e Moscato (*Vitis vinifera* cv. Moscato, proveniente dai Colli Euganei, Padova). Per l'allestimento dell'esperimento, aliquote da 15 kg di vinaccia non solfitata sono stati trasferiti in sacchi di plastica chiusi con un tappo spugnoso per consentire il rilascio di gas in eccesso durante la fermentazione. Ciascun sacco è stato poi posto in un secchio di polipropilene e stoccato ad una temperatura controllata di 20°C. La temperatura di fermentazione è stata continuamente monitorata mediante un termometro a sonda (SPYTalk, SPYco SA, Argenteuil, Francia) introdotto nei sacchi e in grado di registrare la temperatura del campione ogni 5 minuti. I dati raccolti sono stati analizzati mediante apposito software.

Il primo campionamento è stato effettuato all'inizio dello stoccaggio (T_0) subito prima di introdurre le vinacce nei sacchi, raccogliendo il materiale vegetale da punti differenti della massa. Per i successivi campionamenti, dopo 4 (T_4) e 15 (T_{15}) giorni è stato aperto un secchio per ogni tipo di vinaccia. Ogni sacco è stato aperto solo una volta e svuotato dopo il prelievo.

2.2.3.2 Isolamento

Venti grammi di vinaccia sono stati raccolti casualmente da ogni sacco, e dispersi in 200 ml di soluzione sterile di Ringer e dopo le opportune diluizioni decimali, piastrati in piastre di YM agar (Oxoid, Milano, Italia) con aggiunta di 25 µg/ml di ossitetraciclina (Sigma, Milano, Italia) per contrastare la crescita batterica, e incubate a 25°C per 3 giorni. Per ciascun campione sono state eseguite tre conte indipendenti. Da ciascuna tesi sono state casualmente prelevate 70 colonie, purificate a colonia pura ristricciando due volte su piastre fresche di YM, stoccate in glicerolo al 20% e conservate a -80°C per successive analisi.

2.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE

Per l'estrazione del DNA totale di lievito è stato utilizzato il seguente protocollo.

Lisi cellulare meccanica

Il pellet cellulare utilizzato per l'estrazione del DNA totale è stato ottenuto mediante la seguente procedura: la patina ottenuta da una coltura cresciuta in piastra contenente terreno YM solido per 48 h a 30°, è stata recuperata in una provetta tipo Eppendorf da 2 ml contenente 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 µl di TE (50mM Tris-HCl, 20mM EDTA a pH 7.4) e trasferite in una provetta da 2 ml contenente 0.3 g di palline di vetro (Glass Beads, diametro 425-600 micron, Sigma G-9268). La sospensione è stata agitata con vortex per 3 minuti.

Successivamente sono stati aggiunti ai campioni 50 µl di SDS 10%, incubati in bagnetto caldo a 65°C per 30 minuti. Al termine sono stati aggiunti 200 µl di acetato di potassio 5M e si è lasciato 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 centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti, il pellet è stato asciugato per 1 h a 37°C.

I campioni sono stati risospesi in 50 µl di acqua sterile, sono stati aggiunti di 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.

2.2.5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'AMPLIFICAZIONE

I campioni conservati in glicerolo a - 20°C sono stati piastrati su terreno solido YM e incubati a 30°C overnight. Una colonia è stata risospesa in 100 µl di acqua sterile e brevemente vortexata.

2.2.6 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

Le amplificazioni via *Polimerase Chain Reaction* sono state condotte utilizzando il termociclature Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

I primer, forniti in forma liofilizzata dalla ditta MWG Biotech, sono stati sciolti in acqua sterile alla concentrazione di 100 μ M, ponendo particolare attenzione alle operazioni di risospensione e centrifugando 5 minuti a 14000 rpm in una microcentrifuga ogni qualvolta sono state prelevate aliquote destinate alle amplificazioni.

2.2.6.1 Amplificazione mediante analisi RAPD

Il primer utilizzato è M13: 5' GAGGGTGGCGGTTCT 3' (Huey e Hall, 1989)

Le prove di PCR sono state eseguite in volumi di reazione di 50 μ l.

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

Componenti	Concentrazione finale
Primer M13	1 μ M
dNTPs	0,2 mM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,1 U/ μ l
Tris-HCl (pH 8,3)	10 mmol/l
KCl	50 mmol/l
Sospensione cellulare	5 μ l

Il protocollo termico utilizzato è riportato di seguito:

Programma di amplificazione		
Ciclo1 (1X)	95°C	5.30'
Ciclo2 (35X)	94°C	1'
	45°C	20''
	72°C	0,5°C/sec
Ciclo3 (1X)	72°C	2'
Ciclo4 (1X)	4°C	∞

Il primo ciclo a 95°C per 5' consente la lisi delle cellule di lievito e quindi il rilascio degli acidi nucleici in soluzione.

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

I primer utilizzati sono riportati di seguito:

Primer	Lunghezza	Sequenza (5'-3')	Fonte
ITS1	19 bp	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White T.J. <i>et al.</i> ,1990
ITS4	20 bp	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White T.J. <i>et al.</i> ,1990

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

Componenti	Concentrazioni finali
Primer fw	2 μ M
Primer rv	2 μ M
dNTPs	0,05 mM (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi	0,1 U/ μ l
Buffer 10X	1X
Sospensione cellulare	5 μ l

Il protocollo termico utilizzato per amplificare la regione ITS è riportato in tabella:

Programma di amplificazione		
Ciclo1 (1X)	94°C	2'30''
Ciclo2 (30X)	94°C	30''
	56°C	30''
	72°C	30''
Ciclo3 (1X)	72°C	5'
Ciclo4 (1X)	4°C	∞

2.2.6.2 Condizioni di amplificazione della regione codificante l'actina

I primer utilizzati sono riportati di seguito:

Primer	Lunghezza	Sequenza (5'-3')	Fonte
Act1-F	20 bp	CTCGTGCTGTCTCCCATCT	Cadez <i>et al.</i> , 2006
Act1-R	20 bp	ACGACGAAAGTGGTCCATCT	Cadez <i>et al.</i> , 2006

Il protocollo termico utilizzato per amplificare la regione codificante l'actina è riportato in tabella:

Programma di amplificazione		
Ciclo1 (1X)	94°C	5'
Ciclo2 (35X)	94°C	30''
	56°C	30''
	72°C	2''
Ciclo3 (1X)	72°C	7'
Ciclo4 (1X)	4°C	∞

2.2.7 RESTRIZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE

Le digestioni sono state eseguite in un volume di reazione di 15 µl contenenti 20 unità dell'enzima *HinfI* (Amersham Bioscience) e 250-300 ng di DNA totale. L'incubazione è stata condotta a 37°C per 3 h. Successivamente i campioni sono stati conservati a -20°C.

2.2.8 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. La corsa è stata 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 120 V.

Sono state utilizzate le seguenti concentrazioni di agarosio:

- 1,5% per visualizzare il frammento amplificato ottenuto con la coppia di primer ITS1/ITS4, con la coppia Act1-F/Act1-R e per i profili ottenuti mediante RAPD-PCR,
- 0,7% per quantificare il DNA genomico,
- 1% per separare frammenti del DNA mitocondriale digeriti con *HinfI*,

Dopo la corsa i gel sono stati osservati al transilluminatore UV e fotografati con il sistema EDAS (Kodak).

2.2.9 SEQUENZIAMENTO DI DNA

Dopo la quantificazione su gel d'agarosio i prodotti di PCR sono stati opportunamente diluiti e per ciascuno, un'aliquota contenente 20ng di DNA (2X)

è stata mescolata con un'aliquota contenente 6,4 pmoli di primer (2X) in una microprovetta da 0,2 µl. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad essiccazione e consegnati al Servizio Sequenziamento del CRIBI (Università di Padova).

2.2.10 PROGRAMMI PER L'ANALISI DEL DNA

Per l'analisi delle sequenze nucleotidiche sono stati utilizzati software commerciali della ditta DNASTAR (Madison, WI, USA) ed utility per l'analisi di similarità di sequenza (BLAST e CLUSTALW), disponibili in rete presso i principali server di biologia molecolare. L'identificazione delle specie è stata fatta confrontando l'allineamento BLASTN delle sequenze ottenute con quelle presenti nel database pubblico GenBank. Per l'attribuzione tassonomica è stato considerato un minimo di similarità di sequenza del 97 %.

Per l'analisi del DNA mitocondriale è stato utilizzato il programma GelComparII V. 4.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), utilizzando il coefficiente di Dice (Dice, 1945).

2.3 RISULTATI

2.3.1 ISOLAMENTO DEI LIEVITI E CONTA MICROBICA

L'analisi quantitativa della popolazione di lieviti durante lo stoccaggio della vinaccia è stata effettuata sia per Moscato che Prosecco, a tre tempi, all'inizio dello stoccaggio (T_0), dopo 4 (T_4) e 15 giorni (T_{15}), come riportato in tabella 2.1. Per ogni campione di vinaccia si è proceduto all'isolamento dei lieviti su terreno YM agarizzato, addizionato con 25 µg/ml di ossitetraciclina per contrastare lo sviluppo dei batteri. La popolazione di lieviti nelle vinacce di Moscato e di Prosecco non è stata significativamente diversa al tempo T_0 ($p > 0,05$). A questo tempo, il valore di pH delle vinacce di Moscato era di 0,55 unità più alto e il contenuto di residuo zuccherino è stato molto elevato se paragonato a quello delle vinacce di Prosecco. Dopo 4 giorni di fermentazione, la popolazione è incrementata considerevolmente in entrambe le vinacce, ma con un aumento significativamente più marcato in Moscato che in Prosecco ($p < 0,05$), ed è rimasta a livelli simili fino al quindicesimo giorno di insilamento.

Tipo di vinaccia	pH	T_0	Lieviti (ufc/g vinaccia)	Temperatura (°C)	Zucchero (g/100g vinaccia)	Alcol (g/100g vinaccia)
Moscato	4.43		$3.80 \times 10^5 \pm 1.37 \times 10^5$ ^a	20	15.50	0
Prosecco	3.88		$6.45 \times 10^5 \pm 3.92 \times 10^5$ ^a	18	8.24	0
Moscato		T_4	$3.27 \times 10^7 \pm 7.02 \times 10^6$ ^c	29.5	8.58	4.18
Prosecco			$1.22 \times 10^7 \pm 1.17 \times 10^6$ ^b	25	1.65	3.96
Moscato		T_{15}	$3.00 \times 10^7 \pm 7.76 \times 10^6$ ^c	21	0	10.56
Prosecco			$1.83 \times 10^7 \pm 1.10 \times 10^7$ ^{b,c}	21	0	4.76

Tab 2.1 Evoluzione della popolazione di lieviti, temperatura, contenuto in zucchero ed alcol durante lo stoccaggio della vinaccia. Le medie indicate con diverse lettere in apice sono significativamente differenti.

Dagli scarsi dati presenti in letteratura, sembra che gli zuccheri siano rapidamente e completamente degradati dai lieviti naturalmente presenti nel materiale vegetale (Corich V. *et al.*, 2007), come evidenziato dall'andamento della temperatura durante lo stoccaggio, correlato alle attività metaboliche che hanno luogo all'interno della biomassa. Durante la fermentazione, in entrambe le vinacce, le temperature hanno iniziato ad aumentare rapidamente a partire dal quarto giorno (in Moscato il picco è stato di 4,5 °C più alto) per poi decrescere fino ad

eguagliare la temperatura esterna entro 10 giorni dall'inizio dello stoccaggio (fig. 2.1).

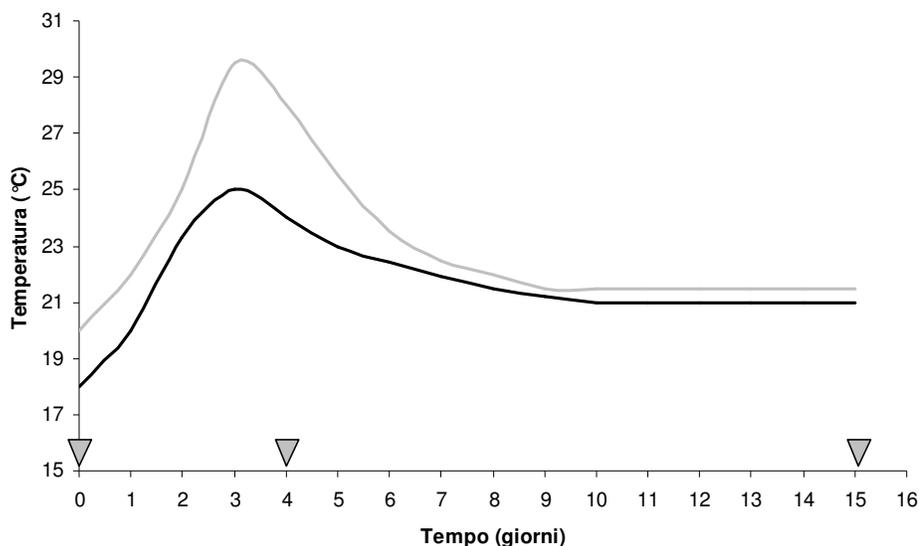


Fig 2.1 Andamento delle temperature della biomassa di vinaccia di Moscato (grigio) e Prosecco (nero). I triangoli rappresentano i tempi di campionamento.

Per questo studio sono state scelte due varietà di vinacce che differiscono tra di loro per alcune caratteristiche chimico-fisiche, in particolare il contenuto in zuccheri e il pH, più alti nella matrice di Moscato, ne riflettono l'elevata attività biochimica, confermata dalle alte temperature raggiunte durante la fermentazione e dalla densità di popolazione significativamente più elevata.

Per quanto riguarda la produzione di alcol, il processo ha rivelato un andamento simile in entrambe le vinacce, come evidenziato dalla stessa quantità di zucchero degradato e di alcol prodotto al tempo T_4 . Dal momento che il contenuto in zuccheri della vinaccia di Moscato è quasi il doppio, la fermentazione si è prolungata per più tempo e la produzione di alcol di conseguenza è stata più elevata. Il contenuto di zuccheri è calato alla stessa velocità nelle vinacce di Moscato e di Prosecco, e dopo 4 giorni di fermentazione sono stati consumati rispettivamente 6,92 e 6,59 g di zucchero/100 g, lasciando 8,58 g /100g in Moscato e solo 1,65 g/100 g nella vinaccia di Prosecco. Gli zuccheri sono stati completamente assimilati dopo 15 giorni in entrambe le vinacce.

2.3.2 IDENTIFICAZIONE SPECIE-SPECIFICA DELLA POPOLAZIONE DI LIEVITI

Un totale di 414 colonie, scelte casualmente dalle piastre di terreno YM, e distribuite equamente per tipo di vinaccia e per tempo di campionamento, sono state esaminate mediante analisi RAPD-PCR utilizzando il primer M13, i loro profili sono stati paragonati con quelli di ceppi tipo di alcune specie generalmente associate con l'uva. Il livello di riproducibilità, testato in 12 corse indipendenti dello stesso ceppo, è stato del 96%.

Relativamente alle vinacce di Moscato, l'analisi dei profili di 70 isolati al T₀ ha evidenziato la presenza di 3 gruppi principali (fig 2.2A) e di due individui isolati. Il cluster *AI* include 50 isolati (con il 66% di similarità) senza alcun ceppo tipo al suo interno, il cluster *AII* (76% di similarità) contiene 12 isolati e il ceppo tipo di *M. pulcherrima*, mentre il cluster *AIII* raggruppa 6 isolati naturali e il ceppo tipo di *H. uvarum* (89% di similarità). Dopo 4 giorni di fermentazione, 67 isolati su 69 (cluster *BI*) si raggruppano con il ceppo tipo di *S. cerevisiae* (75% di similarità), mentre un gruppo di due isolati (cluster *BII*) resta separato rispetto agli altri (fig 2.2B). Infine, al termine della fermentazione (T₁₅), tutti i 69 isolati esaminati raggruppano in un unico cluster (*CI*) con l'80% di similarità, che include il ceppo tipo di *S. cerevisiae* (fig 2.2C).

Nelle vinacce di Prosecco invece l'analisi dei profili di 66 isolati esaminati all'inizio della fermentazione T₀, ha evidenziato la presenza di due gruppi principali (fig 2.3D). Il cluster *DI* comprende 47 isolati naturali che condividono una percentuale di similarità del 76%, in questo caso non è stato incluso nessuno degli 8 ceppi tipo utilizzati mentre il cluster *DII* (82% di similarità) contiene 9 isolati naturali ed il ceppo tipo *T. delbrueckii*. In questa fase di campionamento, sono stati individuati inoltre un cluster con 3 isolati (*DIV*), due gruppi con due isolati ciascuno (*DIII*, *DV*) e tre individui isolati, uno dei quali mostra il 79% di similarità con il ceppo tipo di *M. pulcherrima*.

Dopo quattro giorni di fermentazione (fig 2.3E), 67 isolati su 70 raggruppano nel cluster *EI* avente l'82% di similarità con il ceppo tipo di *S. cerevisiae*, mentre i restanti 3 isolati formano un'ulteriore gruppo (*EII*) con il ceppo tipo di *T. delbrueckii* (84% di similarità).

Infine, dopo 15 giorni di fermentazione, il gruppo più consistente (FI) è costituito da 48 ceppi su 70 isolati totali che hanno, come nel caso del Moscato, l'80% di similarità con il ceppo tipo di *S. cerevisiae*, mentre gli altri 2 gruppi individuati, uno contenente 14 isolati (FII, 80% di similarità) e uno 8 (FIII, 91% di similarità) non includono nessun ceppo di riferimento (fig 2.3F).

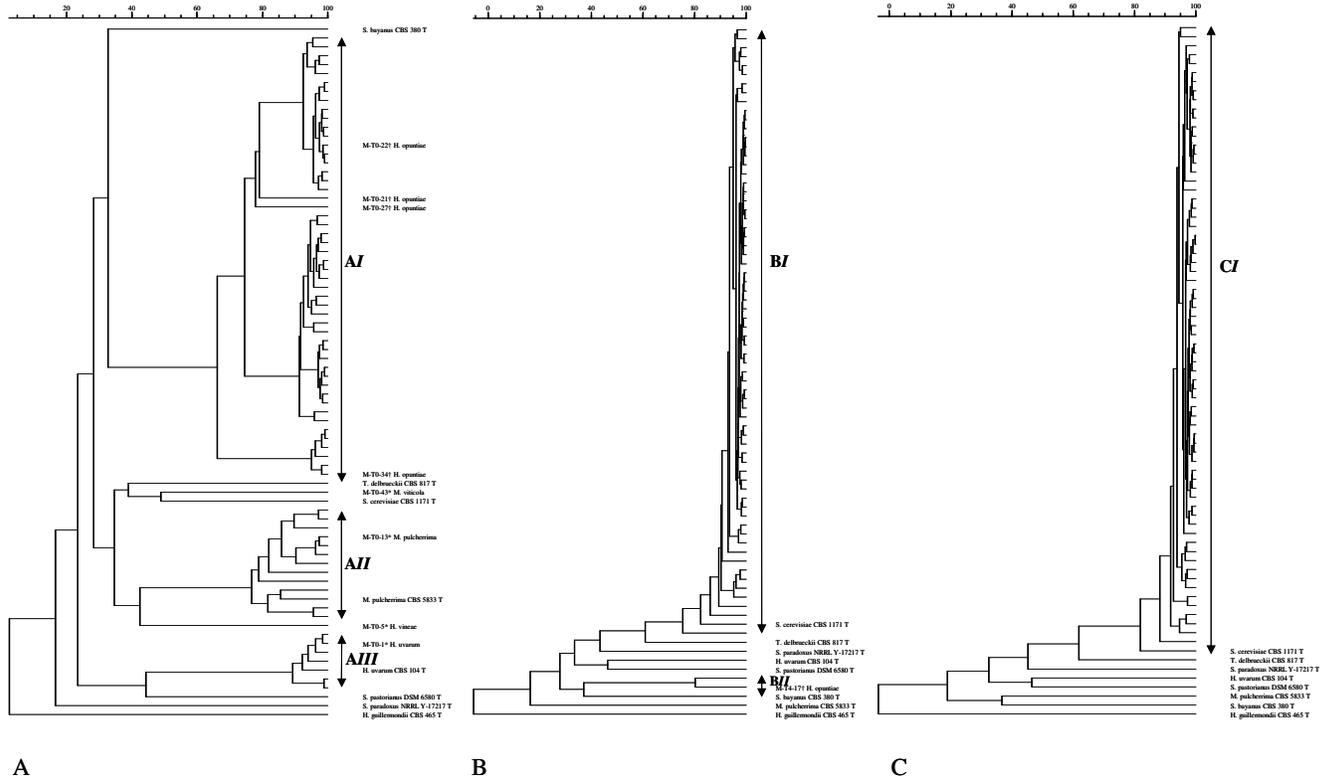


Fig. 2.2. Analisi dei profili RAPD-PCR ottenuti da isolati di lievito. (A) Vinaccia di Moscato al T0; (B) Moscato al T4; (C) Moscato al T15. Le barre in alto indicano la percentuale di similarità dei profili. I ceppi tipo sono indicati (T). (*) Isolati identificati con il sequenziamento della regione ITS. (†) Isolati identificati con il sequenziamento del gene per l'actina. (**) Isolati non sequenziati, ma identificati in base ai loro profili molto simili ad altri sequenziati.

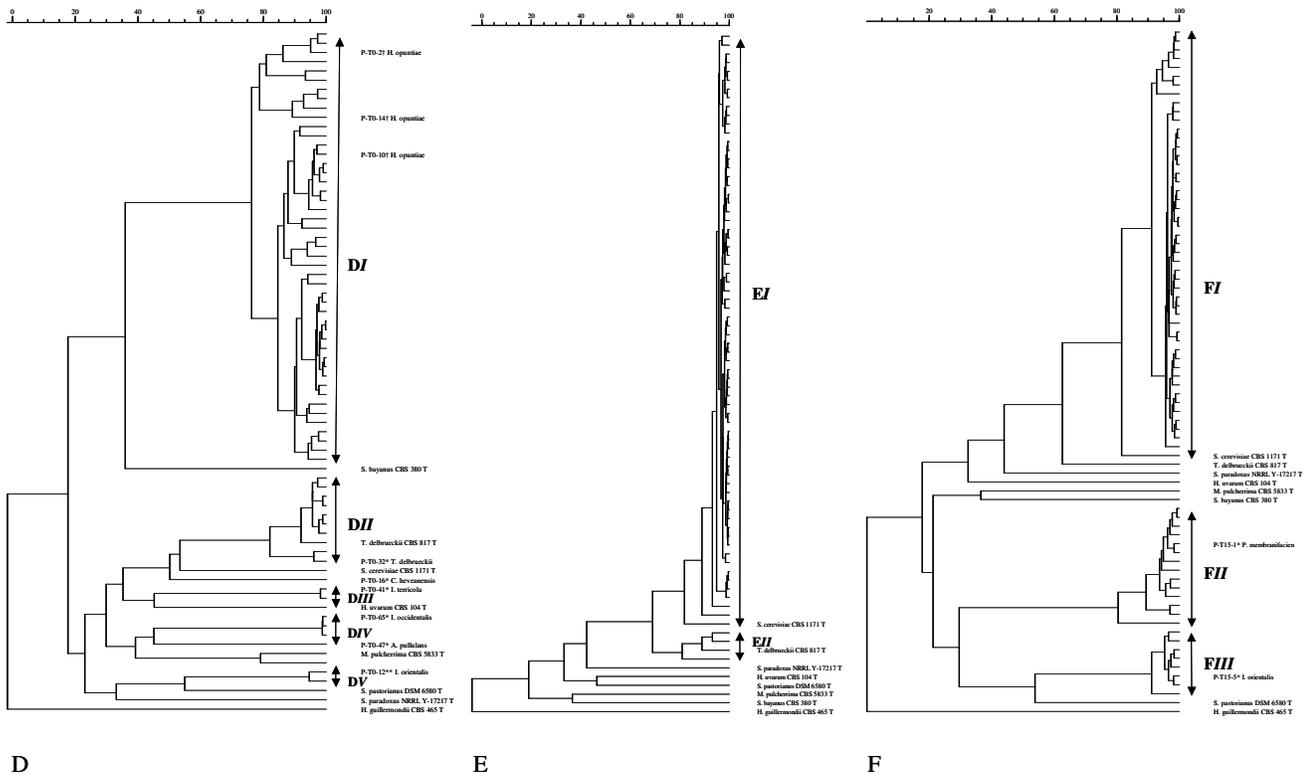


Fig. 2.3. Analisi dei profili RAPD-PCR ottenuti da isolati di lievito. (D) Prosecco al T0; (E) Prosecco al T4; (F) Prosecco al T15. Le barre in alto indicano la percentuale di similarità dei profili. I ceppi tipo sono indicati (T). (*) Isolati identificati con il sequenziamento della regione ITS. (†) Isolati identificati con il sequenziamento del gene per l'actina. (**) Isolati non sequenziati, ma identificati in base ai loro profili molto simili ad altri sequenziati.

Per l'identificazione precisa delle specie, un rappresentante per ciascun gruppo individuato dall'analisi RAPD-PCR è stato sottoposto al sequenziamento della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) la regione di DNA codificante l'RNA ribosomiale. Gli individui sequenziati sono evidenziati con un asterisco nel dendrogramma in fig 3.1, e a lato è riportato il risultato dell'attribuzione tassonomica. Il sequenziamento della regione ITS dei rappresentanti dei cluster *AI* e *DI* ha consentito di identificare questi isolati come appartenenti al genere *Hanseniaspora*.

Poiché i test classici di tipo fisiologico non consentono la distinzione tra le specie appartenenti al genere *Hanseniaspora* e *Kloeckera*, la relazione filogenetica è stata determinata combinando a queste prove, diverse tecniche molecolari: RAPD, analisi delle sequenze D1/D2, dei geni "housekeeping" per l'actina e per il fattore di elongazione (EF-1 α). Alcuni di questi metodi sono stati applicati in questo lavoro per l'attribuzione univoca delle specie. Tutti gli isolati sono in grado di crescere a 37°C, stabilendo senza ambiguità la loro appartenenza al gruppo di specie strettamente imparentate *H. guilliermondii*- *H. lachancei*- *H. opuntiae*- *H. pseudoguilliermondii* (Cadez N. *et al.*, 2006). Il sequenziamento della regione ITS però non si è rivelato un mezzo opportuno per discriminare le specie all'interno di questo gruppo, pertanto gli isolati identificati come *Hanseniaspora* sono stati sottoposti al sequenziamento della regione codificante per il gene dell'actina (Cadez N. *et al.*, 2006), consentendo in questo modo la loro identificazione come *H. opuntiae*. L'attribuzione è stata confermata anche mediante la restrizione della regione ITS con gli enzimi *HinfI* e *MboII* (Cadez N. *et al.*, 2003) e *DraI* (Nisiotou A. e Nychas G., 2007).

All'inizio della fermentazione, la popolazione di lieviti isolati dalle vinacce di Moscato è composta per il 71,4% da *H. opuntiae*, seguita da *M. pulcherrima* (17,1%) e *H. uvarum* (8,6%). Dopo 4 giorni *S. cerevisiae* diventa la specie dominante con il 97% e risulta l'unico lievito presente al termine della fermentazione (100%) (tab 2.2).

Anche nelle vinacce di Prosecco *H. opuntiae* risulta il lievito predominante, con una percentuale del 71,2%, molto simile a quella del Moscato, all'inizio dello stoccaggio, seguita da *T. delbrueckii* (13,6%). Relativamente agli isolati prelevati al T₄, anche nel caso del Prosecco il 95,7% è stato attribuito alla specie *S.*

cerevisiae, ed il restante 4,3% alla specie *T. delbrueckii*. Al termine della fermentazione, è risultato essere ancora una volta la specie dominante, ma in percentuale inferiore (68,6%), mentre gli isolati rimanenti appartengono alla specie *P. membranaefaciens* (20%) e *I. orientalis* (11,4%). Al tempo T₀ la specie *S. cerevisiae* non è stata rivelata né nelle vinacce di Moscato né in quelle di Prosecco.

Specie	Totale	%	Moscato						Prosecco					
			T ₀	%	T ₄	%	T ₁₅	%	T ₀	%	T ₄	%	T ₁₅	%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	251	60.6	—	67	97.1	69	100.0	—	67	95.7	48	68.6		
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99	23.9	50	71.4	2	2.9	—	47	71.2	—	—			
<i>Pichia membranaefaciens</i>	14	3.4	—	—	—	—	—	—	—	14	20.0			
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	13	3.1	12	17.1	—	—	—	1	1.5	—	—			
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	12	2.9	—	—	—	—	—	9	13.6	3	4.3			
<i>Issatchenkia orientalis</i>	10	2.4	—	—	—	—	—	2	3.0	—	8	11.4		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	6	1.4	6	8.6	—	—	—	—	—	—	—			
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	3	0.7	—	—	—	—	—	3	4.5	—	—			
<i>Issatchenkia terricola</i>	2	0.5	—	—	—	—	—	2	3.0	—	—			
<i>Aerobasidium pullulans</i>	1	0.2	—	—	—	—	—	1	1.5	—	—			
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	1	0.2	—	—	—	—	—	1	1.5	—	—			
<i>Hanseniaspora vineae</i>	1	0.2	1	1.4	—	—	—	—	—	—	—			
<i>Metschnikowia viticola</i>	1	0.2	1	1.4	—	—	—	—	—	—	—			
Totale	414	100	70	100	69	100	69	100	66	100	70	100		

Tab 2.2. Distribuzione delle specie di lievito isolate da vinacce a diversi tempi di stoccaggio.

2.3.3 CARATTERIZZAZIONE CEPPPO-SPECIFICA DEI *S. sensu stricto*: ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE

Un totale di 245 isolati, 132 provenienti da vinacce di Moscato e 113 da vinacce di Prosecco, prelevati nei campionamenti T₄ e T₁₅ e identificati come *S. cerevisiae*, sono stati analizzati ulteriormente con lo scopo di identificare la presenza di individui diversi e studiare le dinamiche delle singole popolazioni. Per ottenere, quindi, una caratterizzazione ceppo specifica è stato scelto un metodo presente in letteratura da diversi anni (Querol A. *et al.*, 1996) che prevede l'analisi di profili elettroforetici mediante digestione enzimatica del DNA totale.

Il confronto dei profili di restrizione è stato fatto considerando un valore di similarità del 92% sotto quale i profili sono da considerarsi uguali e quindi gli isolati corrispondenti appartenenti allo stesso ceppo. Questo valore soglia è stato

calcolato dal software GelCompar in base al confronto dell'analisi di tre repliche indipendenti dello stesso isolato.

L'analisi dei profili elettroforetici degli isolati provenienti dalla vinacce di Moscato ha evidenziato la presenza di 39 ceppi diversi al tempo T₄. Il gruppo più numeroso è costituito da 10 isolati che rappresentano il 15,2% della popolazione totale, mentre 27 ceppi sono costituiti da un unico individuo (tab 2.3). Dopo 15 giorni il numero dei ceppi identificati è 37, e il più rappresentato contiene 9 isolati (13,6% della popolazione totale), mentre 28 ceppi sono presenti solo con un individuo. Dieci ceppi sono comuni in entrambi i campionamenti e complessivamente l'analisi del DNA mitocondriale ha rivelato la presenza di 66 ceppi nelle vinacce di Moscato, 19 presenti con due o più isolati e 47 con un solo individuo.

Considerando il Prosecco, al tempo T₄ sono stati ottenuti 12 diversi ceppi, il più rappresentato dei quali comprende 42 isolati (62,7% della popolazione totale di lieviti), mentre 8 ceppi sono presenti con un unico individuo. Al tempo T₁₅ il numero totale dei ceppi è 16, con il gruppo più consistente costituito da 16 individui (34,8% della popolazione), mentre 10 ceppi sono rappresentati singolarmente. Valutando entrambi i tempi di campionamento T₄ e T₁₅, è stato trovato un totale di 23 ceppi differenti, 7 dei quali rappresentati da almeno due isolati e 16 con un unico individuo, e cinque ceppi comuni.

Dal confronto dei lieviti isolati dai due tipi di vinaccia, solo due sono comuni ad entrambi gli ambienti, il ceppo P2, riscontrato 12 volte in Prosecco e una in Moscato e il ceppo M1, presente una volta nelle vinacce di Moscato ed una in quelle di Prosecco.

Moscato						
Ceppo	Isolati totali	%	Isolati at T ₄	%	Isolati at T ₁₅	%
M1	19	14.4%	10	15.2%	9	13.6%
M2	11	8.3%	5	7.6%	6	9.1%
M3	10	7.6%	3	4.5%	7	10.6%
M4	8	6.1%	3	4.5%	5	7.6%
M5	4	3.0%	2	3.0%	2	3.0%
M6	4	3.0%	3	4.5%	1	1.5%
M7	3	2.3%	2	3.0%	1	1.5%
M8	3	2.3%	3	4.5%		—
M9	3	2.3%		—	3	4.5%
M10	2	1.5%	1	1.5%	1	1.5%
M11	2	1.5%	1	1.5%	1	1.5%
M12	2	1.5%	1	1.5%	1	1.5%
M13	2	1.5%	2	3.0%		—
M14	2	1.5%	2	3.0%		—
M15	2	1.5%	2	3.0%		—
M16	2	1.5%	2	3.0%		—
M17	2	1.5%		—	2	3.0%
M18	2	1.5%		—	2	3.0%
M19	2	1.5%		—	2	3.0%
Isolati singoli	47	36.0%	27		28	
Ceppi totali	66		39		37	
Isolati totali	132		66		66	

Prosecco						
Ceppo	Isolati totali	%	Isolati at T ₄	%	Isolati at T ₁₅	%
P1	58	50.9%	42	62.7%	16	34.8%
P2	12	10.5%	6	9.0%	6	13.0%
P3	9	7.9%	6	9.0%	3	6.5%
P4	9	7.9%	5	7.5%	4	8.7%
P5	5	4.4%		—	5	10.9%
P6	2	1.8%	1	1.5%	1	2.2%
P7	2	1.8%		—	2	4.3%
Isolati singoli	16	14.0%	8		10	
Ceppi totali	23		12		16	
Isolati totali	113		67		46	

Tab. 2.3 Presenza e distribuzione dei ceppi di *S. cerevisiae* determinata mediante analisi del DNA mitocondriale. I ceppi aventi due o più isolati sono identificati con una sigla (M1-M19 per Moscato, P1-P7 per Prosecco). I ceppi rappresentati da un solo isolato sono raggruppati nella categoria “isolati singoli”.

Nella vinaccia fresca sono presenti sia lieviti sia batteri ma quest'ultima componente della microflora generalmente influisce con la sua attività sul materiale vegetale a tempi prolungati di campionamento (Da Porto C., 2002; De

Pina e Hogg, 1999). Pertanto si può affermare che durante i primi giorni di insilamento, le trasformazioni biochimiche, correlate soprattutto all'attività fermentativa, siano compiute dai lieviti.

E' interessante notare come all'inizio dello stoccaggio, nella vinaccia fresca, il lievito *S. cerevisiae* sia presente sotto il limite di rilevamento sia in Moscato che in Prosecco, mentre sono abbondanti altre specie, quali *Hanseniaspora*, *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* trovate anche nei primi giorni di fermentazione dei mosti e comuni sugli acini d'uva. Sono stati rilevati in minime quantità anche alcuni lieviti (*Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Rhodotorula*) comuni in altri tipi di frutto sempre a basse concentrazioni (Fleet G., 2003; Nisiotou e Nychas, 2007).

Dalle analisi effettuate è emerso un risultato particolarmente interessante in relazione al genere *Hanseniaspora*, maggiormente rappresentato sugli acini d'uva. In questo studio è stata confermata la presenza del genere *Hanseniaspora* come dominante all'inizio della fermentazione, mentre *H. uvarum* costituisce solamente il 10% dell'intera popolazione di *Hanseniaspora* in Moscato, ed è sotto il limite rivelazione nelle vinacce di Prosecco. La specie dominante è risultata invece *H. opuntiae*, che costituisce l'88% e il 100% degli isolati di *Hanseniaspora* rispettivamente nelle vinacce di Moscato e di Prosecco. Nonostante questa specie sia stata recentemente associata all'ambiente vigneto (Nisiotou e Nychas, 2007), questo lavoro rappresenta la prima prova della sua presenza significativa nell'uva. La stessa situazione, che è stata registrata in due ambienti situati a notevole distanza tra di loro, escludendo perciò la possibilità di un evento "localizzato", potrebbe probabilmente essere spiegata con la recente descrizione di questa specie (Cadez N. *et al.* 2003).

I dati riguardanti le dinamiche delle popolazioni di lievito dimostrano che, durante lo stoccaggio, la vinaccia va incontro a fermentazione naturale ad opera di una successione di specie di lieviti che porta alla dominanza finale di *S. cerevisiae*.

Dall'analisi RAPD-PCR, nella quale sono state incluse come riferimento le quattro specie principali del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* (Nardi T. *et al.* 2005), appare chiaramente che tutti gli isolati *Saccharomyces* appartengono alla specie *S. cerevisiae*, in quanto gli altri tre (*S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*) generano profili nettamente diversi. Dopo quattro giorni, entrambe le

vinacce risultano essere quasi completamente colonizzate da questi lieviti, rispettivamente con il 97,1% e il 95,7% della popolazione totale in Moscato e in Prosecco. Al tempo T₁₅ la dominanza cresce fino al 100% nel caso del Moscato, mentre in Prosecco compaiono in buona percentuale altre due specie, *P. membranaefaciens* e *I. orientalis*. Queste due specie, i cui generi sono notoriamente correlati dal punto di vista filogenetico (Suzuki M. e Nakase T., 2002), hanno una ridotta o assente capacità fermentativa, mentre possiedono una considerevole attività ossidativa (Fleet G., 2003). Il loro sviluppo durante le ultime fasi dello stoccaggio potrebbe essere favorito dalla progressiva essiccazione della vinaccia dovuta al consumo dell'acqua da parte dei microbi, situazione che può favorire la diffusione dell'ossigeno all'interno della matrice. Il genere *Issatchenkia*, introdotto nella tassonomia dei lieviti nel 1960, comprende organismi che hanno come habitat il vigneto e il grappolo d'uva in particolare, è inoltre filogeneticamente vicino al genere *Pichia*. Mediante studi sulle cinetiche di riassociazione del DNA, è stato possibile dimostrare che *I. orientalis*, è la forma perfetta della ben più nota specie *Candida krusei*, mentre *I. occidentalis*, fino agli anni '70 considerata un ceppo della specie *I. orientalis*, è la specie anamorfa di *Candida morbosa* (Kurtzman C.P. e Fell J.W., 1998).

Al contrario, l'assenza di lieviti non-*Saccharomyces* in Moscato potrebbe essere conseguenza dei suoi più elevati valori di zuccheri e di pH che favorisce una più forte colonizzazione da parte della specie aggressiva *S. cerevisiae*, e dei più alti livelli di alcol (10%) prodotto nelle vinacce dopo 15 giorni, che sfavorisce lo sviluppo dei ceppi non-*Saccharomyces*.

Nonostante l'analisi RAPD-PCR sia frequentemente impiegata per differenziare a livello di ceppo, l'uso del primer M13 si è confermato un metodo rapido ed affidabile per raggruppare gli isolati e per ottenere dati preliminari per la differenziazione delle specie (Foschino et al. 2004). Nel caso dei gruppi di *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima*, è stata osservata eterogeneità nell'amplificazione dei profili, suggerendo che al loro interno sono presenti diversi ceppi. Invece i profili RAPD-PCR all'interno dei cluster di *S. cerevisiae*, si sono sempre rivelati altamente simili tra di loro. Questo ha consentito la loro chiara e univoca attribuzione alla specie *S. cerevisiae* all'interno del gruppo *sensu stricto*, ma non ha consentito alcuna differenziazione a livello di ceppo. L'impiego dell'analisi del

DNA mitocondriale ha permesso una corretta descrizione della variabilità a livello di ceppo.

La popolazione di *S. cerevisiae* isolata dalle vinacce di Moscato presenta una maggiore biodiversità, 66 ceppi contro i 23 del Prosecco. Il ceppo M1 sembra essere il più presente ai tempi T₄ e T₁₅ ma non può essere considerato dominante, dal momento che non supera mai il 15% della popolazione totale di lieviti. Va sottolineato inoltre che permane per l'intera durata del periodo di stoccaggio un buon grado di biodiversità a livello di ceppo, con 39 e 37 diversi ceppi riscontrati rispettivamente al T₄ e T₁₅. Una biodiversità così abbondante può essere spiegata prendendo in considerazione la struttura fisica della vinaccia, un materiale solido nel quale i microrganismi non possono diffondere liberamente, come invece accade durante le fermentazioni in mosto. Infatti, la matrice è costituita da numerose nicchie dove i ceppi di lievito possono vivere separatamente e moltiplicarsi senza la necessità di competere gli uni con gli altri.

Nel caso del Prosecco la situazione appare piuttosto diversa. Il ceppo P1 identificato al T₄ costituisce quasi i due terzi dell'intera popolazione di *S. cerevisiae*. Questo ceppo è evidentemente un buon competitore, diffuso nelle vinacce, anche se a livelli inferiori alla soglia di rilevamento, facilmente adattabile e particolarmente efficiente nella degradazione degli zuccheri. Tuttavia, appena le condizioni diventano meno favorevoli, inizia a perdere dominanza e il suo posto viene preso non da altri ceppi *Saccharomyces*, che rimangono numericamente equivalenti, eccetto il nuovo ceppo P5, quanto piuttosto da altri generi di lieviti. Anche nelle vinacce di Prosecco il numero complessivo di ceppi dei due campionamenti rimane abbastanza stabile, confermando la scarsa mobilità dei microrganismi in questo ambiente. L'elevato livello di variabilità è evidenziato anche dall'alta percentuale di ceppi rappresentati da un solo isolato, compresa tra il 63 e il 76% per tutti i campionamenti in entrambe le vinacce.

E' interessante notare che, paragonando i 132 isolati da Moscato con i 113 dalle vinacce di Prosecco, solo due profili di DNA mitocondriale e quindi due ceppi sono stati trovati in entrambi gli ambienti. Ricordando che la distanza tra i due luoghi di campionamento è di circa 100 km, questo dato giustifica il complessivo livello di biodiversità all'interno e tra i due tipi di vinaccia. Per questo motivo le vinacce fermentate possono essere considerate un' importante riserva per la

selezione di nuovi ceppi in grado di condurre le fermentazioni della vinaccia, pratica ormai consolidata nei processi di vinificazione.

**3. Effetti di trattamenti tecnologici sull'evoluzione
della popolazione di lieviti durante lo stoccaggio
delle vinacce**

3.1 INTRODUZIONE

3.1.1 MODIFICAZIONI CHIMICHE DELLA VINACCIA DURANTE LO STOCCAGGIO

La produzione di una buona grappa dipende in gran parte dalle condizioni di conservazione e fermentazione della vinaccia dal momento in cui essa lascia la cantina fino alla sua distillazione. Lo stoccaggio della vinaccia in distilleria, oltre ad una motivazione logistica, legata all'impossibilità degli impianti di distillare in tempi brevi a causa della grande quantità di materia prima conferita ha due scopi: favorire lo sviluppo di una microflora costituita dai lieviti, principali agenti della trasformazione degli zuccheri in alcol etilico, in grado di produrre inoltre una serie di composti secondari e di modificare le sostanze presenti nella vinaccia, ma dall'altro rallentare lo sviluppo di microrganismi dannosi, batteri e muffe, che possono deteriorare la materia prima con la produzione di sostanze tossiche o sgradevoli influenzando negativamente la qualità del prodotto finale (Corich V. *et al.* 2007).

La vinaccia è un mezzo restrittivo per la crescita dei microrganismi a causa dell'evoluzione chimico-fisica del mezzo, determinata da cambiamenti che gli stessi provocano nella concentrazione di zucchero, legata all'aumento di etanolo, e dalle variazioni di pH, temperatura e presenza di ossigeno. La crescente concentrazione di etanolo agisce da inibente sull'attività del lievito, limita progressivamente l'aumento numerico delle cellule e seleziona le specie di lievito in base alla loro alcoltolleranza. I lieviti cosiddetti apiculati, presenti in gran numero e considerati negativi in quanto poco alcoligeni e formanti alte quantità di acido acetico, sono preponderanti nelle prime fasi della fermentazione quando la concentrazione di etanolo è bassa. I lieviti dotati di maggior alcoltolleranza in assoluto sono invece quelli appartenenti al genere *Saccharomyces*, che dovrebbero quindi essere i responsabili della seconda fase fermentativa in cui si produce il maggior quantitativo di alcol. Anche il controllo della temperatura riveste notevole importanza nell'ottenimento di fermentati di pregio. L'intervallo ottimale per la vitalità del lievito è compreso fra i 15°C e i 30°C. Al di sotto di queste temperature essi riducono la loro attività riproduttiva, che invece viene accelerata al di sopra dei 30°C, con conseguente maggior richiesta di energia, ricavata da una rapida demolizione degli zuccheri. Ne consegue una minore resa nella formazione

di alcol, con produzione di maggiori quantità di composti secondari indesiderati. Alte temperature facilitano inoltre un'elevata produzione di acidità volatile (De Rosa T. e Castagner R., 1994).

Per quanto riguarda il pH, il suo valore nelle vinacce normalmente varia fra 3,8 e 5,0. Avere a disposizione delle vinacce con un buon valore di acidità fissa, comunque la più alta possibile, è molto utile sia per l'azione selettiva operata sui lieviti, sia per l'azione inibente sulla maggior parte dei batteri, principalmente Gram negativi. Poche informazioni sono disponibili sulla composizione batterica della vinaccia al momento dell'insilamento e durante lo stoccaggio. Sicuramente alcuni batteri presenti sull'uva e quelli che possono svilupparsi nel vino appartengono essenzialmente a due gruppi, i batteri lattici e gli acetici. I batteri presenti nella vinaccia appartengono essenzialmente a due gruppi, i batteri lattici e gli acetici. I batteri lattici sono presenti in vigneto, sulle foglie della vite e sui grappoli d'uva a basse concentrazioni (10^3 ufc/g). Sono rappresentati da *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, conducono la fermentazione malolattica, che consente di produrre energia durante la crescita a bassi valori di pH, quando la demolizione degli zuccheri è inibita. La reazione, catalizzata dall'enzima malolattico, trasforma l'acido L-malico in L-lattico, causando innanzitutto una diminuzione dell'acidità. Nel mosto durante la fermentazione alcolica, le condizioni per il loro sviluppo sono sfavorevoli a causa della presenza dei lieviti (che utilizzano più velocemente le risorse nutritive), l'aggiunta di anidride solforosa e il pH compreso tra 3,2 e 3,4. Quando i lieviti entrano in fase stazionaria la lisi e il rilascio di nutrienti provocano un aumento della crescita batterica. Uno studio sulla qualità di vini base e dei loro distillati (Du Plessis *et al.*, 2002) ha evidenziato come la fermentazione malolattica comporti una riduzione dell'intensità dell'aroma, in particolare di composti volatili come esteri a nota fruttata ed etil acetato, mentre subiscono un incremento lattato di etile, acido acetico e dietil succinato.

I batteri acetici (*Gluconobacter* e *Acetobacter*) sono essenzialmente microrganismi dannosi in quanto responsabili della cosiddetta fermentazione acetica: ossidano l'alcool etilico producendo principalmente acido acetico ed etil acetato. La perdita in etanolo può raggiungere valori compresi tra il 10 e il 20%

costituendo oltre che un problema economico anche un deprezzamento organolettico.

Le muffe, microrganismi generalmente aerobi che preferiscono ambienti acidi, si sviluppano soprattutto all'inizio della fermentazione, perché fortemente inibite dall'alcol (spesso sono sufficienti 3 gradi alcolici). Metaboliti prodotti da *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., tra le specie più diffuse sull'uva danneggiata, possono ritardare la crescita dei lieviti durante la fermentazione.

3.1.2 TRATTAMENTI TECNOLOGICI PER LA CONSERVAZIONE DELLA VINACCIA

Le distillerie dotate di impianti più moderni hanno sviluppato alcuni accorgimenti tecnologici con lo scopo di evitare la comparsa di caratteristiche negative del prodotto finale, causati da condizioni di stoccaggio inappropriate. Un discorso preliminare va fatto sulla qualità dell'uva di partenza da cui sono ottenute le vinacce. Le pratiche di raccolta dell'uva, al giorno d'oggi quasi completamente meccanizzate, possono comportare però il danneggiamento degli acini con conseguente macerazione solido-liquido e ossidazione enzimatica. Questi fenomeni possono essere accentuati dai tempi lunghi che intercorrono fra la vendemmia e il conferimento in cantina. Alcuni interventi proposti negli ultimi anni e volti a limitare gli effetti legati a fermentazioni ed ossidazioni incontrollate sono l'iperossigenazione del mosto (per ridurre le sostanze più facilmente ossidabili), l'aggiunta di antiossidanti come SO₂ e acido ascorbico o l'allontanamento dell'ossigeno mediante gas inerti come CO₂ e N₂. Recentemente è stato sperimentato l'utilizzo di anidride carbonica, che in forma solida protegge dalle ossidazioni e determina un sensibile e rapido abbassamento della temperatura del prodotto raccolto (Sonni F. *et al.* 2006).

L'uva, una volta arrivata in cantina viene sottoposta a pigiatura, e il mosto fermentato. Per il recupero della vinaccia, considerato generalmente un sottoprodotto della vinificazione, è necessaria una fase di pressatura che avviene con sistemi diversi relativamente alle particolari esigenze della produzione del vino, che possono essere completamente diverse rispetto a quelle richieste dai produttori di distillati. Una conseguenza della modalità di pressatura è il contenuto di mosto residuo: un'umidità elevata, pur garantendo una maggiore quantità di

zuccheri trattenuti insieme alla matrice che fanno raggiungere un grado alcolico più elevato, in alcuni casi può causare problemi durante l'insilamento.

Ricerche condotte da Usseglio-Tomasset (1978) mettono in evidenza come durante insilamenti prolungati della vinaccia si verifica un aumento in acidità volatile, particolarmente se la vinaccia non ha subito una corretta compressione al momento dello stoccaggio e presenta sacche d'aria. Tale inacetimento è più probabile in vinacce vergini, rispetto a quelle già fermentate. Uno dei sistemi di insilamento che consente di ridurre la quantità di ossigeno presente nelle vinacce, descritto in precedenza, è costituito da grandi sacconi di plastica. La mancanza di aereazione limita la crescita dei lieviti ma aumenta la produzione di etanolo, perciò gli zuccheri, degradati rapidamente, sono meno disponibili per lo sviluppo dei batteri (Da Porto C., 2002).

Considerando l'effetto della variazione del pH, una pratica da tempo condotta in distilleria al momento dello stoccaggio è l'acidificazione con aggiunta di solfiti (acido solforico, SO_2). Dati di letteratura dimostrano che valori di pH sotto a 3 rallentano lo sviluppo batterico, anche dei batteri lattici che sono i più adattati ad ambienti acidi (Zambonelli C., 2001). Si suppone che quest'ultimi, insieme ai batteri acetici, siano i responsabili della produzione di sostanze particolarmente indesiderate che possono essere concentrate nel prodotto finale tramite la distillazione. I lieviti maggiormente sensibili alle variazioni di pH sono gli apiculati poco adatti alla produzione di alcol, ma nulla si sa dell'effetto di queste variazioni sulla dinamica delle popolazioni costituite dai diversi ceppi e delle conseguenze di questo fattore di selezione sulla produzione di composti durante l'insilamento.

L'eccessiva presenza di SO_2 nelle vinacce e le temperature ambientali troppo basse, inferiori ai 10 °C, possono essere causa di difficili avvii di fermentazione. Dall'altro lato, l'assenza totale di SO_2 , il surriscaldamento delle vinacce nei silos delle cantine o negli autocarri ed il pH troppo alto inducono un aumento della velocità di fermentazione. L'avvio della fermentazione rimane, dunque, sempre la parte più delicata del processo, e così come è necessario cercare di rallentare il processo fermentativo fino a che le vinacce vergini non siano collocate nei silos, è altrettanto necessario poi far avviare immediatamente la fermentazione stessa nel miglior modo possibile. (De Rosa T. e Castagner R., 1994).

Una pratica altamente diffusa in ambito enologico, ma poco studiata nel settore dei distillati, consiste nell'impiego di lieviti selezionati in grado di riprodursi a scapito delle specie meno alcoligene e di avviare immediatamente la fermentazione. I lieviti secchi attivi, introdotti ad elevate concentrazioni all'inizio del periodo di stoccaggio, possono limitare contemporaneamente lo sviluppo di batteri, ad esempio se produttori di SO_2 a concentrazioni di inibitorie.

Uno dei composti maggiormente indesiderati, la cui concentrazione aumenta con il prolungamento del periodo d'insilamento, è il metanolo: una grappa ottenuta da vinacce fermentate in distilleria ed insilate per più di 30 giorni, mostra valori più elevati rispetto a quella ottenuta da vinacce fermentate in cantina. L'alcol metilico deriva dalla degradazione enzimatica delle pectine ad opera della pectin-metil-esterasi, naturalmente presente nell'uva e maggiormente attiva nelle vinacce, grazie ad una minor acidità rispetto al mosto. La formazione del metanolo è rapida quasi quanto la fermentazione alcolica per cui dopo circa quindici giorni di insilamento le vinacce pervenute vergini in distilleria hanno già sviluppato l'85% del metanolo totale. Le vinacce rosse invece sopportano periodi di insilamento più lunghi. sono necessari almeno 30-40 giorni per ottenere il 70% del metanolo finale.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 CEPPI DI LIEVITO

Per l'analisi del DNA mitocondriale sono stati analizzati 196 isolati da vinaccia di Prosecco così suddivisi:

- T₄-Ac: campioni provenienti da vinaccia acidificata, prelevati al tempo T₄ (dopo 4 giorni), per un totale di 50.
- T₁₅-Ac: campioni provenienti dalla medesima vinaccia, prelevati al tempo T₁₅ (dopo 15 giorni), per un totale di 50.
- T₄-NAc: campioni provenienti da vinaccia non acidificata prelevati al tempo T₄, per un totale di 49.
- T₁₅-NAc: campioni provenienti dalla medesima vinaccia prelevati al tempo T₁₅, per un totale di 47.

3.2.2 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 L.J., 1951)

Dosi per 1 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 20 g/l di Bacto Agar (Difco).

Soluzioni

PBS (Phosphate buffered saline)

- 8 g NaCl

0,2	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄

Aggiustare il pH fino a 7,4 e sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti.

3.2.3 CAMPIONAMENTO E ISOLAMENTO DI LIEVITI DA VINACCIA

3.2.3.1 Campionamento

E' stata utilizzata uva di Prosecco proveniente dalla zona vitivinicola di Valdobbiadene (Treviso). Dopo la pigiatura la vinaccia separata dal mosto è stata refrigerata ad una temperatura di 10°C e trasportata in distilleria mediante camion coibentato. E' stata eseguita la refrigerazione con lo scopo di limitare lo sviluppo incontrollato di microrganismi durante il trasporto alla distilleria. La vinaccia è stata scaricata dal camion ad una temperatura di 10°C e circa 2 kg sono stati prelevati per le analisi microbiologiche (tempo T₀). Il materiale vegetale è stato suddiviso in due parti e una di queste è stata acidificata mediante l'aggiunta di H₂SO₄ al 33% fino al raggiungimento di un valore di pH di 2,9. Sia la frazione acidificata che quella non acidificata sono state suddivise e trasferite in sacchi di plastica da 50 kg. Ciascun sacco è stato chiuso dopo aver pressato il contenuto in modo da eliminare le sacche d'aria eventualmente presenti e conservato in una stanza termostata alla temperatura costante di 20°C. Per il monitoraggio della microflora naturale sono stati eseguiti campionamenti sulla vinaccia pressata subito prima dell'inizio del trasporto refrigerato (T_p), al tempo T₀, prima di chiudere i sacchi, e a 4 giorni (T₄), 15 giorni (T₁₅), 30 giorni (T₃₀) dall'inizio dello stoccaggio, dopo i quali è avvenuta la distillazione.

3.2.3.2 Isolamento

Ad ogni campionamento, T₀, T₄, T₁₅, T₃₀, sono state prelevate 5 repliche di circa 300 g di vinaccia per ogni sacco, ed è stata determinata la popolazione totale dei lieviti presenti mediante conta su piastra. Venti grammi di vinaccia per ciascuna replica sono stati pesati e dispersi in 200 ml di soluzione PBS e dopo le opportune diluizioni decimali, piastrati in piastre di WL agar (Oxoid, Milano, Italia) con aggiunta di 10 µg/ml di cloramfenicolo (Sigma, Milano, Italia) per contrastare la crescita batterica, e incubate a 30°C per 3 giorni. Sono state prelevate a caso 100

colonie dalle tesi acidificata e non a 4 e 15 giorni, purificate a colonia pura ristricciando su piastre fresche di YM, stoccate in glicerolo al 20% e conservate a -20°C per successive analisi.

3.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE

Per l'estrazione del DNA totale di lievito è stato utilizzato il protocollo di lisi cellulare meccanica descritto nel paragrafo 2.2.4.

3.2.5 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

La preparazione della sospensione cellulare per l'amplificazione del DNA è stata eseguita seguendo la procedura descritta nel paragrafo 2.2.5 e 2.2.6. Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il termociclature i-Cycler (Biorad). I primer utilizzati sono stati forniti in forma liofilizzata dalla ditta Biotech (Germania), sono stati risospesi in acqua sterile alla concentrazione 100 µM, ponendo particolare attenzione alle operazioni di risospensione, centrifugando 2 minuti a 14000 rpm prima di prelevare i volumi destinati alle amplificazioni.

Le prove di PCR sono state eseguite in volumi di reazione di 25 µl.

3.2.5.1 Identificazione di *Saccharomyces sensu stricto* (Multiplex PCR)

L'identificazione delle colonie di *Saccharomyces sensu stricto* è stata condotta adottando il metodo messo a punto da Nardi *et al.* (2006).

I primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

Primer	Lunghezza	Sequenza (5'-3')
SAC26F	22 bp	GAGAGGGCAACTTTGGGRCCGT
SAC26R	27 bp	ACCATTATGCCAGCATCCTTGACTTAC
SAC18F	23 bp	CTGCGAATGGCTCATTAAATCAG
SAC18R	25 bp	CCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATG

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

Componenti	Concentrazione finale
Primer SAC26F	0,2 μ M
Primer SAC26R	0,2 μ M
Primer SAC18SF	2 μ M
Primer SAC18SR	2 μ M
dNTPs (Amersham)	50 μ M (ciascuno)
<i>Taq</i> polimerasi (Amersham)	0,1 U/ μ l
Buffer	1X
DNA	3 μ l sospensione cellulare

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

Programma di amplificazione		
Ciclo1 (1X)	94°C	5'
Ciclo2 (35X)	94°C	30''
	54°C	30''
	72°C	1'30''
Ciclo3 (1X)	72°C	5'
Ciclo4 (1X)	15°C	∞

3.2.6 RESTRIZIONE DEL DNA MITOCONDRIALE

L'analisi del DNA mitocondriale è stata eseguita utilizzando la procedura descritta nel paragrafo 2.2.7.

3.2.7 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO

La separazione di frammenti lineari di DNA è avvenuta come descritto nel paragrafo 2.2.8.

Sono state utilizzate le seguenti concentrazioni di agarosio:

- 1,2% per separare gli amplificati ottenuto con i primer SAC26F/SAC26R e 18SF/18SR,
- 0,7 % per quantificare il DNA genomico,
- 1 % per separare frammenti del DNA mitocondriale digeriti con *Hinf*I,

Dopo la corsa i gel sono stati osservati al transilluminatore UV e fotografati con il sistema EDAS (Kodak).

Per l'analisi delle bande elettroforetiche del DNA mitocondriale è stato utilizzato il programma GelComparII V. 4.5 (Applied Maths).

3.3 RISULTATI

3.3.1 ALLESTIMENTO DELLA SPERIMENTAZIONE E RACCOLTA DEI LIEVITI DA CARATTERIZZARE

La preparazione delle vinacce di uva Prosecco (provenienti dalla zona vitivinicola di Fregona-Treviso) al momento dell'insilamento è stata seguita in modo estremamente accurato in tutte le sue fasi, poiché un corretto stoccaggio è fondamentale per poter verificare l'effetto dei trattamenti sulla componente microbica. Per limitare la proliferazione dei microrganismi in fase di pre-insilamento (lo stoccaggio non poteva essere eseguito immediatamente), fin dal momento della pigiatura dell'uva in cantina le vinacce hanno subito un processo di refrigerazione. Una temperatura di 11°C è stata mantenuta anche durante il trasporto alla distilleria. Durante il trasporto in condizioni di temperatura non controllata si verifica un abbondante sviluppo microbico in particolare se si considerano vinacce vergini. I lieviti, nel tragitto alla distilleria che può durare diverse ore, sono in grado di consumare buona parte degli zuccheri presenti nella vinaccia (Carraro A., 2003). In queste condizioni non c'è nessun controllo dei processi di degradazione della fonte di carbonio che possono quindi coinvolgere l'ossigeno, sicuramente presente in quanto i carri utilizzati per il trasferimento sono aperti, con produzione di composti secondari non graditi quali acido acetico e i suoi esteri. Una temperatura di 11 °C pur non garantendo il blocco totale dell'attività proliferativa dei microrganismi, ne rallenta sicuramente il metabolismo, permettendo di raggiungere la fase controllata dell'insilamento con ancora il corredo zuccherino praticamente intatto.

In distilleria una parte della vinaccia è stata immediatamente trattata, acidificando con acido solforico in modo da abbassare il pH a 2,9. Questa pratica viene condotta da tempo in distilleria in quanto, pur non essendoci dati sperimentali relativi all'effetto sulle popolazioni microbiche, si osserva un aumento della conservabilità. Dopo l'acidificazione le vinacce sono state trasferite in sacchi di materiale plastico che sono stati sigillati previa pressatura, che consente l'eliminazione di sacche d'aria presenti in modo da sfavorire lo sviluppo di muffe. Questo gruppo di microrganismi sono responsabili della produzione di sostanze organoletticamente sgradevoli che permangono anche dopo la distillazione. La vinaccia insilata è stata incubata a 20°C e la temperatura dei sacchi è stata costantemente monitorata. Nonostante il calore prodotto dalla fermentazione

alcolica la vinaccia non ha mai superato i 25°C. Questo risultato permette di dedurre che i lieviti non hanno subito nessuno stress termico e la fermentazione alcolica è proceduta in modo regolare. Per verificare l'andamento dei lieviti durante la fase di insilamento sono stati effettuati una serie di prelievi della vinaccia e il medesimo giorno sono state effettuate le analisi microbiologiche relative alla determinazione quantitativa della popolazione batterica e di lieviti. Un primo campionamento era stato eseguito ancora in cantina sul pigiato poco prima dell'inizio della fase di trasporto refrigerato, con lo scopo di valutare l'effetto dell'abbassamento della temperatura nel tenere sotto controllo la popolazione indigena di lieviti. In distilleria, sono stati eseguiti, dalle vinacce acidificate e da quelle di controllo non acidificate, 4 campionamenti in tutto, al momento dell'insilamento (T₀), dopo 4 giorni (T₄), dopo 15 giorni (T₁₅) e dopo 30 giorni (T₃₀), immediatamente prima della distillazione. Un centinaio di colonie provenienti dalle piastre di isolamento dei campionamenti a 4 giorni (T₄) e a 15 giorni (T₁₅) sono state ulteriormente purificate e congelate (-20°C) e utilizzate per la caratterizzazione successiva. Sono stati scelti i campionamenti a 4 giorni e a 15 giorni in quanto sperimentazioni precedenti (Bernardini M., 2005) hanno dimostrato che se le vinacce vengono stoccate in modo idoneo e gli zuccheri sono ancora abbondanti al momento dell'insilamento dopo 4 giorni i lieviti appartenenti al gruppo *S. sensu stricto* risultano la popolazione dominante. E' stato considerato anche il campionamento a 15 giorni in quanto in questa fase i lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces* sono al massimo dello sviluppo e di produzione di alcol.

3.3.2 ISOLAMENTO DEI LIEVITI E CONTA MICROBICA

L'analisi quantitativa della popolazione di lieviti durante lo stoccaggio della vinaccia è stata effettuata a quattro tempi, all'inizio dello stoccaggio (T₀), dopo 4 (T₄), 15 giorni (T₁₅) e 30 giorni (T₃₀). Per ogni campione di vinaccia si è proceduto all'isolamento dei lieviti su terreno WL agarizzato, addizionato con 10 µg/ml di cloramfenicolo per contrastare lo sviluppo dei batteri.

I dati ottenuti riportati in tabella 3.1 confermano un andamento della popolazione del tutto comparabile a quello riscontrato in campionamenti precedenti, evidenziando l'aumento di lieviti dall'inizio dello stoccaggio fino a 4 giorni; al tempo T₁₅ (dopo 15 giorni) si osserva un leggero decremento che però si mantiene attorno a valori di 10⁷ ufc/g, e si accentua in modo consistente al tempo T₃₀, che precede la distillazione, quando ormai l'attività dei lieviti è conclusa. E' possibile

affermare inoltre che il trattamento di refrigerazione ha avuto un certo effetto contenitivo sui lieviti durante la fase del trasporto in distilleria, mantenendone il valore a circa $3 \cdot 10^7$ ufc/g, riscontrato anche nel precedente campionamento sul pigiato avvenuto in cantina.

T_p	T_0	Trattamento	T_4		T_{15}		T_{30}		
			Lieviti ufc/g	T °C	Lieviti ufc/g	T °C	Lieviti ufc/g	T °C	Lieviti ufc/g
$3,2 \times 10^6 \pm 1,08 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6 \pm 3,70 \times 10^5$	Acidificata	$2,1 \times 10^7 \pm 3,26 \times 10^6$	20,4	18,9	$1,5 \times 10^7 \pm 4,18 \times 10^6$	19,0	$6,9 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^5$	19,0
		Non acidificata	$2,5 \times 10^7 \pm 2,59 \times 10^6$	19,8	19,2	$1,5 \times 10^7 \pm 2,50 \times 10^6$	19,0	$5,5 \times 10^5 \pm 9,72 \times 10^4$	19,0

Tab. 3.1: Evoluzione della popolazione di lieviti e della temperatura durante lo stoccaggio delle vinacce.

3.3.3 IDENTIFICAZIONE DEI LIEVITI APPARTENENTI AL GRUPPO

Saccharomyces sensu stricto

Con lo scopo di ottenere un metodo di identificazione di lieviti appartenenti alle specie di interesse tecnologico (*Saccharomyces sensu stricto*), il gruppo di Microbiologia del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Padova ha messo a punto un metodo basato sull'utilizzo della tecnica Multiplex PCR (Nardi T. *et al.* 2005). La metodica prevede la possibilità di discriminare questo gruppo di lieviti rispetto agli altri presenti in ambiente enologico sulla base proprio di differenze nucleotidiche all'interno della regione di DNA codificante per l'RNA ribosomiale (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 (fig.3.1).

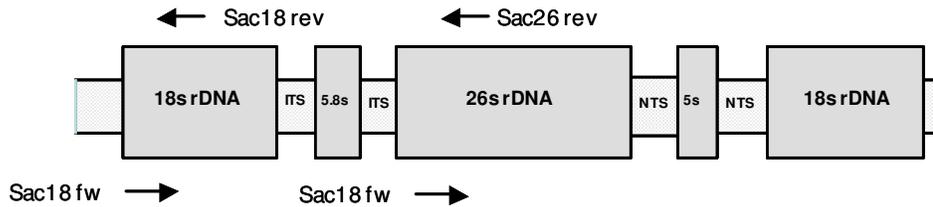


Fig. 3.1 Regione di DNA codificante l'RNA ribosomale nei lieviti. Sono indicate le posizioni dei primer utilizzati per identificare *S. sensu stricto*.

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 (fig. 3.2).

Allo scopo di rendere più veloce il metodo di analisi, sono state eseguite alcune prove per verificare la possibilità di amplificare sequenze genomiche a partire da cellule di lievito lisate termicamente, evitando ogni procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico. Questo ha permesso di creare un nuovo protocollo di PCR in cui il template non è rappresentato da DNA di lievito purificato ma da una sospensione acquosa contenente cellule di lievito provenienti direttamente da una colonia su piastra. 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.

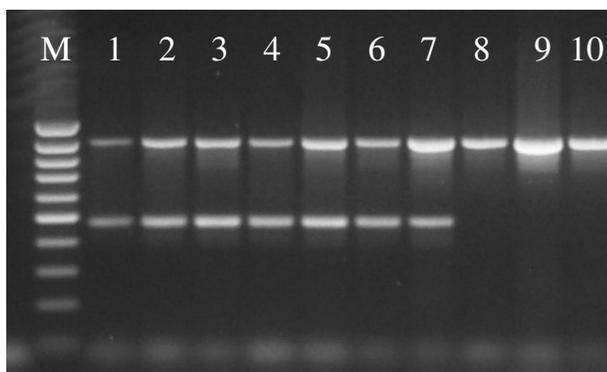


Fig.3.2 Multiplex PCR. M standard di peso molecolare (100bp, Amersham Bioscience) *S. sensu stricto*: 1) *S. bayanus*, 2) *S. cariocanus*, 3) *S. cerevisiae*, 4) *S. kudriavzevii*, 5) *S. paradoxus*, 6) *S. pastorianus*, 7) *S. mikatae*; *S. sensu lato*: 8) *S. barnetti*, 9) *S. bulderi*, 10) *S. servazzi*.

Sottoponendo i 100 isolati all'analisi descritta è stato possibile verificare che tutti appartenevano al gruppo *S. sensu stricto*, confermando la dominanza di questi lieviti nel condurre la fermentazione alcolica già a 4 giorni dall'inizio dello stoccaggio.

3.3.4 CARATTERIZZAZIONE CEPPO-SPECIFICA DEGLI ISOLATI APPARTENENTI AL GRUPPO *Saccharomyces sensu stricto*

Un totale di 200 isolati provenienti dai campionamenti della vinaccia acidificata e da quella di controllo, dopo 4 e 15 giorni dall'insilamento, sono stati analizzati ulteriormente con lo scopo di identificare la presenza di individui diversi e studiare le dinamiche delle singole popolazioni. Per ottenere quindi una caratterizzazione ceppo specifica, è stato scelto il metodo già utilizzato nel capitolo 2 basato sull'analisi del DNA mitocondriale.

Il confronto dei profili di restrizione (fig. 3.3) è stato fatto utilizzando il software GelComparII che è in grado, attraverso la costruzione di una matrice, di calcolare il livello di similarità tra profili ed visualizzarlo sottoforma di dendrogramma. Questa analisi è stata condotta sui 196 isolati di cui è stato possibile ottenere un profilo elettroforetico interpretabile dal software.

Nella costruzione della matrice è stato utilizzato il coefficiente di similarità di Dice che considera la posizione delle banda elettroforetica, ma non la sua intensità. Inoltre per determinare il valore soglia di percentuale di similarità, sotto il quale i profili sono da considerarsi uguali e quindi gli isolati corrispondenti

appartenenti allo stesso ceppo, sono stati sottoposti all'analisi con GelComparII tre isolati il cui DNA è stato digerito con *HinfI* separatamente due volte e i frammenti così ottenuti sono stati caricati su gel diversi. In questo modo sono state costruite per ciascuno dei 3 ceppi due repliche. 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 quello più simile, sono stati scelti in modo automatico dal software. In queste condizioni, si è ottenuto un grado di similarità minimo per coppia di repliche pari a 91%. Tale valore è stato utilizzato come soglia per la determinazione del numero di profili presenti. I 196 campioni caratterizzati sono stati sottoposti all'analisi computerizzata utilizzando i valori dei parametri "ottimizzazione" e "tolleranza" ottenuti con l'analisi dei replicati. In questo modo è stato possibile determinare il numero totale di ceppi ottenuti che risulta pari a 121. Questo dato è indice della grande biodiversità presente nella matrice vegetale analizzata. Rispetto ad analisi condotte in precedenza su vinacce di Prosecco provenienti dalla zona DOC sottoposte ad insilamento che avevano rivelato la presenza di un numero molto più esiguo di ceppi (22 su un totale di 114 isolati analizzati), è possibile affermare che fattori legati al territorio più che alla tipologia della matrice vegetale sembrano influenzare la distribuzione di lieviti appartenenti al gruppo *Saccharomyces*.

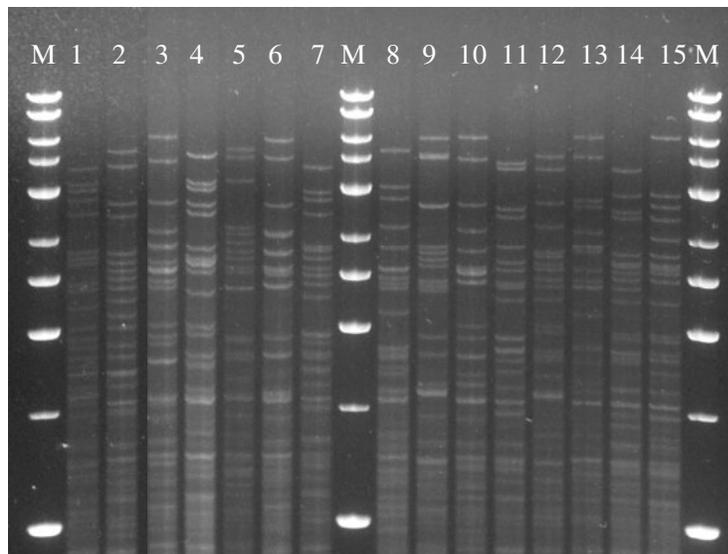


Fig. 3.3 Esempio di profili elettroforetici ottenuti mediante restrizione del DNA mitocondriale. M: standard di peso molecolare 1KB (Amersham Bioscience). 1-15: isolati provenienti da vinaccia.

Considerando il numero di individui attribuiti a ciascun ceppo mediante l'analisi genetica (fig. 3.4) è interessante notare che la maggior parte dei profili elettroforetici (91 su 121) sono stati osservati una sola volta, ciò significa che gran parte dei ceppi isolati erano rappresentati da un unico individuo. Diciassette profili sono stati rilevati due volte ciascuno, mentre i ceppi rappresentati da 3 a 6 individui sono stati un numero estremamente limitato (tra 2 e 5). Solamente il profilo 80 è stato riscontrato in un numero elevato di individui (17).

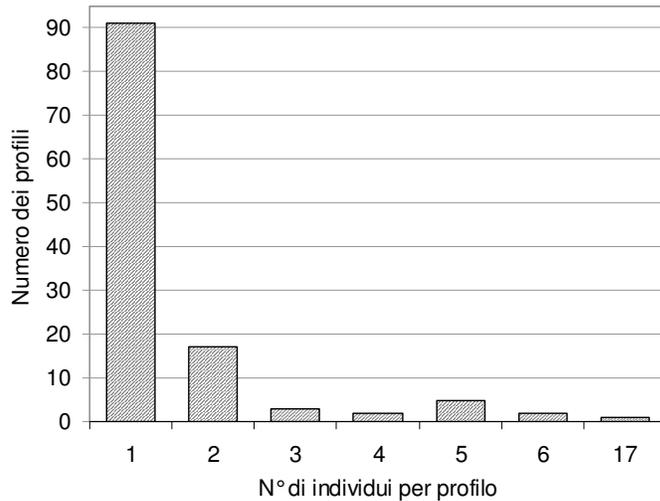


Fig. 3.4 Distribuzione dei profili elettroforetici in relazione agli isolati analizzati.

Considerando la distribuzione dei ceppi in relazione al trattamento di acidificazione soltanto 18 su 121 sono presenti in entrambe le situazioni. Questo risultato indica un marcato effetto di selezione dovuto all'abbassamento del pH. Nella vinaccia acidificata sono stati identificati 51 profili tipici di cui 5 rappresentati da 2 isolati e 1 da ben 5 individui. Mentre nella vinaccia non acidificata sono stati rilevati 52 profili tipici di cui 4 rappresentati da 2 individui e 1 da 3.

3.3.3.1 Vinaccia acidificata

Le distribuzioni dei profili ottenuti dai campionamenti a 4 e a 15 giorni relativi agli isolati provenienti dalla vinaccia acidificata sono riportati nelle fig. 3.5 e 3.6.

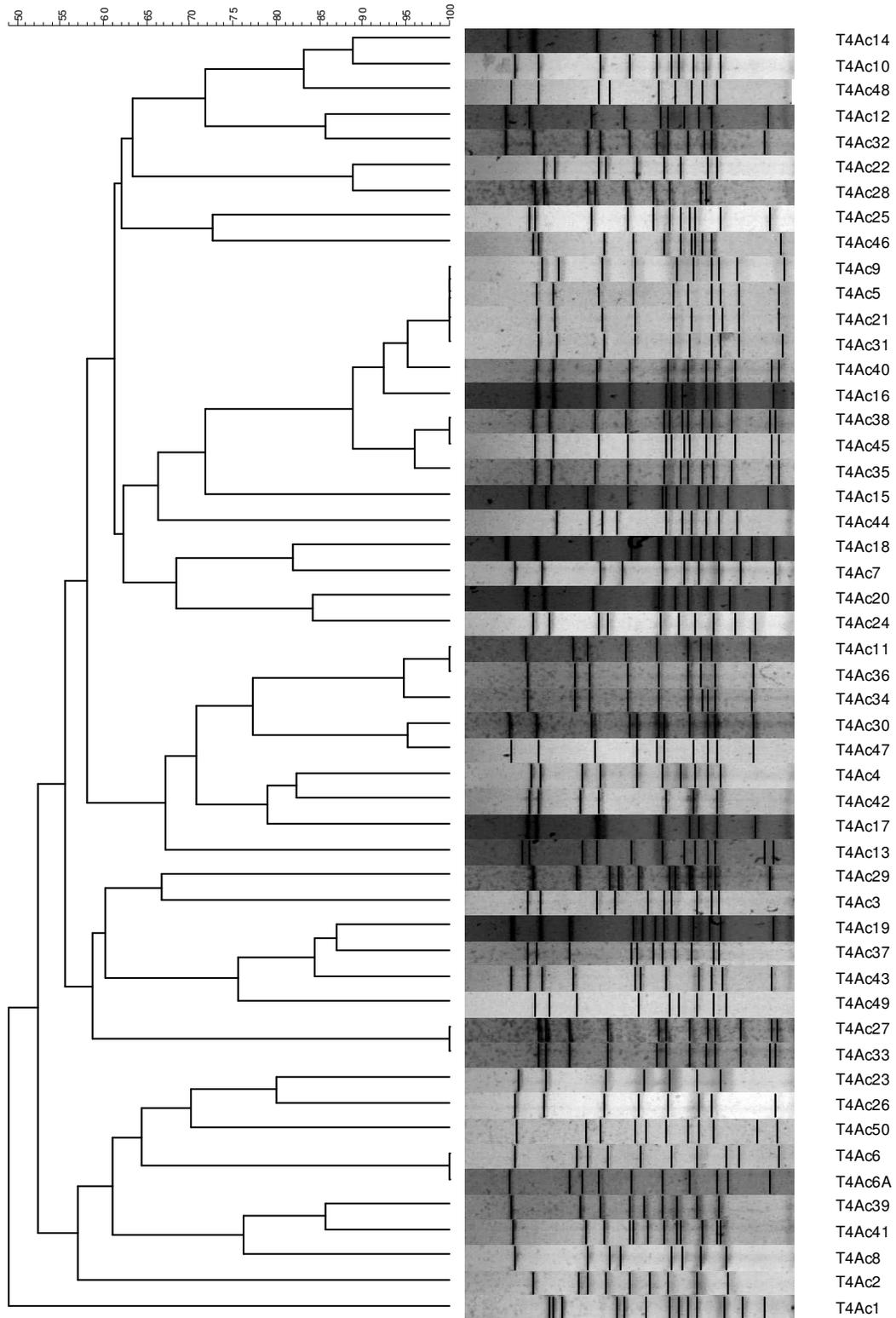


Fig. 3.6 Analisi di similarità relativa ai profili del DNA mitocondriale ottenuti dagli isolati provenienti da vinaccia acidificata di Prosecco campionata 4 giorni dopo l'insilamento (tempo T₄). Per la costruzione del dendrogramma è stato utilizzato il coefficiente di correlazione Dice. La linea indica il valore soglia di similarità (91%).

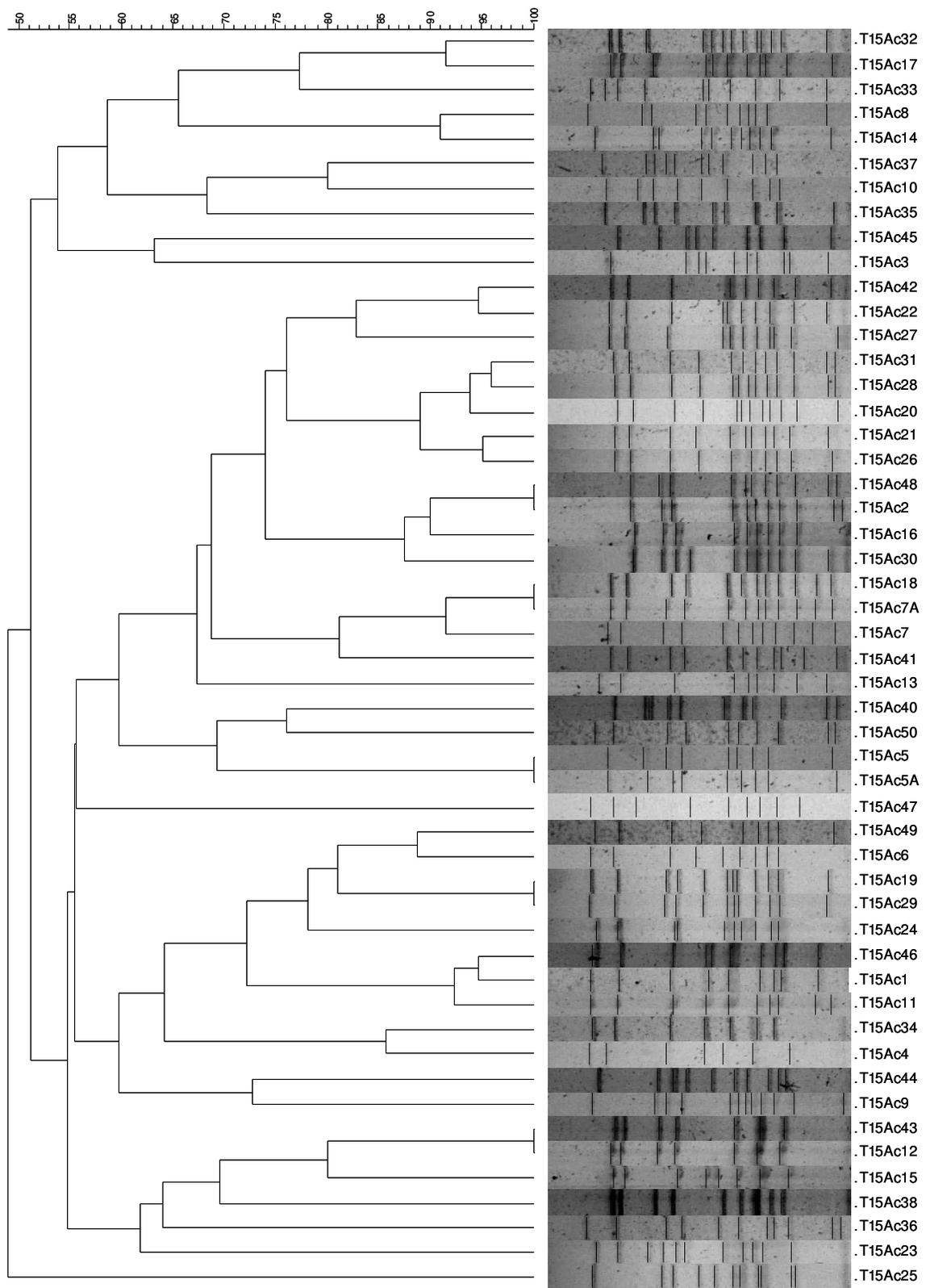


Fig. 3.7 Analisi di similarità relativa ai profili del DNA mitocondriale ottenuti dagli isolati provenienti da vinaccia acidificata di Prosecco campionata 15 giorni dopo l'insilamento (tempo T₁₅). Per la costruzione del dendrogramma è stato utilizzato il coefficiente di correlazione Dice. La linea indica il valore soglia di similarità (91%).

Considerando i risultati relativi al tempo T_4 l'alto grado di biodiversità è testimoniato dai bassi livelli di similarità presenti tra i profili. Il primo nodo di separazione infatti è posizionato ad un valore pari al 48% e individua l'isolato con il minor livello di similarità. Il nodo successivo (55%) separa gli isolati restanti in due *cluster*: uno costituito da 9 campioni e l'altro ben più numeroso caratterizzato da 41 campioni. Ad un livello di similarità pari a 58% quest'ultimo gruppo si spezza in 4 raggruppamenti dei quali quello più numeroso, costituito da 15 individui, porta il profilo più rappresentato (5 isolati che costituiscono il 10% degli individui analizzati al tempo T_4). Una situazione di notevole diversità tra i profili si riscontra anche al tempo T_{15} come dimostrato dalla presenza del primo nodo ancora ad un valore del 48% che separa l'isolato con il minor livello di similarità. Il nodo successivo (51%) divide i campioni in due *cluster* uno contenente 10 isolati e l'altro ben più numeroso caratterizzato da 37 individui che si distribuiscono in tre gruppi quando il valore sale al 55%.

Per individuare la dinamica delle popolazioni costituite dai diversi ceppi durante la fase di stoccaggio sono stati considerati i singoli profili e la loro presenza ai due diversi tempi di campionamento. E' stato osservato che soltanto 7 profili dei 69 riscontrati sono presenti in entrambi i campionamenti. Gli altri 34 profili osservati al tempo T_4 scompaiono al tempo T_{15} in cui si ritrovano 28 profili mai identificati prima.

3.3.3.2 Vinaccia non acidificata

Nelle fig. 3.7 e 3.8 sono riportate le distribuzioni dei profili ottenuti dai campionamenti a 4 e a 15 giorni relativi agli isolati provenienti dalla vinaccia non acidificata.

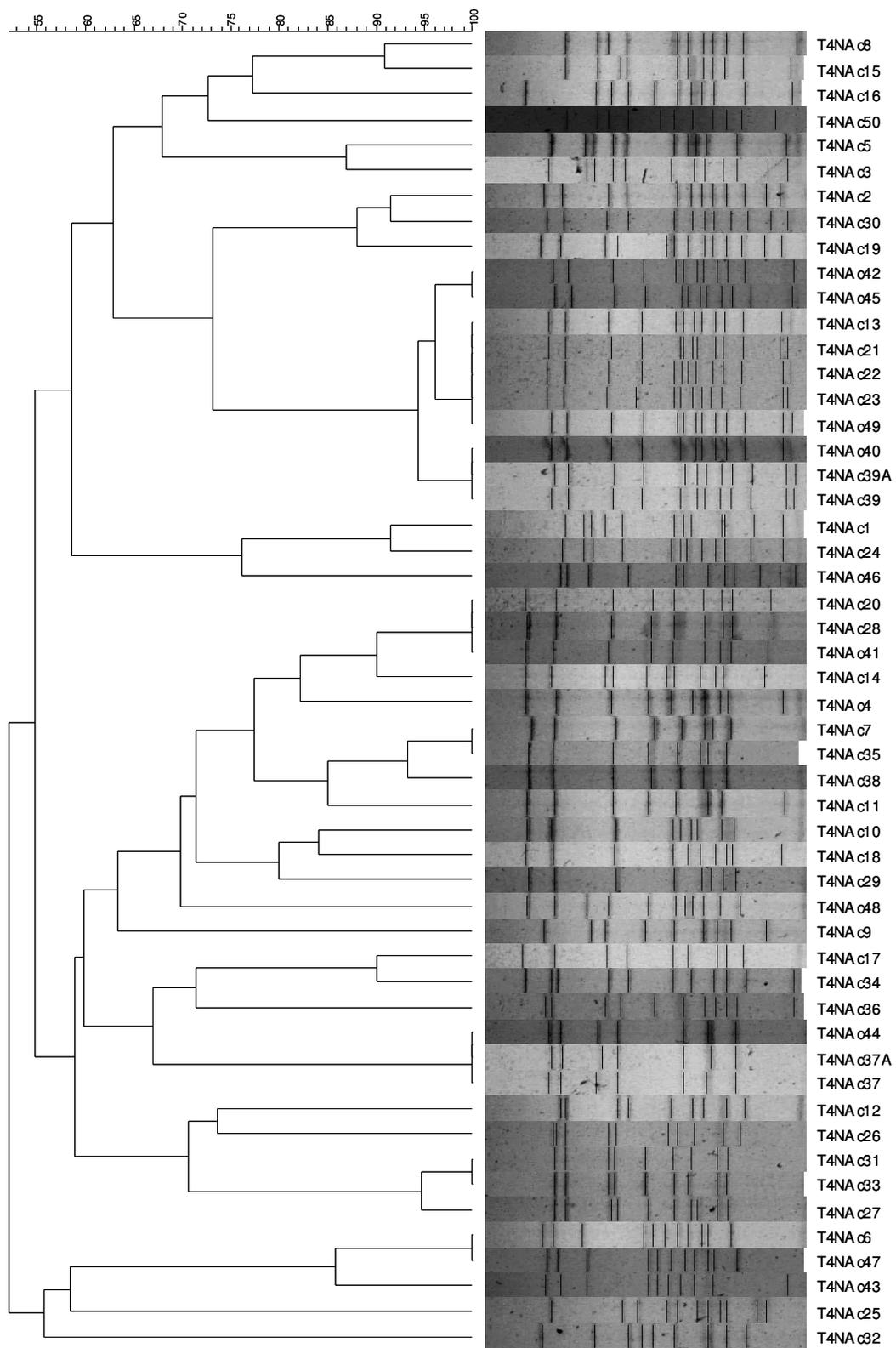


Fig. 3.7 Analisi di similarità relativa ai profili del DNA mitocondriale ottenuti dagli isolati provenienti da vinaccia non acidificata di Prosecco campionata 4 giorni dopo l'insilamento (tempo T₄). Per la costruzione del dendrogramma è stato utilizzato il coefficiente di correlazione Dice. La linea indica il valore soglia di similarità (91%).

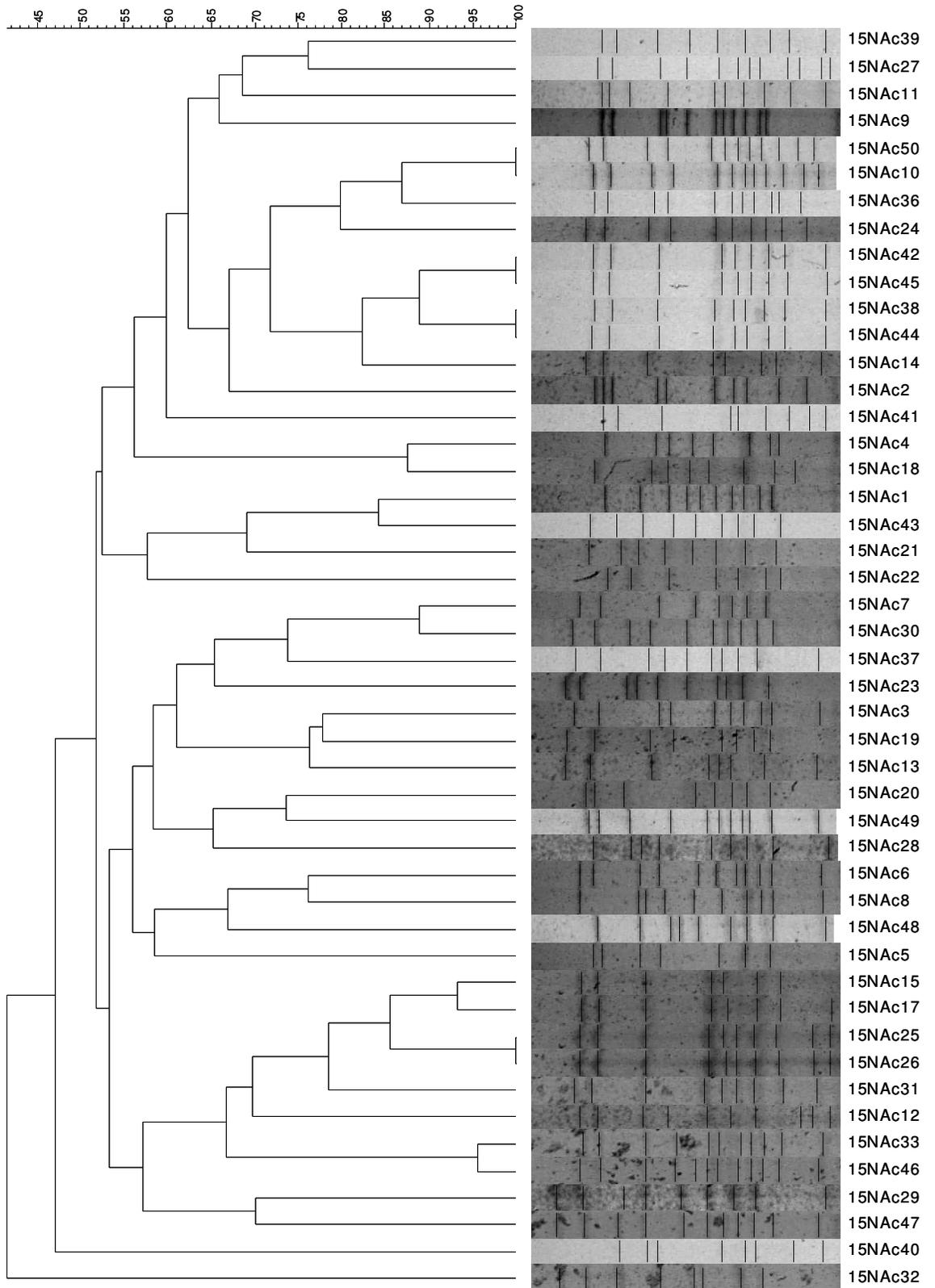


Fig. 3.8 Analisi di similarità relativa ai profili del DNA mitocondriale ottenuti dagli isolati provenienti da vinaccia non acidificata di Prosecco campionata 15 giorni dopo l'insilamento (tempo T_{15}). Per la costruzione del dendrogramma è stato utilizzato il coefficiente di correlazione Dice. La linea indica il valore soglia di similarità (91).

Considerando i risultati relativi al tempo di campionamento T_4 anche in questo caso è confermato l'elevato grado di biodiversità microbica già riscontrato nelle analisi precedenti. Il valore di similarità pari al 55% spezza il dendrogramma in 3 parti che corrispondono ad altrettanti *cluster* dei quali quello meno numeroso è costituito da 5 individui, affiancato dal gruppo più numeroso contenente 24 campioni, mentre il terzo gruppo, rappresentato da 21 individui, contiene il profilo più rappresentato (9 isolati che costituiscono il 18% del totale). La distribuzione dei profili diviene più complicata al campionamento successivo in cui il nodo posizionato ad un valore pari al 47% separa i due profili con il minor livello di similarità. Mentre un valore di similarità pari al 52% separa i campioni raccolti in 4 *cluster* principali in cui si osservano profili identificati ciascuno al massimo in due isolati.

Contrariamente a quanto è stato osservato nella vinaccia acidificata, osservando la dinamica delle popolazioni costituite dai singoli ceppi durante l'insilamento, il numero di profili aumenta tra i due campionamenti successivi passando da 32 al tempo T_4 a 41 al tempo T_{15} . In questo caso solo 3 su un totale di 70 profili diversi identificati sono stati riscontrati in entrambi i campionamenti. Gli altri 29 profili osservati al tempo T_4 scompaiono al tempo T_{15} in cui si ritrovano 38 profili mai identificati prima.

I dati ottenuti in questa sperimentazione indicano che, nel complesso le fasi di raccolta della vinaccia in cantina e di trasporto sono state condotte in modo adeguato. La refrigerazione sembra aver avuto un effetto nel rallentare lo sviluppo anticipato dei lieviti, pertanto è una buona pratica per limitare sviluppi incontrollati della microflora, ma potrebbe non essere attuabile nella realtà di cantina e in distilleria, in quanto i quantitativi di materiale vegetale da gestire sono notevoli e i costi probabilmente troppo elevati. Una soluzione, già sfruttata per abbassare la temperatura dell'uva dopo la vendemmia, potrebbe essere l'utilizzo della CO_2 in forma solida, che non comporterebbe la necessità di allestire mezzi di trasporto coibentati e refrigerati. In distilleria i tempi di sosta della vinaccia prima del trattamento di acidificazione e di preparazione dei sacchi per lo stoccaggio sono stati limitati, contenendo ulteriormente lo sviluppo di microrganismi dannosi, come dimostrato dall'analisi mediante Multiplex PCR che conferma la dominanza del gruppo *Saccharomyces sensu stricto* sia a 4 giorni che a 15 giorni dall'insilamento.

Il metodo di caratterizzazione ceppo specifico basato sull'analisi del DNA mitocondriale applicato quindi agli isolati appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* ha permesso di identificare e determinare la dinamica dei singoli ceppi durante il periodo di insilamento. La vinaccia di Prosecco analizzata si è dimostrata un ambiente ad elevato livello di biodiversità come dimostrato dall'identificazione di 121 ceppi diversi su un totale di 196 isolati analizzati. Confrontando questo risultato con quello dell'analisi del DNA mitocondriale dei ceppi isolati da vinaccia di Prosecco non sottoposta a trattamenti (cap. 2), si può notare senza dubbio la minore biodiversità di quest'ultima. Nonostante in entrambe le situazioni si tratti di vinaccia derivante dallo stesso tipo di vitigno, livelli di variabilità così diversi sono probabilmente da attribuire alla provenienza del materiale vegetale, anche se le zone di origine (Fregona e Conegliano) distano solo una ventina di km tra loro.

L'acidificazione della vinaccia, come metodo utilizzato per inibire la microflora batterica, si è rivelato un trattamento in grado di condizionare lo sviluppo della popolazione di lievito non tanto dal punto di vista quantitativo, ma piuttosto qualitativo. L'abbassamento del pH ha determinato un marcato effetto di selezione dimostrato dal fatto che solo 18 dei 121 ceppi identificati in totale sono stati isolati in entrambe le condizioni. La caratterizzazione eseguita sugli isolati a 4 e a 15 giorni dall'insilamento ha dimostrato anche una notevole variazione nella presenza dei ceppi legata al tempo di campionamento rivelando come, anche nella vinaccia, i lieviti risentano dei notevoli cambiamenti chimici determinati dalla trasformazione degli zuccheri in alcol.

**4. Caratteristiche tecnologiche e di qualità di
Saccharomyces tecnologici isolati da vinaccia**

4.1 INTRODUZIONE

La produzione industriale e l'uso commerciale di lieviti furono intraprese già dall'inizio del 19th secolo dopo la loro scoperta da parte di Pasteur. Le attuali conoscenze tecnologiche consentono l'isolamento, la caratterizzazione e la produzione industriale di lieviti con proprietà specifiche per poter soddisfare la domanda dell'industria del pane o della fermentazione (vino, birra, distillati). L'impiego di colture selezionate di ceppi di lievito, disponibili commercialmente come lieviti secchi attivi, è diventato una pratica enologica largamente applicata ai giorni nostri, con lo scopo di ovviare ad inconvenienti frequenti durante la fermentazione naturale dei mosti.

I caratteri di selezione dei lieviti in enologia possono essere suddivisi in due gruppi:

- quelli di importanza tecnologica che influiscono sull'andamento dei processi fermentativi,
- quelli di qualità che influiscono sulle caratteristiche organolettiche di un vino o di un distillato (Zambonelli C., 2003).

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 C., 2003).

I lieviti destinati alla produzione industriale di distillati (brandy, whiskey, rum) devono possedere caratteristiche tecnologiche derivanti dal tipo di prodotto desiderato e includono principalmente resa in alcol, bassa formazione di schiuma, elevata tolleranza allo stress (temperatura, pressione osmotica e concentrazione di alcol). Devono inoltre produrre quantità controllate di esteri etilici, aldeidi, acidi grassi e alcoli superiori, che influenzano l'aroma del distillato (Bekatorou A. *et al.*, 2006).

A tutt'oggi non esistono lieviti selezionati seguendo criteri studiati *ad hoc* per l'ambiente vinaccia, che possano perciò incidere in modo veramente significativo sulla qualità del prodotto. L'inoculo della vinaccia non fermentata con ceppi di lievito selezionati, tecnica già applicata con successo nell'ambito della produzione dei vini per il consumo diretto o destinati alla produzione di brandy, solo recentemente ha trovato impiego anche per la produzione dei distillati di vinaccia. Tale intervento, se da una parte mira ad un controllo della flora fermentativa

presente all'interno della vinaccia, dall'altra è in grado di influenzare le caratteristiche compositive del materiale destinato alla distillazione. Alcune distillerie hanno adottato questa pratica per il miglioramento della composizione chimica della grappa ma utilizzano lieviti secchi commerciali impiegati in vinificazione. Questa pratica può portare però ad una progressiva sostituzione della microflora locale ed una conseguente riduzione di alcune caratteristiche organolettiche tipiche delle fermentazioni spontanee.

Si è visto (Chinnici F. *et al*, 2001) che l'inoculo di vinacce vergini di uve Trebbiano con ceppi di lievito selezionato ha fornito alcune differenze compositive, relative soprattutto ai tenori in alcoli superiori, in confronto a quanto si ottiene con la distillazione di vinacce non trattate. I ceppi testati inoltre, non hanno dimostrato sempre comportamenti univoci per quanto riguarda la produzione dei composti analizzati, probabilmente a causa della difficoltà di omogenizzazione della massa di vinacce subito dopo l'inoculo. Certamente una delle caratteristiche più studiate è legata alla capacità del lievito di incrementare la concentrazione di aromi primari nel prodotto, dal momento che le molecole glicosilate volatili e non, sono concentrate nella buccia dell'uva, la principale componente della vinaccia.

4.1.1 CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEI LIEVITI

Potere fermentativo

Per potere fermentativo o alcoligeno, si deve intendere il grado alcolico massimo (inteso come etanolo %) prodotto da un lievito per fermentazione di un mosto contenente zucchero in eccesso.

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 (Zambonelli, 2003).

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.

L'etanolo svolge la sua azione tossica sul lievito, arrestandone la crescita fino alla perdita di vitalità, 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.

I principali meccanismi di detossificazione adottati dal lievito verso l'etanolo sono:

- modifica della frazione lipidica e proteica delle membrane,
- maggiore sintesi del citocromo P450,
- espressione di proteine da stress (ad esempio la proteina Hsp104), superossido dismutasi mitocondriale e catalasi citoplasmatica,
- aumento della sintesi del trealosio, che agisce da agente protettore per il mantenimento dell'integrità strutturale del citoplasma (D'Amore T., 1996).

Vigore fermentativo

Questo parametro, detto anche velocità di fermentazione, 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).

Modalità di sviluppo

Lo sviluppo del lievito nel vino può assumere modalità diverse che possono essere riassunte in polverulento (detto anche sviluppo a cellule disperse), flocculento (le cellule si aggregano dando origine a fiocchi), in aggregati (si formano aggregati anche di dimensioni notevoli).

Potere schiumogeno

Per misurare questo parametro si valuta l'altezza della schiuma. In *S. cerevisiae* è un carattere stabile, ereditario e dominante. 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.

Resistenza all'anidride solforosa

La resistenza alla SO₂ è la capacità di mantenere inalterata o sufficientemente elevata la velocità di fermentazione in presenza delle dosi selettive di SO₂.

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 SO₂ si sono riscontrate notevoli quantità di mRNA trascritto relativo al gene SSU1, e mutanti deleti invece risultano sensibili alla SO₂. Un recente lavoro (Aranda A. *et al.*, 2006) ha messo in evidenza l'interazione tra la resistenza ai solfiti, il metabolismo dell'adenina e dello zolfo. Mutazioni nella via biosintetica dell'adenina o la sua presenza nel mezzo provocano una maggiore resistenza agli effetti tossici della SO₂. Allo stesso modo la metionina reprime i geni coinvolti nell'assimilazione dei solfiti.

In *S. cerevisiae* i ceppi sufficientemente resistenti alla SO₂ 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).

4.1.2 CARATTERISTICHE DI QUALITÀ

L'attività metabolica del lievito produce una serie di composti che in parte hanno valenza aromatica, in quanto volatili (fig. 4.1); il metabolismo del lievito inoltre, è in grado di contribuire alla formazione del sapore complesso che viene percepito assaggiando il prodotto dell'attività fermentativa, un vino o un distillato.

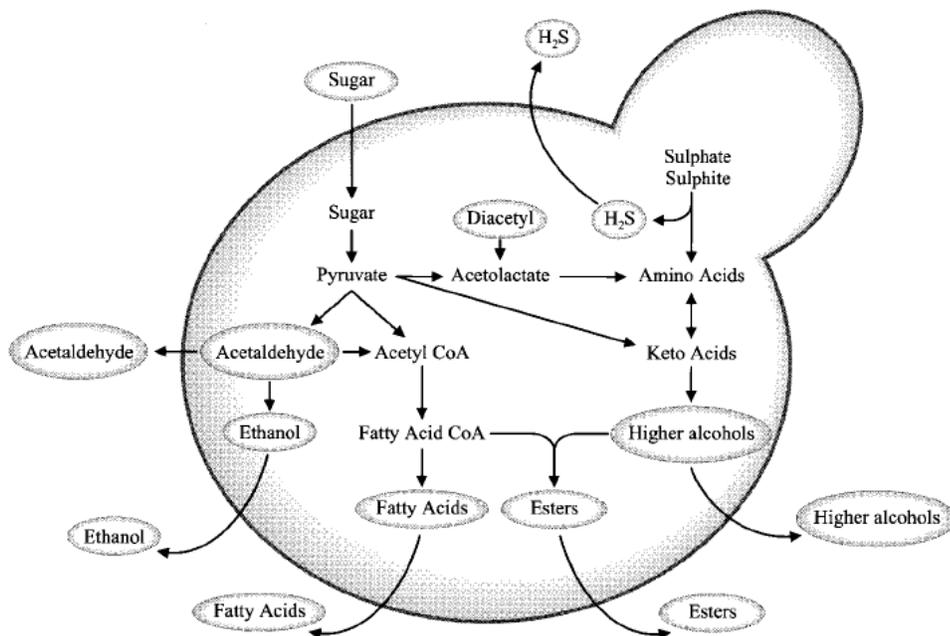


Fig 4.1 Rappresentazione schematica della produzione di composti odorosi nel lievito a partire da zuccheri, aminoacidi e dal metabolismo dello zolfo.

4.1.2.1 Gli alcoli superiori

Sono il prodotto dell'attività di degradazione attuata dai lieviti sia degli aminoacidi che derivano dal metabolismo cellulare sia di quelli presenti nell'uva (Rankine B.C., 1967). Dalla deaminazione di aminoacidi sono prodotti acidi chetonici da cui per decarbossilazione si ottengono aldeidi e per riduzione alcoli, secondo il meccanismo proposto da Ehrlich.

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, n-propanolo, derivante dalla treonina, l'isobutanolo (2-metil-propanolo) dalla valina, 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. Il 2-butanolo si sviluppa durante l'insilamento della vinaccia ad opera di batteri anaerobi negli strati più protetti dall'ossigeno, con concentrazioni che vanno dai 20 mg/100 ml a.a. dopo 20 giorni di stoccaggio, fino a 500-1000 mg/100 ml a.a. per periodi più lunghi.

Se presenti in quantità elevate gli alcoli superiori conferiscono al distillato aromi sgradevoli, 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.

Molti esperimenti condotti soprattutto in mosto e vino (Ribéreau-Gayon P. et al., 2000) indicano che la degradazione degli amminoacidi non è la sola via di formazione degli alcoli superiori, infatti l'1-butanol 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.

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, 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 P. 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.

4.1.2.2 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 ATF1 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-butirato (banana), l'etil-3-butil-acetato (pesca) e il lattato d'etile (lampono). 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).

4.1.2.3 I composti solforati

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 lieviti *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 antioidici). 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 concentrazioni 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).

4.1.2.4. Gli aromi primari o varietali

L'aroma complessivo delle uve è il prodotto della miscela di molte sostanze, quali esteri, alcoli, acidi, composti carbonilici, terpeni (geraniolo, nerolo, linalolo), C-13

norisoprenoidi (3-idrossi- β -damascenone) e derivati del benzene (alcol benzilico, 2-feniletanolo).

Queste molecole possono essere in forma libera, o legata a degli zuccheri. La maggior parte delle molecole aromatiche sono infatti presenti in questa forma, nell'ordine di 1:5. Proprio queste forme perdono il loro carattere aromatico in quanto non sono piú volatili (Ugliano M. *et al.* 2006).

I principali zuccheri implicati nella forma glicosilata sono :

- monosaccaridi (glucosio, arabinosio e ramnosio);
- disaccaridi (α -L-arabinofuranosio, α -L-arabinopiranosio, α -L-ramnopiranosio, β -D-glucopiranosio, β -D-apiofuranosio e β -D-xilopiranosio), fig.4.2.

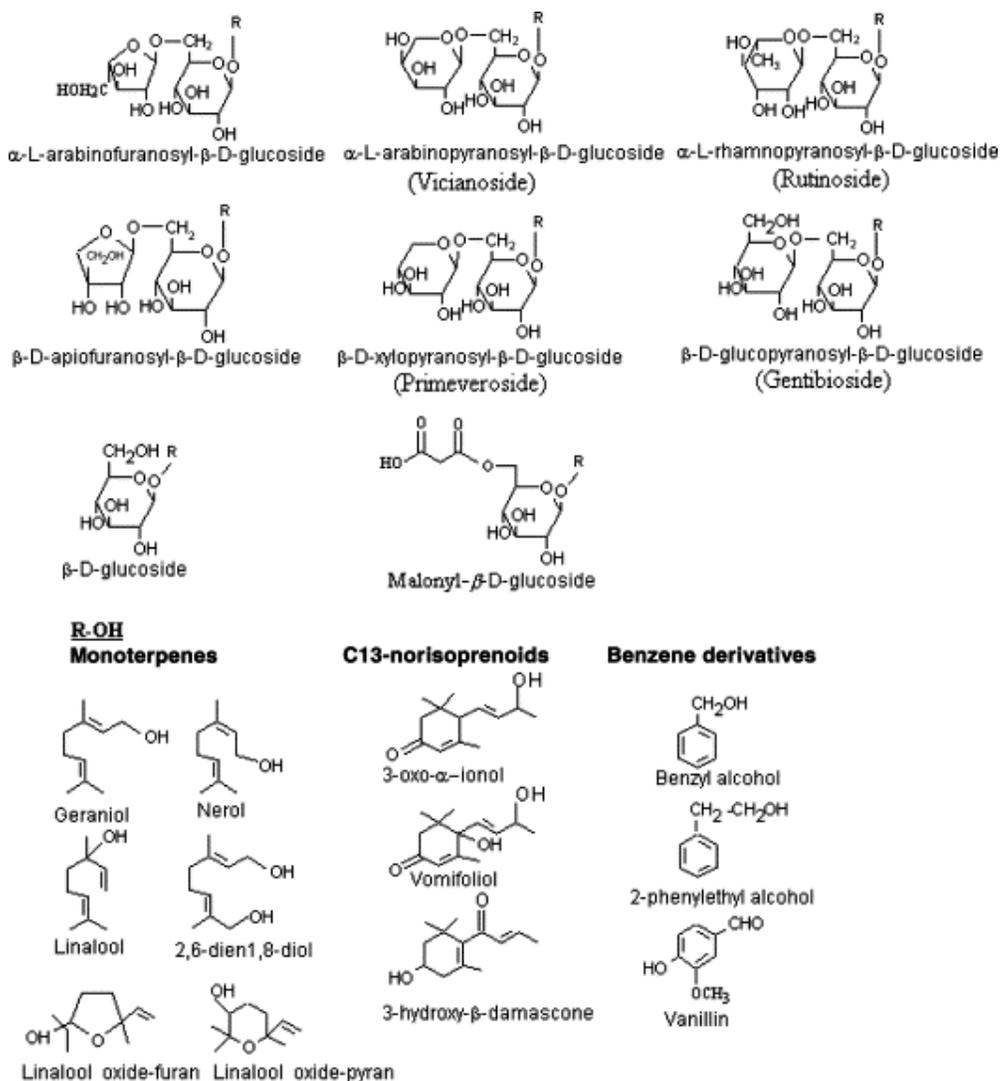


Fig.4.2 Strutture di alcuni precursori glicosidici di sostanze aromatiche.

Una famiglia molto importante e studiata è quella dei terpeni che conferiscono odori floreali molto gradevoli. Questi si dividono in due categorie: monoterpeni (formati da due unità isopreniche), e sesquiterpeni (formati da tre unità isopreniche).

Sempre di natura terpenica sono anche i carotenoidi, composti a 40 atomi di carbonio, sintetizzati dai cloroplasti e presenti soprattutto nella buccia dell'acino. I carotenoidi possono essere degradati dalla luce o da enzimi ossidativi (lipossigenasi) durante la maturazione, durante la destrutturazione della bacca in fase prefermentativa o nel corso della vinificazione. I prodotti della degradazione sono composti più corti a 9, 10, 11, e 13 atomi di carbonio, che sono più solubili, più volatili e più odorosi.

I derivati a 13 atomi di carbonio sono detti anche C13-norisoprenoidi. A loro volta questi si possono dividere in megastigmani e non-megastigmani e hanno una soglia di percezione molto bassa, il che li rende estremamente importanti dal punto di vista aromatico (i non megastigmani sono meno graditi in alcuni vini perché conferiscono aromi simili al kerosene).

Questi composti si formano soprattutto a partire dall'invasatura, quando iniziano a calare i carotenoidi. La concentrazione dei carotenoidi dipende anche dalla posizione dell'acino sulla pianta. Infatti se l'acino è esposto al sole avremo una maggiore quantità di carotenoidi durante la maturazione e un accumulo più rapido di C13-norisoprenoidi nelle fasi successive. La zona dell'acino in cui si formano gli aromi primari è la buccia dell'uva, per questo motivo tali molecole sono particolarmente interessanti nella produzione della grappa ottenuta da vinaccia (Sarry J. *et al*, 2004).

Dal momento che la forma glicosilata è molto più presente di quella libera, assumono grande importanza tutti quei meccanismi che riescono a liberarne il carattere aromatico. Questo può avvenire in due modi, mediante idrolisi acida o enzimatica. Per quanto riguarda la prima, in condizioni di acidità moderata del vino, si verifica la liberazione spontanea di composti volatili, un processo relativamente lento che porta alla formazione in particolare di norisoprenoidi.

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 (β -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 P. *et al.*, 2000).

Nei lieviti sono state osservate attività glicosidasiche α -ramnosidasica, α -arabinosidasica, β -D- apiofuranosidasica che agiscono preliminarmente rilasciando lo zucchero terminale dal disaccaride, consentendo poi alla β -glucosidasi la liberazione dell'aglicone odoroso (Ugliano M. *et al.* 2006).

4.1.3 INFLUENZA DEI LIEVITI NELLA PRODUZIONE DI AROMI PRIMARI: GLI ENZIMI B-GLUCOSIDASICI

Come già detto in precedenza un'importante carattere di qualità che viene ricercato nei lieviti vinari ma soprattutto in quelli che devono operare nella vinaccia, è la capacità di liberare aromi primari. E' necessario infatti liberare la molecola odorosa dal legame glicolitico che la tiene ancorata al glucosio e a altri zuccheri nella forma di precursore inodore. L'enzima responsabile di questa attività è una β -glucosidasi. Quelle endogene dell'uva sono poco influenti al fine di conferire aromaticità ad un vino, in quanto hanno bassa attività in condizioni enologiche. Recenti studi hanno dimostrato che oltre all'azione fermentativa i lieviti hanno anche la capacità di idrolizzare più o meno efficacemente l'aglicone dallo zucchero a cui è legato.

Non tutti i lieviti hanno pari attività, infatti quella dei ceppi di appartenenti al gruppo "*Saccharomyces sensu strictu*" è generalmente più bassa di quella dei non-*Saccharomyces*, quali *Hanseniaspora* e *Pichia*, generi presenti sull'acino e che hanno importanza nelle fasi iniziali della fermentazione, prima che *Saccharomyces cerevisiae* prenda il sopravvento.

4.1.3.1 Caratteristiche dell'enzima microbico

Può essere localizzato in tre zone della cellula: all'interno della cellula, immobilizzato sulla parete cellulare o all'esterno. E' stato provato sperimentalmente che gli enzimi che possiedono la maggior attività si trovano sulla parete (Manzanares P. *et al.*,2000). Lo studio delle proprietà delle β -glucosidasiche prodotte dai lieviti di interesse enologico ha permesso di stabilire che l'attività di questi enzimi è influenzata dal pH, dalla temperatura e dalla

concentrazione di glucosio presente nel mezzo di crescita (inibizione competitiva sopra l'1%). L'influenza dell'etanolo (10% v/v) e dell'anidride solforosa (200 ppm) sull'attività enzimatica è invece poco significativa.

In *S. cerevisiae* il picco di attività β -glucosidasi è stato osservato nella fase di crescita esponenziale del lievito (Fia G. *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda il substrato da idrolizzare, è stato osservato che l'attività è minore nei confronti degli alcoli terziari piuttosto che di quelli primari, probabilmente a causa dell'ingombro sterico che queste molecole esercitano sul sito attivo (Spagna G. *et al.*, 2002).

4.1.3.2 Metodi di caratterizzazione dell'attività β -glucosidasi

Esistono una serie di test veloci da realizzare adatti a saggiare un gran numero di ceppi e perciò molto utilizzati nei programmi di selezione. Quasi tutti si basano sulla crescita in piastra in presenza di un substrato in grado di essere attaccato dall'enzima e di produrre una molecola cromogena che viene facilmente rivelata. I principali substrati utilizzati sono i seguenti.

A. Arbutina

Su piastre contenenti arbutina come unica fonte di carbonio le colonie β -glucosidasi positive assumono una colorazione bruna più o meno marcata in base all'intensità dell'attività (Vincenzini M., *et al.* 2005).

B. 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD)

L'enzima è in grado di scindere il legame β -glucosidico tra il glucosio e il 4-metilumbelliferone (MU). Questa molecola fluorescente se irradiata con luce ultravioletta emette ad una lunghezza d'onda percepita nel visibile (260 nm). Le colonie cresciute su piastra che presentano l'attività sono contornate da un alone fluorescente. Il test può essere eseguito anche utilizzando una coltura liquida e quantificando il prodotto fluorescente della reazione mediante uno spettrofluorimetro. E' possibile ottenere un dato quantitativo dell'attività costruendo una retta di taratura in cui il substrato è idrolizzato con quantità crescenti di enzima purificato (Hernández L. F. *et al.*, 2003).

C. 4-nitrofenil- β -D-glucoside (pNPG)

In questo caso l'enzima è in grado di scindere il legame β -glucosidico tra il glucosio e il 4-nitrofenile (pNP). Questa molecola non assorbe la radiazione luminosa gialla presente nel visibile (400nm). Le colonie cresciute su piastra che

presentano l'attività sono contornate da un alone giallo. Il test può essere eseguito anche utilizzando una coltura liquida e quantificando il prodotto della reazione mediante uno spettrofotometro in grado di rilevare il valore di assorbanza a 400nm. E' possibile ottenere un dato quantitativo dell'attività costruendo una retta di taratura in cui il substrato è idrolizzato con quantità crescenti di enzima purificato (Mendes A. *et al.*,2001).

D. Crescita su cellobiosio

Questo metodo utilizza un mezzo selettivo contenente cellobiosio come unica fonte di carbonio. La presenza di attività β -glucosidasica che scinde il legame β 1-4 presente tra le due unità di glucosio che formano il cellobiosio, determina la liberazione di zucchero prontamente assimilabile dal lievito che riesce a svilupparsi formando colonie visibili sulla piastra (Villena *et al.* 2005).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 CEPPI DI LIEVITO

Per il monitoraggio dei caratteri tecnologici e di qualità sono stati considerati un pool di 104 ceppi isolati da vinaccia nelle sperimentazioni precedenti e opportunamente scelti, così suddivisi:

- A-R da 1 a 20: campioni provenienti da vinaccia acidificata di Prosecco, sottoposta a trattamento di refrigerazione, prelevati ai tempi T₄ (dopo 4 giorni dall'insilamento) e T₁₅ (dopo 15 giorni dall'insilamento).
- N-R da 1 a 20: campioni provenienti da vinaccia non acidificata e refrigerata di Prosecco, prelevati a tempi T₄ e T₁₅.
- N-M da 1 a 30: campioni provenienti da vinaccia di Moscato insilata in cantina, prelevati ai tempi T₄ e T₁₅.
- N-P da 1 a 13: campioni provenienti da vinaccia di Prosecco insilata in cantina, prelevati ai tempi T₄ e T₁₅.
- T-V da 1 a 21: campioni provenienti da vinaccia mista stoccata a temperatura non controllata, prelevati a 6 giorni dall'insilamento.

4.2.2 MEZZI COLTURALI

4.2.2.1 Mezzi di propagazione ordinaria

YM - Yeast and Mould (Wickerham L.J., 1951)

Dosi per 1 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 20 g/l di Bacto Agar (Difco).

YPD 20 g (Yeast extract Peptone Dextrose)

- 10 g Estratto di lievito (Oxoid)
- 20 g Peptone (Difco)

20 g Glucosio (Prolabo)

YPD agar

Stessa composizione del mezzo precedente con l'aggiunta di 20 g/l di Bacto Agar (Difco).

4.2.2.2 Mezzi per la determinazione dei caratteri fenotipici dei lieviti

Mezzo nutritivo sintetico (MNS)

Dosi per un litro:

Macroelementi

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

Microelementi

0,2 mg	NaMoO ₄ ·2H ₂ O
0,4 mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,5 mg	H ₃ BO ₃
0,04 mg	CuSO ₄ ·5H ₂ O
0,1 mg	KJ
0,4 mg	FeCl ₃ ·6H ₂ O
0,4 mg	MnSO ₄ ·H ₂ 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 ₄) ₂ SO ₄
0,3 g	(NH ₄) ₂ HPO ₄
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 3,5 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.

YNB (Yeast Nitrogen Base)

Sospendere 6,7 g di mezzo YNB (Difco) in 1 litro di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

YNB Cellobiosio agar

Dosi per in 1 litro:

6,7 g YNB (Difco)

5 g Cellobiosio (Fluka- Sigma)

20 g Bacto Agar (Difco)

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

4.2.3 PROVE DI FERMENTAZIONE IN MOSTO SINTETICO

4.2.3.1 Preparazione dell'inoculo

L'inoculo è stato preparato stemperando la patina ottenuta da una coltura cresciuta in terreno YM in 10 ml di MNS fino al raggiungimento di una OD600 di 1,5 che corrisponde a circa $1,5 \times 10^6$ cellule/ml. Cinque ml della sospensione così ottenuta sono stati inoculati in beuta contenente 95 ml di MNS ed incubata a 25°C.

4.2.3.2 Monitoraggio del calo in peso delle beute

Il calo in peso dovuto alla perdita di CO₂ delle beute allestite per prove di fermentazione in MNS è stato monitorato giornalmente e sono stati scelti come parametri di confronto tra i ceppi il calo in peso a 2 giorni, a 7 giorni e a fine fermentazione. La misura registrata è stata convertita in quantità di glucosio

consumato mediante moltiplicazione di ciascun valore per il fattore di conversione 2,118 (Delfini C., 1995).

4.2.3.3 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 millimetri.

4.2.4 PRODUZIONE DI IDROGENO SOLFORATO

Ciascun isolato è stato seminato su terreno Biggy agar (OXOID) 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.

4.2.5 TEST DI RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA

4.2.5.1 Preparazione della brodocoltura

I lieviti sono stati coltivati in YM 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 incubare per 30 ore a 25 °C in modo da ottenere una coltura in fase stazionaria (circa 10^7 cellule/ml).

4.2.5.2 Allestimento del test

In una provetta tipo Falcon è stata diluita 1:5 una soluzione acquosa di anidride solforosa (10 g/l) con mosto sintetico.

In provette tipo Falcon si è proceduto alle aggiunte come riportato in tabella in modo da ottenere un inoculo di circa 10^6 cellule/ml per ogni concentrazione di anidride solforosa testata.

Concentrazione SO ₂ (mg/l)	Volume di mosto sintetico (ml)	Volume di coltura diluita (ml)	SO ₂ (1 gr/l) (ml)
0	10	0,1	-
50	9,75	0,1	0,25
100	9,5	0,1	0,5
200	9	0,1	1

La crescita è stata osservata a 24 e a 48 ore registrando la presenza di torbidità nel mezzo liquido e misurando l' OD600.

4.2.6 CRESCITA SU CELLOBIOSIO

4.2.6.1 Ceppi di lievito

Sono stati utilizzati come controlli positivi i seguenti ceppi:

Specie microbica	Ceppo	Provenienza*
<i>Dekkera anomala</i>	DSM 70727	DSMZ
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	CBS 822	CBS

I ceppi di lievito isolati da vinaccia sono elencati nel paragrafo 4.2.1.

4.2.6.2 Allestimento del test

I ceppi di lievito sono stati cresciuti in liquido in provette tipo Falcon da 50 ml contenenti 10 ml di YPD liquido, ad una temperatura di 30° C per 24 ore.

La coltura è stata centrifugata per 5 minuti a 5500 rpm. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 10 ml di YNB, terreno privo di fonti di carbonio, e lasciato a 30° C alla massima agitazione per 6 ore, con lo scopo di consumare gli zuccheri residui.

Cinque µl di coltura sono stati trasferiti su piastre contenenti YNB Cellobiosio agar e il liquido è stato spalmato per ottenere una crescita a colonia singola. Le piastre sono state incubate a 30° C per 10 giorni, dopo i quali è stato valutato il livello di crescita. Come controllo positivo 5 µl di coltura in YNB sono stati trasferiti anche su piastre contenenti terreno YM.

4.2.7 TEST IN FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA

4.2.7.1 Ceppi di lievito

Per la messa a punto del test per la valutazione dell'attività β -glucosidasica sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Specie microbica	Ceppo	Provenienza*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T (ATCC 18824).	DSMZ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	444	Vason
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4-00-041	DBA
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	CBS 821 (ATCC 11313)	CBS
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	PC99	DBA

*CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg

DBA: Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Padova, Italia.

4.2.7.2 Condizioni di crescita dei ceppi di lievito

I ceppi di lievito da analizzare sono stati cresciuti per 48 ore 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 40% conservati a -80°C. Successivamente le piastre sono state conservate a 4°C.

4.2.7.3 Test in piastra

Le prove su piastra sono state effettuate utilizzando i terreni di coltura YM, YPD 5g, YPD 20 g, e Mezzo nutritivo sintetico (MNS) a pH 3,5. Sulla superficie del terreno agarizzato sono stati stesi 20µl di substrato MUD (4-metilumbelliferil-β-D- glucopiranoside, SIGMA-Aldrich). La soluzione di MUD 37 mmol/l in acqua sterile, è stata preparata a partire da uno stock 148 mmol/l in dimetilformammide. I lieviti presi in esame sono stati inoculati in piastra secondo due modalità:

- a) è stata prelevata, da una coltura cresciuta in piastra, una certa quantità di cellule e inocolata sulla piastra mediante piccoli strisci e spot.
- b) sono stati versati sulla piastra 20µl di coltura liquida, cresciuta in YM per 24 ore.

Le piastre inoculate sono state incubate a 25°C per 24 o 48h, successivamente sono state osservate al transilluminatore UV e fotografate con il sistema EDAS (Kodak).

4.2.7.4 Inoculo per il test in liquido

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 inoculata 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 ore.

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 10^6 cellule/ml. Le provette tipo Falcon sono state incubate in agitazione a 30°C.

Dopo 24 ore di crescita in MSN è stata misurata la densità ottica a 600 nm. Le colture con densità ottica compresa tra 1,7-1,9 sono state utilizzate per eseguire il test in microtiter, quelli con valori di densità ottica inferiore sono stati lasciati in incubazione fino al raggiungimento del valore desiderato.

4.2.7.5 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

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) e filtrare.

Soluzione stock di MUD (4-metilumberilliferone β-D-glucopiranoside, Fluka) 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 (metilumbelliferone, Sigma) 1 mM: pesare 19,8 mg di polvere, sciogliere in 100 ml di acqua distillata e filtrare.

4.2.7.6 Test in microtiter

Un volume (50, 100, 200, 300, 500, 1000 o 2000 μ l) di coltura di lievito cresciuta 24 ore a 30°C nell'opportuno mezzo di crescita (YPD 5g, YPD 20g, o MNS) è stato centrifugato a 14000 rpm per 3 minuti. Dopo aver drenato il surnatante le cellule sono state risospese in buffer acetato di sodio (NaAc 0.05M, pH 3,5 o 5,0) e ogni campione trasferito nella piastra microtiter da 96 pozzetti (Greiner Biotech). Cinquanta μ l di substrato MUD 0.76 mmol/l in acetato di sodio 0.05 mM sono stati aggiunti alle cellule risospese. Successivamente i campioni sono stati incubati a 37°C per 5, 10 o 20 minuti, quindi la reazione è stata bloccata aggiungendo 50 μ l di NaHCO₃ saturo. Al termine si è proceduto alla lettura della fluorescenza emessa allo spettrofluorimetro (Spectrafluor Tecan), utilizzando per l'eccitazione un filtro a 390 nm e per rilevare l'emissione un filtro a 465 nm, e secondo diverse modalità, ossia in presenza o meno delle cellule di lievito. Nel primo caso è stata eseguita una misura della soluzione tal quale, nel secondo caso prima di trasferire la soluzione in microtiter è stata eseguita una centrifugazione a 14000 rpm per 3 minuti.

4.2.7.7 Retta di taratura

La retta di taratura è stata costruita utilizzando la molecola fluorescente MU (4-metilumbelliferone sale di sodio, SIGMA-Aldrich) che emette luce a 460 nm quando viene eccitata a 365 nm. In provette tipo Eppendorf da 2 ml sono state preparate soluzioni a concentrazione crescente di MU da utilizzare direttamente in triplicato. Per ogni replica a 50 μ l di acqua milliQ sterile sono stati aggiunti 50 μ l delle soluzioni contenenti le diverse concentrazioni di MU (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) preparate in precedenza in acetato di sodio (pH 5,0) e 50 μ l di NaHCO₃ saturo.

Le soluzioni sono state poi trasferite nei pozzetti al momento dell'esecuzione del test. I dati misurati allo spettrofluorimetro sono forniti in unità di fluorescenza. Tramite l'equazione della retta ottenuta è stato possibile esprimere l'attività enzimatica dei ceppi analizzati in micromolarità.

4.2.8 ANALISI FATTORIALE DISCRIMINANTE

L'analisi fattoriale 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 fattoriale discriminante (CDA) è stata eseguita per analizzare le differenze tra le diverse classi di origine e trattamento della vinaccia utilizzando le seguenti variabili: glucosio a 2gg, a 7gg, durata della fermentazione, altezza della schiuma, odore, resistenza all'anidride solforosa a 50 e 100 mg/l, crescita su terreno biggy, crescita su cellobiosio, attività β -glucosidasica misurata a pH 3,5 e a pH 5,0.

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 XLSTAT 2007statistical software (Addinsoft).

4.3 RISULTATI

4.3.1 SCELTA DEI LIEVITI

Lo studio delle dinamiche di popolazione di lieviti presenti nella vinaccia direttamente insilata o sottoposta a trattamenti per la conservazione, descritto nei capitoli precedenti, ha consentito di ottenere una collezione di ceppi *Saccharomyces cerevisiae* isolati da campionamenti a 4 e 15 giorni di stoccaggio, quando si verifica il massimo dell'attività fermentativa. Ciascun ceppo è stato scelto in base ai risultati dell'analisi del DNA mitocondriale, individuando un candidato per ciascun profilo ottenuto, rappresentato possibilmente da più di un individuo.

Dalla sperimentazione condotta su vinacce insilate direttamente in cantina sono stati considerati 30 campioni di Moscato, nominati NM 1-30, e 13 di Prosecco (NP 1-13). Venti ceppi (AR 1-20) provengono da vinacce di Prosecco acidificate prima dell'insilamento, altri 20 (NR 1-20) sono stati ottenuti nella stessa sperimentazione ma da un campione di vinaccia senza acidificazione. Infine 21 campioni nominati TV 1-21 provengono da una sperimentazione condotta in un lavoro precedente, che ha previsto il monitoraggio di vinacce miste insilate in distilleria in contenitori di plastica con capacità di svariati quintali e lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici. In questo caso è stato riscontrato nei sacchi un notevole aumento della temperatura (fino a 40°C) al momento dell'isolamento dei lieviti.

4.3.2 CRESCITA IN MOSTO SINTETICO

I 104 ceppi scelti sono stati cresciuti simulando condizioni enologiche. Ciascun individuo è stato inoculato ad una concentrazione di circa $1,5 \times 10^6$ ufc/ml in una beuta contenente 100 ml di mosto sintetico e sono stati valutati i principali caratteri tecnologici. Il vantaggio di utilizzare mosto sintetico, rispetto a quello naturale, per una 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. Una caratteristica che dipende dal tempo di generazione del ceppo. E' stata valutata registrando il calo in peso a 2 giorni

dall'inoculo. Come conferma è stato considerato anche il calo in peso a 7 giorni. In questo modo è stato possibile valutare la capacità di adattamento (in termini di nutrienti, pressione osmotica) di ciascun ceppo a condizioni tipicamente enologiche. Infine è stata valutata anche la durata della fermentazione alcolica. Questo parametro, espresso in giorni necessari per portare la quantità di zuccheri a zero oppure ad un residuo che il lievito non riesce a ridurre ulteriormente, considera l'andamento totale della fermentazione, sia la fase iniziale di adattamento che la fase finale condizionata dalla quantità di etanolo crescente che può disturbare in modo variabile da ceppo a ceppo la conclusione del processo. 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 (200g/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 (300g/l) (Delfini C., 1995). Nell'ambiente vinaccia la valutazione del potere fermentativo della microflora di lieviti indigeni non rappresenta un aspetto così significativo in quanto la quantità di zuccheri presenti nella matrice vegetale è inferiore rispetto a quella presente nel mosto naturale. Inoltre i 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), valori sicuramente accettabili per uno sviluppo ottimale nelle vinacce. Durante la crescita in mosto è stata valutata anche la modalità di sviluppo del lievito: polverulento, flocculento o in aggregati.

Un altro carattere importante che è stato preso in considerazione è la capacità schiumogena. L'elevata produzione di schiuma generalmente è una caratteristica molto negativa, tecnologicamente improponibile in cantina, poiché causerebbe la fuoriuscita del mosto dai tini di fermentazione una volta avviato lo sviluppo dei lieviti. E' legato alla idrofobicità delle cellule e alla loro tendenza al galleggiamento caratteristica dei ceppi polverulenti e flocculenti.

Viene considerato un carattere positivo nel caso di rifermentazioni in autoclave, in quanto in situazioni di sovra pressione rallenta la precipitazione sul fondo delle cellule che mostrano perciò un maggior vigore fermentativo (Zambonelli, 2003).

Accanto alle precedenti caratteristiche tecnologiche è stato preso in considerazione anche un carattere che non influenza la tecnica di produzione, ma la qualità del prodotto: la sintesi di idrogeno solforato. Questo composto è sempre prodotto dai lieviti perché parte integrante del loro metabolismo, ma se sintetizzato in quantità elevate fa assumere al vino il caratteristico odore di uova marce. Nei vini il suo intervallo è ampio da pochi microgrammi fino ad alcuni milligrammi. Si produce dalla riduzione dei solfati, in parte si lega all'acetilmoserina 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).

Allo scopo di verificare l'effetto dell'idrogeno solforato sulla componente aromatica prodotta dal lievito a fine fermentazione è stata fatta una valutazione olfattiva del mosto sintetico fermentato con particolare attenzione all'eventuale presenza del caratteristico odore di uova marce, facilmente identificabile.

Per quanto riguarda la determinazione del vigore fermentativo, in figura 4.1 e 4.2 sono riportate le distribuzioni relative al consumo di zuccheri (calcolati a partire dal calo in peso) a due giorni dall'inoculo. Il ceppo NM22 non è presente nell'analisi in quanto si è verificato un errore durante la misurazione del peso proprio al secondo giorno di fermentazione. In relazione alle vinacce di Prosecco gli isolati provenienti dalla stessa matrice vegetale che ha in parte subito il processo di acidificazione (AR e NR) presentano un range di valori molto simile (compreso tra 3,82 e 6,40g di glucosio trasformato per 100g di mezzo). In particolare per NR la distribuzione evidenzia due classi di maggior frequenza (75%) comprese tra 5 e 6g, per AR il 95% dei campioni consuma una quantità di zuccheri compresa tra 5 e 6,5g. Infine considerando la medesima varietà vegetale le cui vinacce sono state insilate direttamente in cantina (NP) la maggior parte

degli isolati (84,6%) presentano valori compresi tra 5,5 e 7g. Un solo isolato si scosta mostrando uno spiccato vigore fermentativo (8,34g). Una situazione abbastanza simile si osserva analizzando i ceppi provenienti dalle vinacce miste (TV) in cui il range di valori è compreso tra 3,42 e 6,59g, mentre la classe di maggior frequenza (57,1%) è caratterizzata da valori inferiori (4,5 e 5g) rispetto alle precedenti. I lieviti provenienti dalle vinacce di Moscato (NM) presentano le caratteristiche migliori con un intervallo di valori compreso tra 5 e 8,17g.

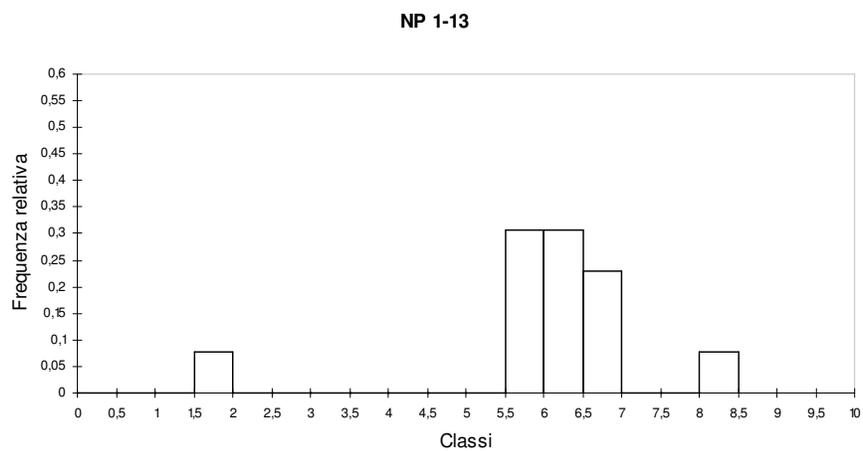
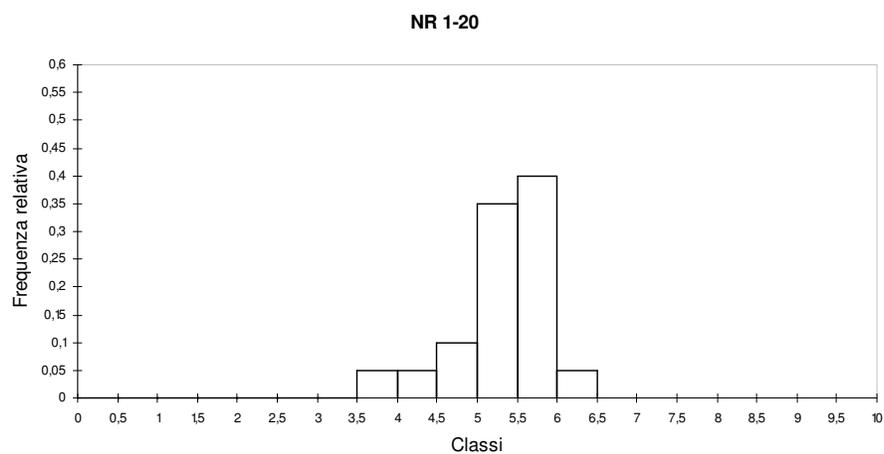
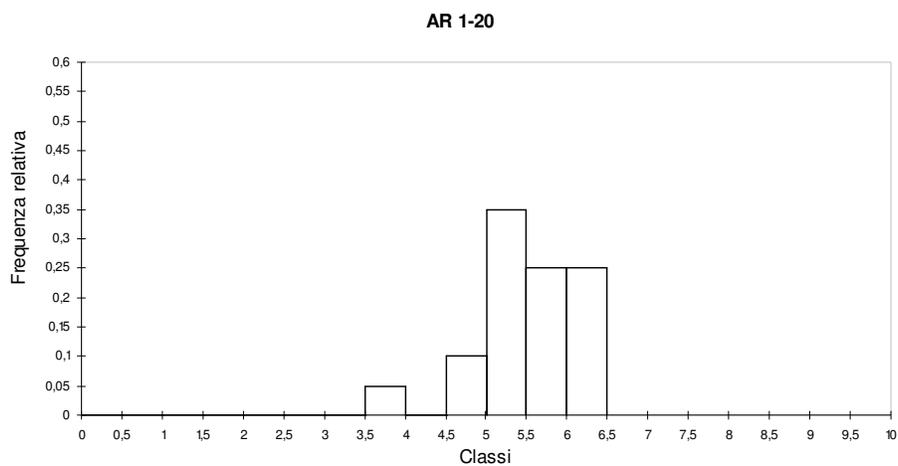


Fig. 4.1 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, del glucosio consumato, espresso in g per 100g di mosto sintetico, dopo due giorni di fermentazione, dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

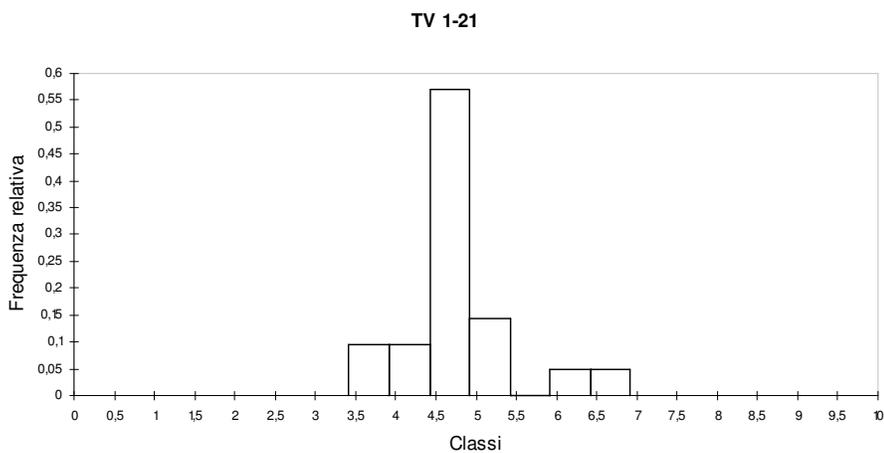
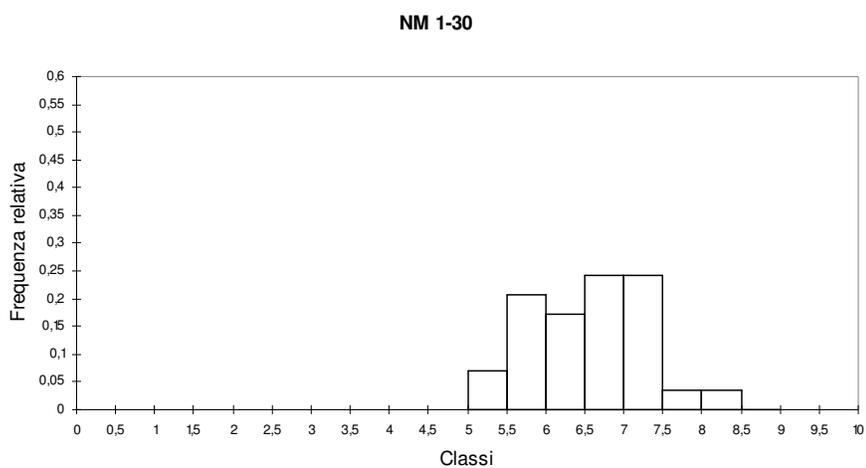


Fig. 4.2 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, del glucosio consumati, espresso in g per 100g di mosto sintetico, dopo due giorni di fermentazione, dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

I dati relativi alla quantità di glucosio consumato dopo sette giorni di fermentazione (fig. 4.3 e 4.4) confermano i risultati ottenuti dopo due giorni. Gli isolati provenienti dalle vinacce di Prosecco (AR, NR e NP) e miste (TV) mostrano un intervallo di valori compreso tra 12,85 e 18,16g, mentre quelli presenti nelle vinacce di Moscato mostrano valori compresi tra 13,80 e 24,7g, confermando le migliori performance di fermentazione evidenziate per questi ceppi già a due giorni.

Il monitoraggio del calo in peso è continuato per 18 giorni, un tempo che nel settore enologico abbondantemente copre la durata di una fermentazione standard. Nella determinazione del parametro giorni totali di fermentazione (fig. 4.5 e 4.6) i ceppi che avrebbero richiesto tempi maggiori sono stati raggruppati nella classe “20 giorni” che comprende perciò gli individui più lenti e meno interessanti. Come già osservato nelle determinazioni precedenti i lieviti provenienti dalle vinacce di Prosecco hanno caratteristiche inferiori rispetto a quelli provenienti dalle vinacce miste TV (in cui 2 ceppi, 9,5% del totale, concludono la fermentazione dopo 11 giorni) e soprattutto da Moscato NM (in cui 4 ceppi, 13,3% del totale, concludono la fermentazione in 10 e 11 giorni). E’ interessante sottolineare, inoltre, che indipendentemente dalla matrice di provenienza la classe di maggior frequenza è 15 giorni. I ceppi che hanno il comportamento peggiore provengono dalle vinacce di Prosecco AR e NR in cui la classe contenente ceppi che hanno lasciato un residuo di zuccheri è più numerosa (5 isolati costituenti il 25% del totale).

Infine è interessante notare, come si può osservare dai grafici che confrontano il vigore fermentativo con la durata della fermentazione (fig. 4.7 e 4.8), che non sempre i ceppi che possiedono il maggior vigore fermentativo chiudono la fermentazione nel numero minore di giorni. Questo è dovuto al fatto che una buona parte degli zuccheri viene consumata quando il lievito è già in fase stazionaria e in questa fase il metabolismo può rallentare molto, in relazione alla tossicità provocata dall’etanolo a cui i ceppi sono diversamente sensibili. Il ceppo NM9, pur non mostrandosi affatto vigoroso, si colloca in posizione intermedia per quanto riguarda la durata della fermentazione degradando tutti gli zuccheri in 17 giorni.

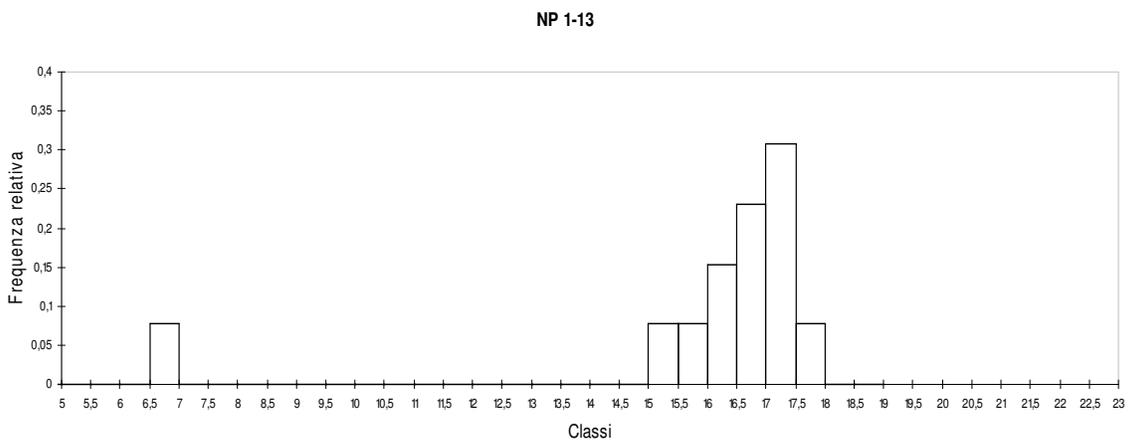
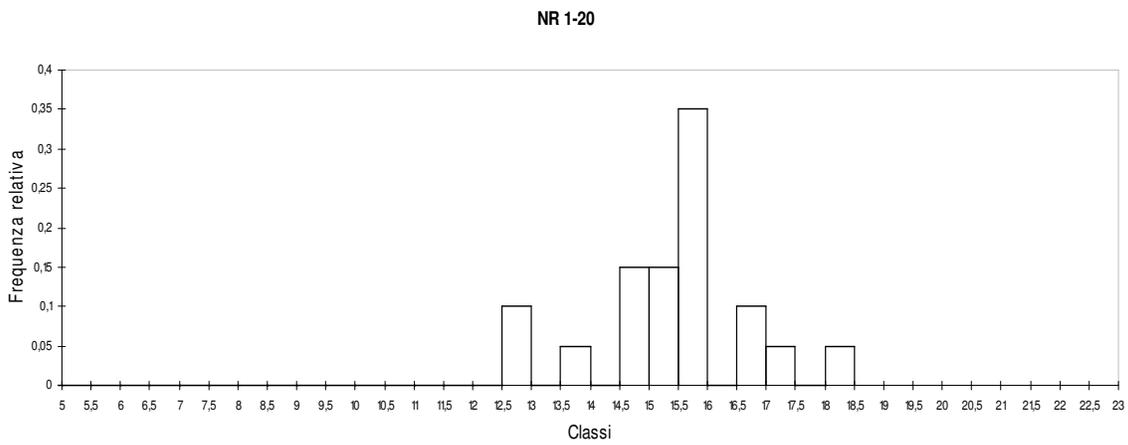
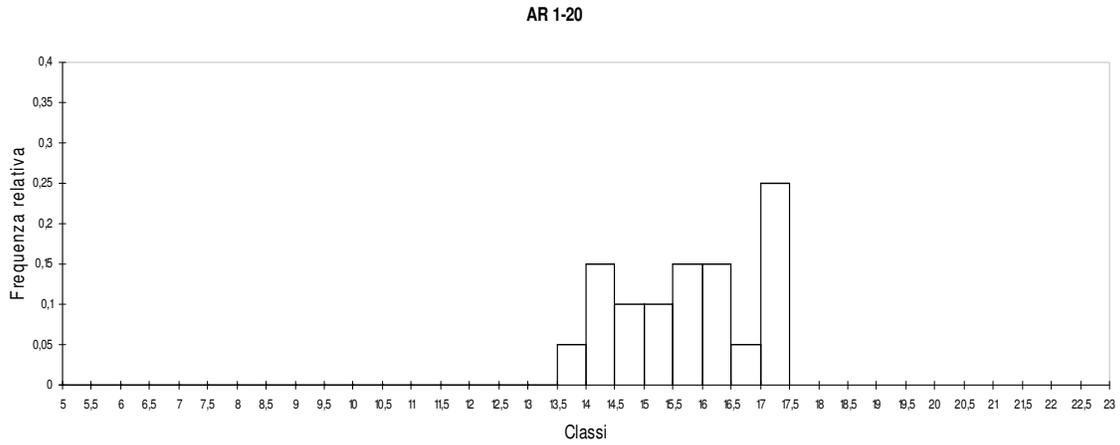
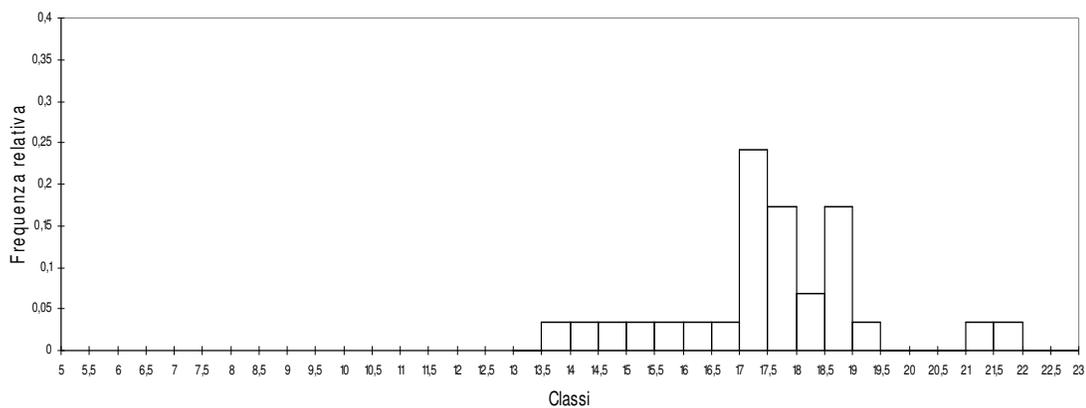


Fig. 4.3 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, del calo in peso, espresso come grammi di glucosio consumati, dopo sette giorni di fermentazione in mosto sintetico, dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

NM 1-30



TV 1-21

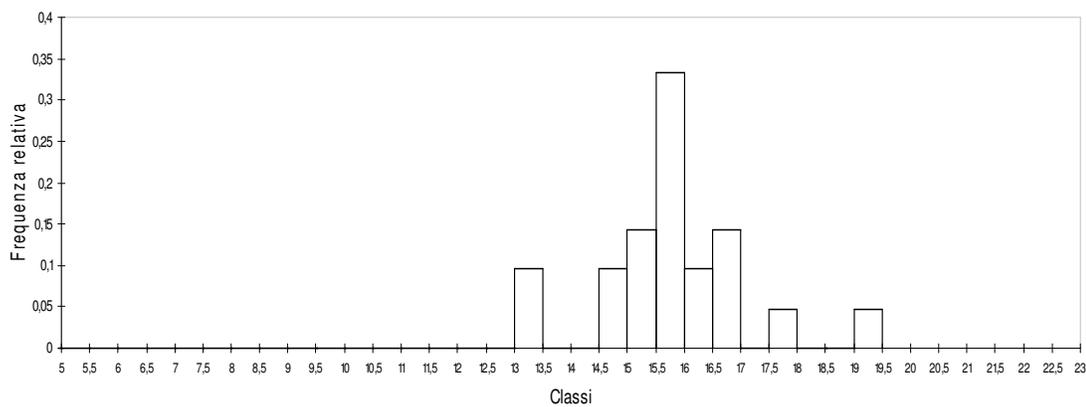


Fig.4.4 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, del calo in peso, espresso come grammi di glucosio consumati, dopo sette giorni di fermentazione in mosto sintetico, dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

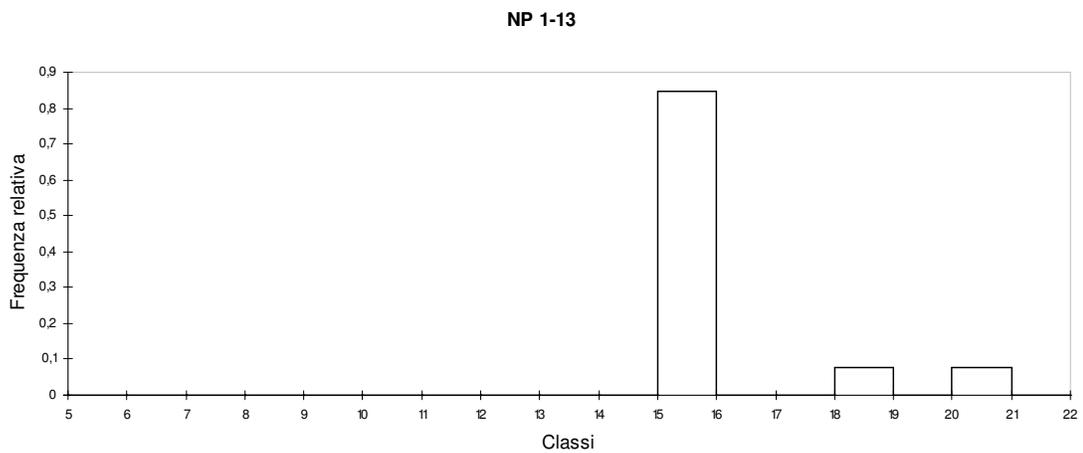
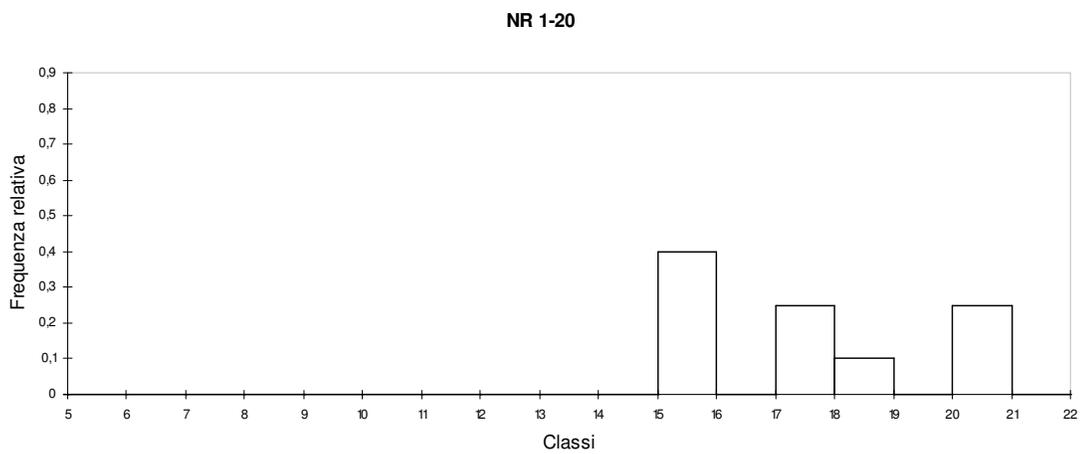
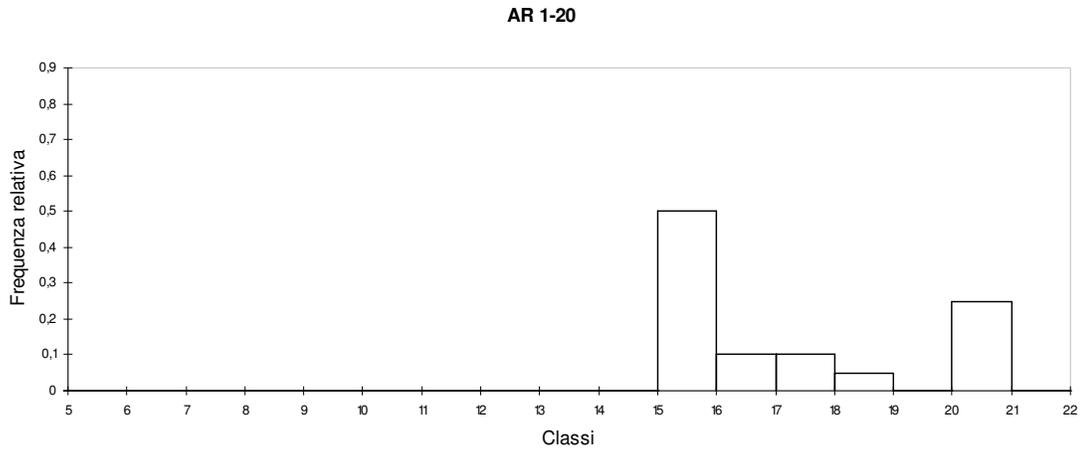


Fig. 4.5 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della durata di fermentazione in mosto sintetico, espressa in giorni, dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

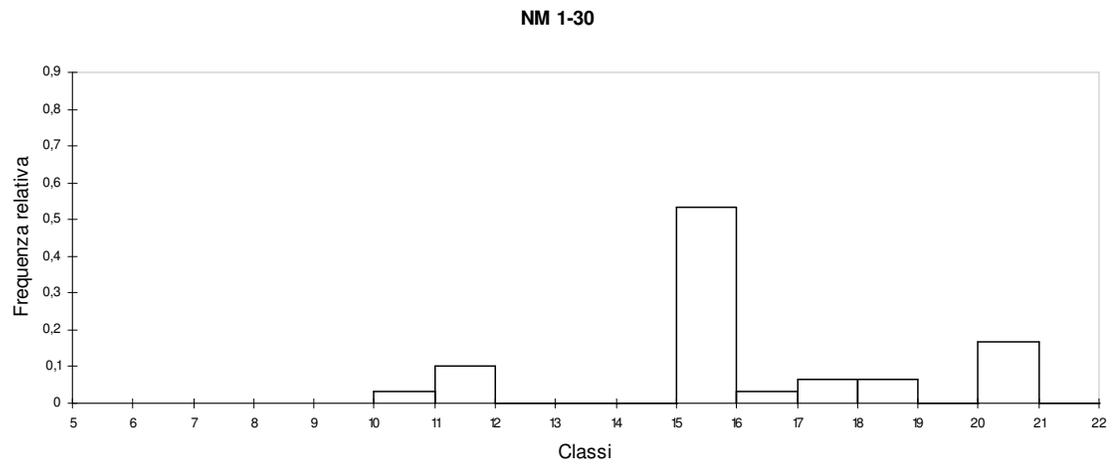
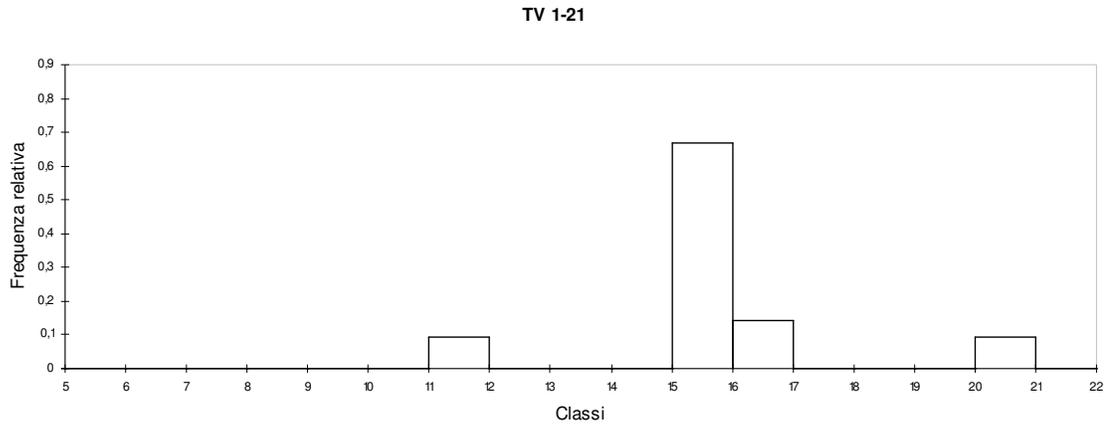


Fig. 4.6 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della durata della fermentazione in mosto sintetico, espressa in giorni, dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

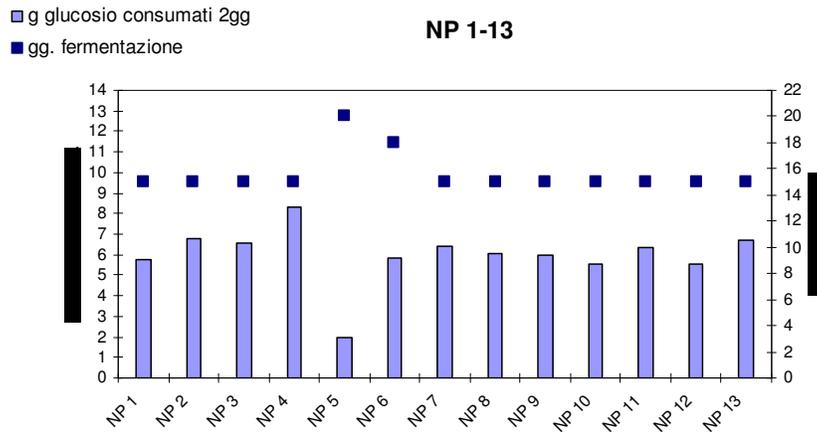
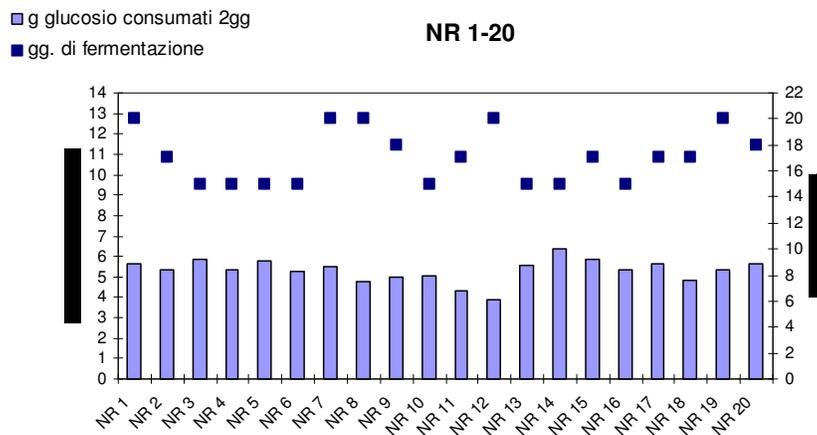
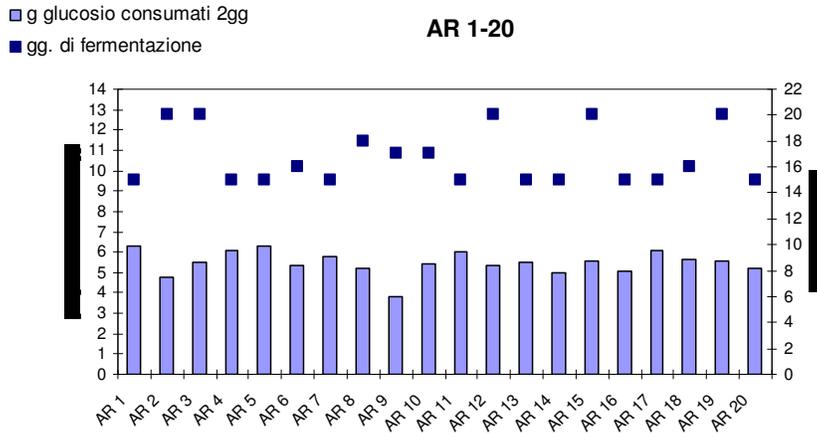
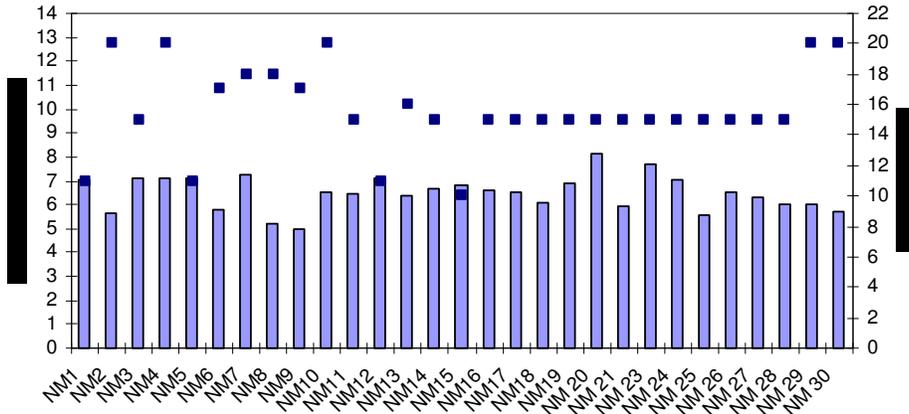


Fig.4.7 Confronto tra glucosio consumato a due giorni, espresso in g per 100g di mosto sintetico, e durata della fermentazione, espressa in giorni, dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

■ g glucosio consumati 2gg
 ■ gg. fermentazione

NM 1-30



■ g glucosio consumati 2gg
 ■ gg. fermentazione

TV 1-21

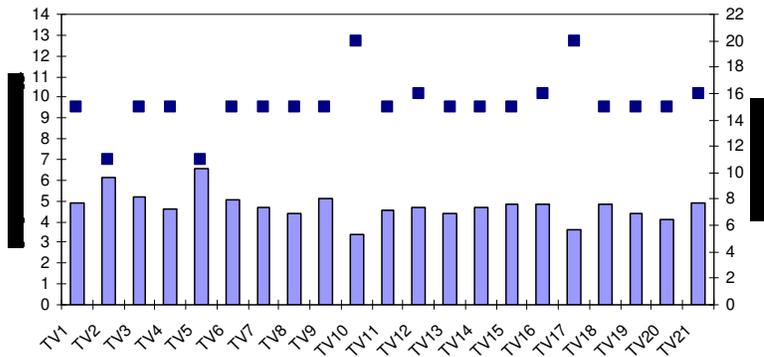


Fig. 4.8 Confronto tra glucosio consumato a due giorni, espresso in g per 100g di mosto sintetico, e durata della fermentazione, espressa in giorni, dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

Considerando i dati relativi alla produzione di schiuma (fig. 4.9 e 4.10) si può osservare come gli isolati provenienti dalle diverse matrici vegetali e tipologie di trattamento si comportino in modo simile. E' possibile evidenziare due diverse situazioni: in una il range di valori ottenuti è compreso tra 1 e 16 mm (AR e NR), nell'altro caso l'intervallo è più ridotto tra 4 e 17 mm (NM, NP e TV). Inoltre mentre nelle vinacce TV e NM e AR è possibile individuare delle classi di maggior frequenza (rispettivamente 11-13 mm, 10-11mm e 7-8, 10-11 mm) nel caso di NR i valori osservati si distribuiscono in modo molto più uniforme nelle diverse classi. Non si individua perciò nessun tipo di relazione tra questo carattere e il trattamento tecnologico eseguito o la matrice vegetale. I ceppi a maggior produzione di schiuma, con valori compresi tra 21-24 mm sono stati osservati nelle vinacce NR, NM, NP e risultano una percentuale molto bassa rispetto al totale delle singole popolazioni analizzate (rispettivamente 5%, 3,3%, 7,7%).

In relazione alle modalità di sviluppo (fig. 4.11) la maggior parte dei ceppi, indipendentemente dalla matrice vegetale e dal trattamento, presenta uno sviluppo polverulento. Questa situazione si sovrappone a quanto riportato in letteratura, in cui la dominanza numerica di ceppi polverulenti in ambiente enologico è una situazione nota (Vincenzini *et al.*, 2005). Tra le diverse tipologie è quella tecnologicamente preferita perché associata ad un maggior vigore fermentativo (Zambonelli, 2003). In relazione allo sviluppo polverulento la percentuale maggiore è stata riscontrata negli isolati provenienti dalla vinaccia di Prosecco, indipendentemente dal trattamento, e in particolare il valore più elevato è stato osservato nelle vinacce insilate in cantina (NP). Dalle vinacce miste (TV) sono stati isolati il maggior numero di ceppi flocculenti (29% del totale per questa matrice) mentre soltanto nelle vinacce di Moscato è presente una piccola percentuale di lieviti che si sviluppano in forma aggregata (6,7% del totale in questa matrice).

Infine, i prodotti di fermentazione sono stati sottoposti ad analisi olfattiva (tab. 4.1 e 4.2) principalmente per rilevare la presenza di difetti grossolani legati all'eccessiva produzione di alcuni composti secondari particolarmente sgradevoli, soprattutto acido acetico e solfidrico. Tra i ceppi provenienti dalle vinacce di Prosecco stoccate direttamente in cantina (NP) il 61% ha ottenuto un giudizio

positivo, percentuali simili (rispettivamente 55% e 53%) sono state riscontrate per i ceppi provenienti dalle vinacce di Prosecco non acidificate (NR) e Moscato (NM), mentre il 47% dei fermentati prodotti dagli isolati da matrice mista (TV) è stato valutato positivamente. I risultati peggiori sono stati ottenuti dai ceppi provenienti da vinacce di Prosecco acidificate (AR) in cui solo il 35% è risultato positivo all'analisi olfattiva. L'esito dell'indagine indica che le caratteristiche olfattive dei fermentati non sono in relazione con il tipo di matrice o di trattamento tecnologico utilizzato, e neppure con le performance di fermentazione. Infine il maggior numero di ceppi che non solo ha ottenuto un giudizio positivo ma il cui fermentato si è distinto perché dotato di intense note aromatiche, è stato osservato nel gruppo di lieviti provenienti da vinacce di Prosecco non acidificate, che tuttavia non spiccava per le caratteristiche di fermentazione.

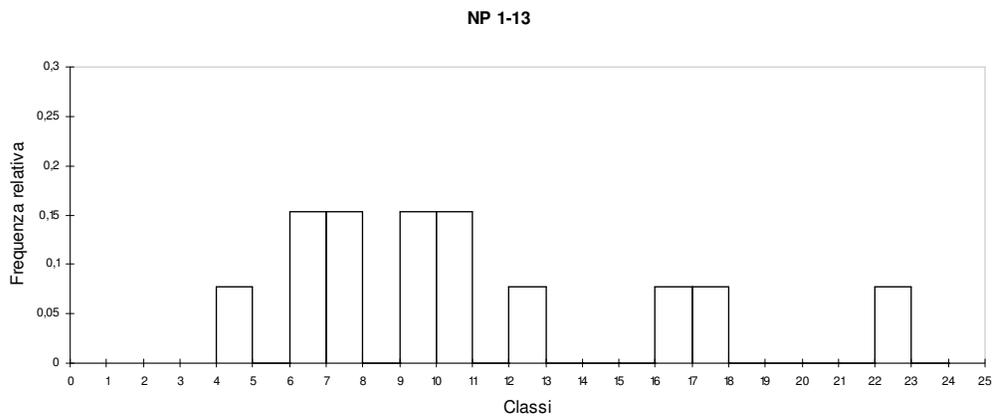
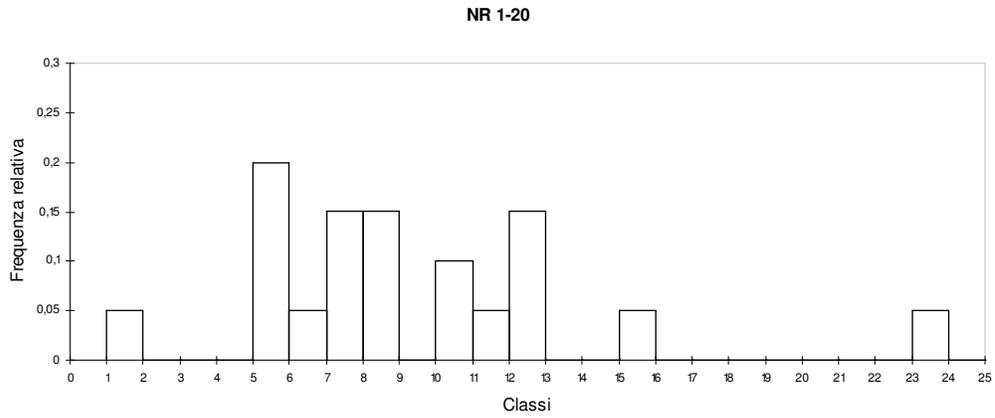
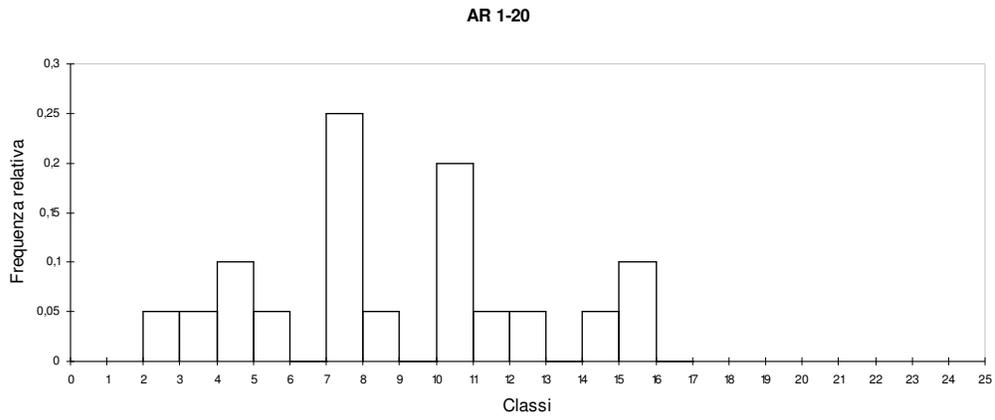


Fig. 4.9 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della produzione di schiuma, espressa in mm, durante la fermentazione in mosto sintetico dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

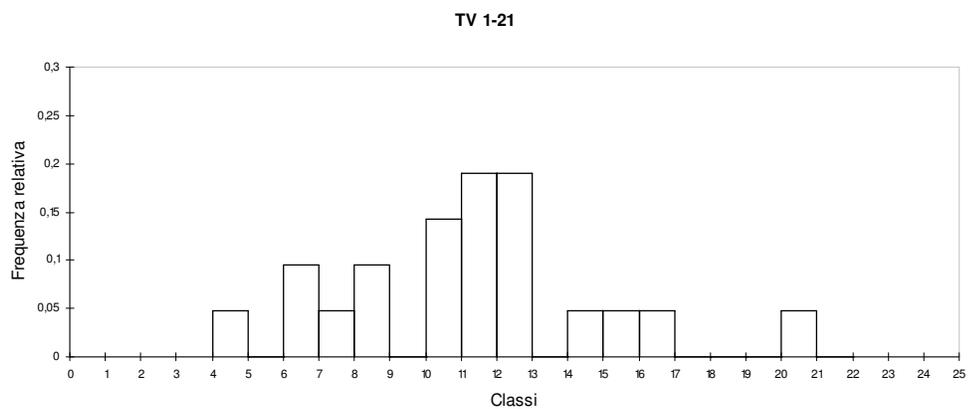
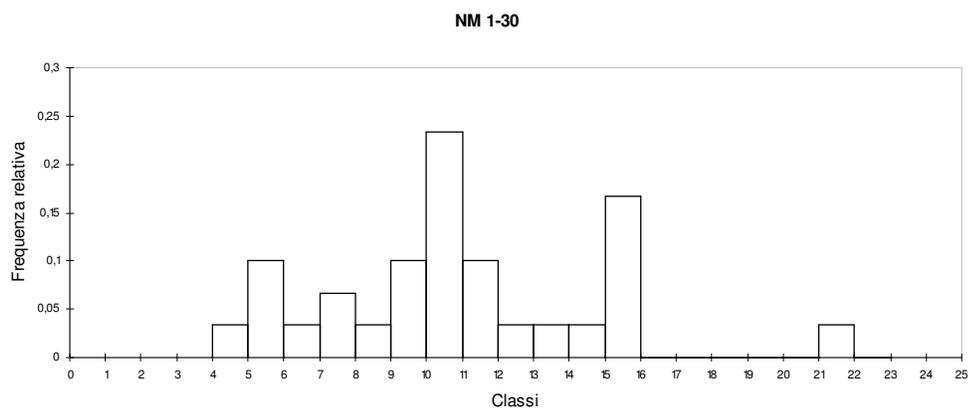


Fig. 4.10 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della produzione di schiuma, espressa in mm, durante la fermentazione in mosto sintetico dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

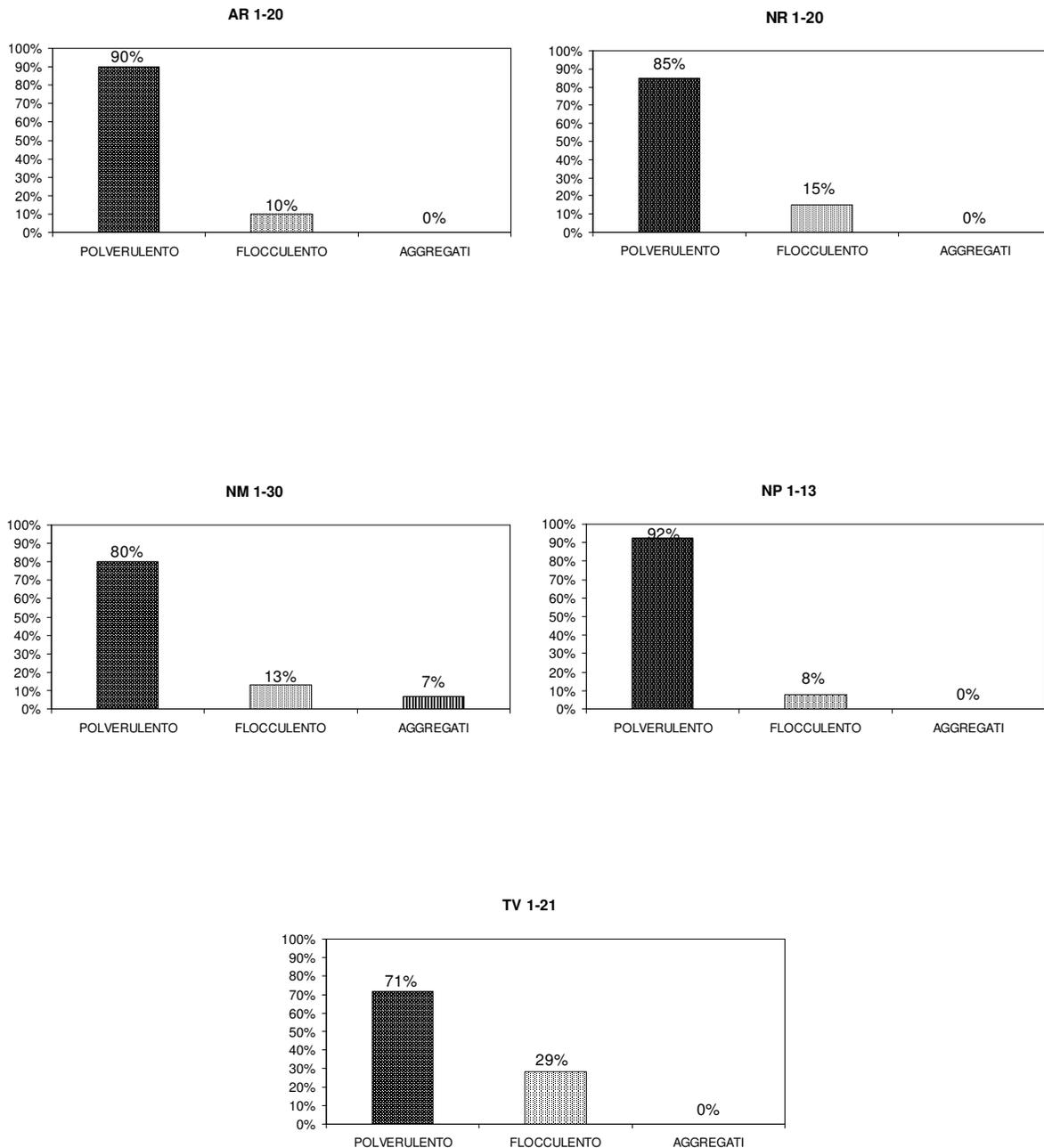


Fig. 4.11 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della modalità di sviluppo durante la fermentazione in mosto sintetico, dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non acidificate (NR), di Moscato (NM) e di Prosecco (NP) insilate direttamente in cantina, e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

Lievito	Valutazione olfattiva	Note
AR 1	Negativa	Odore di zolfo
AR 2	Negativa	Odore di zolfo
AR 3	Positiva	Leggermente pungente
AR 4	Positiva	Lieve odore vinoso
AR 5	Negativa	Odore di frutta stramatura
AR 6	Negativa	Odore di zolfo
AR 7	Positiva	Note aromatiche positive, odore di mandorla
AR 8	Negativa	Presenza di ossidazione
AR 9	Positiva	Note aromatiche positive, odore di mandorla
AR 10	Positiva	Note vegetali
AR 11	Negativa	Presenza di ossidazione
AR 12	Negativa	Odore di zolfo
AR 13	Positiva	Note aromatiche positive
AR 14	Negativa	Presenza di ossidazione
AR 15	Negativa	Odore di zolfo
AR 16	Negativa	Odore di zolfo
AR 17	Negativa	Odore sgradevole
AR 18	Negativa	Odore sgradevole
AR 19	Negativa	Odore di zolfo
AR 20	Positiva	Lieve presenza di ossidazione
NR 1	Negativa	Odore di zolfo
NR 2	Negativa	Odore di aceto
NR 3	Positiva	Note aromatiche positive, lievemente floreali
NR 4	Negativa	Odore di zolfo
NR 5	Positiva	Note aromatiche positive
NR 6	Negativa	Odore di zolfo
NR 7	Positiva	Note aromatiche positive
NR 8	Positiva	Note aromatiche positive
NR 9	Positiva	Lievemente ossidato
NR 10	Positiva	Lievemente ossidato
NR 11	Negativa	Odore di zolfo
NR 12	Negativa	Odore di zolfo
NR 13	Positiva	Lieve odore di zolfo
NR 14	Negativa	Pungente, lieve odore di zolfo
NR 15	Positiva	Intense note aromatiche positive
NR 16	Negativa	Odore di zolfo
NR 17	Positiva	Neutro senza difetti
NR 18	Negativa	Odore di zolfo
NR 19	Positiva	Note aromatiche positive
NR 20	Positiva	Note aromatiche positive
NP 1	Positiva	Odore poco percepibile, privo di difetti, lieve presenza di ossidazione
NP 2	Positiva	Lieve presenza di ossidazione
NP 3	Negativa	Lieve presenza di ossidazione, odore di mandorla
NP 4	Positiva	Neutro senza difetti
NP 5	Positiva	Odore poco percepibile, fruttato
NP 6	Positiva	Lieve presenza di ossidazione
NP 7	Positiva	Nota aromatica positiva
NP 8	Negativa	Odore di frutta stramatura
NP 9	Positiva	Neutro senza difetti
NP 10	Negativa	Forte odore di zolfo
NP 11	Negativa	Odore di zolfo
NP 12	Positiva	Nota aromatica positiva
NP 13	Negativa	Pungente

Tab. 4.1 Analisi olfattiva dei fermentati ottenuti in mosto sintetico prodotti dai ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), e insilate direttamente in cantina (NP).

Lievito	Valutazione olfattiva	Note
NM1	Negativa	Forte odore di aceto
NM2	Negativa	Odore di aceto
NM3	Negativa	Odore di aceto
NM4	Positiva	Sentore di pane, presenza di ossidazione
NM5	Positiva	Neutro senza difetti
NM6	Negativa	Lieve odore di aceto
NM7	Positiva	Lieve odore di aceto
NM8	Positiva	Presenza di ossidazione
NM9	Negativa	Odore di zolfo
NM10	Negativa	Odore di zolfo
NM11	Positiva	Nota aromatica positiva
NM12	Positiva	Neutro senza difetti
NM13	Positiva	Lieve presenza di ossidazione
NM14	Positiva	Nota aromatica positiva
NM15	Positiva	Odore vinoso
NM16	Negativa	Odore di zolfo
NM17	Positiva	Neutro senza difetti
NM18	Positiva	Speziato (zafferano)
NM19	Positiva	Odore vinoso
NM 20	Negativa	Odore di aceto
NM 21	Positiva	Lieve presenza di ossidazione
NM 22	Positiva	Neutro senza difetti
NM 23	Negativa	Odore poco intenso, pungente, lievemente ossidato
NM 24	Negativa	Odore di zolfo
NM 25	Positiva	Odore poco intenso
NM 26	Negativa	Odore poco percepibile
NM 27	Negativa	Presenza di ossidazione
NM 28	Negativa	Presenza di ossidazione
NM 29	Negativa	Odore di yogurt
NM 30	Positiva	Odore poco percepibile, privo di difetti
TV 1	Negativa	Presenza di ossidazione
TV 2	Negativa	Odore di aceto, di frutta matura, di zolfo
TV 3	Positiva	Lievemente ossidato
TV 4	Negativa	Lieve odore di zolfo, presenza di ossidazione
TV 5	Positiva	Lievemente pungente, odore vinoso
TV 6	Positiva	Nota aromatica positiva
TV 7	Positiva	Odore fruttato, lieve odore di frutta stramatura
TV 8	Positiva	Neutro, senza difetti
TV 9	Positiva	Senza difetti, sentore di pane
TV 10	Positiva	Lieve odore di frutta stramatura
TV 11	Positiva	Senza difetti, odore di ciliegia
TV 12	Negativa	Presenza di difetti
TV 13	Negativa	Presenza di ossidazione
TV 14	Negativa	Odore di zolfo, fenoli volatili
TV 15	Negativa	Odore di zolfo
TV 16	Negativa	Odore di zolfo
TV 17	Negativa	Odore di aceto
TV 18	Positiva	Note aromatiche positive
TV 19	Negativa	Odore di zolfo
TV 20	Negativa	Odore di zolfo
TV 21	Positiva	Lievemente pungente, note aromatiche positive

Tab. 4.2 Analisi olfattiva dei fermentati ottenuti in mosto sintetico prodotti dai ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

4.3.3 PRODUZIONE DI IDROGENO SOLFORATO

La capacità di produrre acido solfidrico è stata valutata anche mediante l'utilizzo di un test in piastra. Ciascun isolato è stato cresciuto su Biggy Agar, un particolare terreno di crescita che contiene solfito di bismuto. La solfito riduttasi, enzima chiave nella sintesi degli aminoacidi solforati in grado di trasformare il solfito in solfuro da cui si origina l'acido solfidrico, in questo caso reagisce con il solfito di bismuto per produrre solfuro di bismuto che fa assumere una colorazione scura alla colonia.

I dati sono stati raggruppati considerando tre categorie fenotipiche, caratterizzate da tre diverse sfumature di colore. Il colore beige (BG) indica scarsa produzione di idrogeno solforato, marrone chiaro (MC) una produzione intermedia, marrone scuro (MS) una notevole produzione. Dai risultati ottenuti, mostrati in fig 4.12, è possibile osservare che non sono state identificate colonie bianche. L'assenza di colorazione (B) indica scarsissima produzione di H₂S, situazione che si verifica generalmente quando l'enzima chiave dell'organico dello zolfo o è mancante oppure ha un'attività estremamente limitata. In condizioni normali infatti la solfito riduttasi trasforma lo ione solfito a solfuro, successivamente incorporato per la sintesi degli aminoacidi solforati mentre in questi casi lo ione solfito non viene trasformato ed esce dalla cellula sotto forma di anidride solforosa. Il ceppo quindi non è in grado di sintetizzare una quantità sufficiente di aminoacidi solforati per cui risulta dipendente dalla presenza di questi ultimi nel mezzo di crescita, caratteristica non voluta in ceppi selezionati.

La maggior parte degli ceppi, invece, è dotata di una produzione intermedia espressa dal colore marrone chiaro delle colonie con frequenze che vanno dal 55% per gli isolati provenienti da vinaccia acidificata (AR), all'85,7% per quelli provenienti da vinaccia mista (TV). Fanno eccezione le vinacce non trattate di Prosecco (NP), caratterizzate da una percentuale rilevante (53,8%) di ceppi dotati di una notevole capacità di produrre idrogeno solforato.

La vinaccia non trattata di Moscato (NM) si distingue per la maggiore quantità di ceppi (16,7%) con una limitata attività solfito riduttasica, caratteristica assente al contrario nei lieviti provenienti dalle vinacce non acidificate (NR).

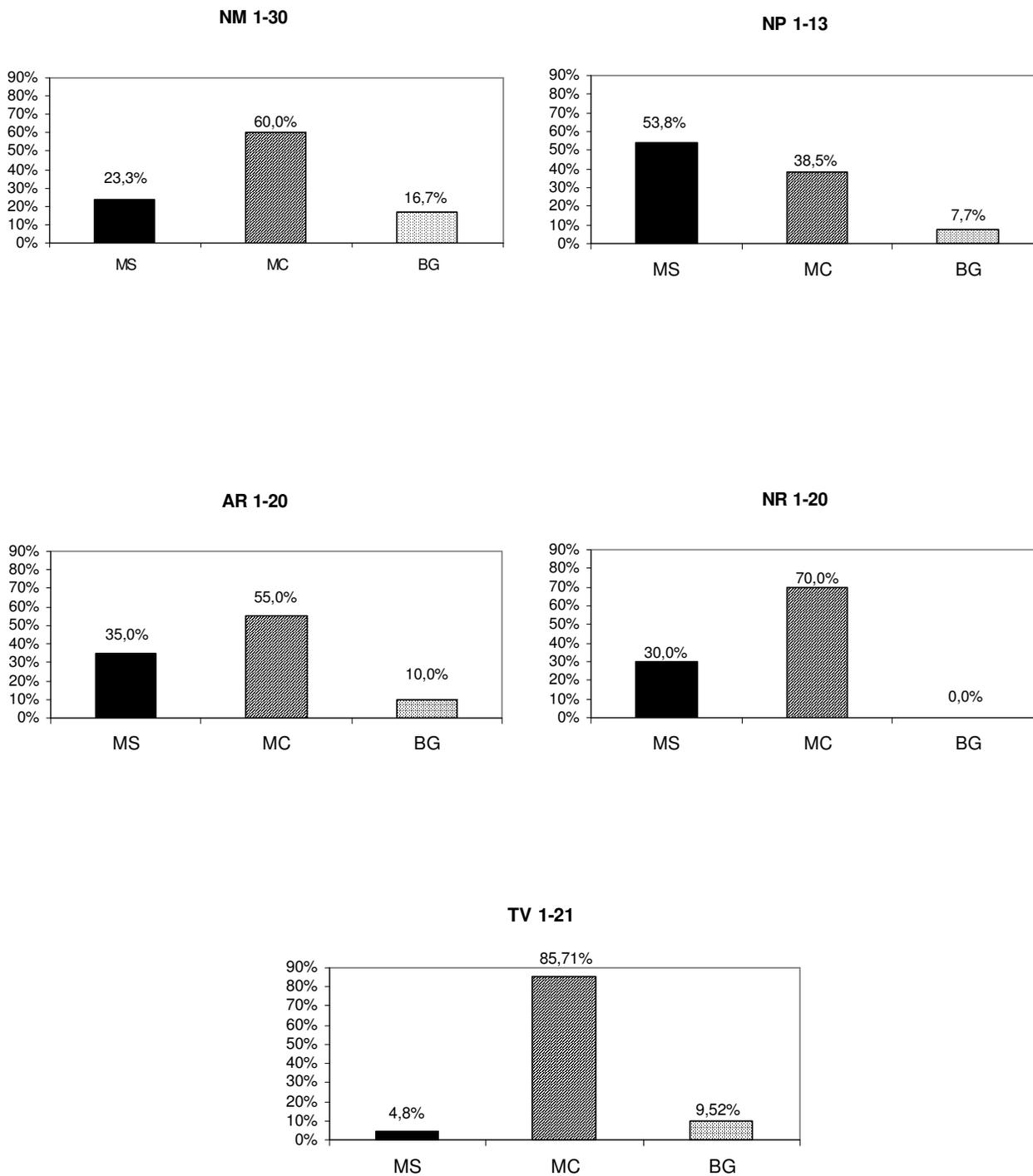


Fig. 4.12 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, della produzione di idrogeno solforato durante la fermentazione in mosto sintetico.

Colore delle colonie: BG colore beige, MC marrone chiaro, MS marrone scuro.

4.3.4 RESISTENZA ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA

Il diossido di zolfo aggiunto ai mosti in fase prefermentativa svolge diverse azioni (antisettica, antiossidante e antiossidasica). L'effetto antisettico consente di eliminare la carica microbica e i lieviti non vinari presenti nell'uva o derivanti da operazioni di raccolta e pigiatura, ma ha come conseguenza il ritardo dell'inizio della fermentazione alcolica da parte dei lieviti vinari. Questo effetto di rallentamento 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 SO₂ più efficienti rispetto ad altre specie di lieviti 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.

L'aggiunta di elevate quantità di solforosa può allungare i tempi di latenza instaurando quindi fermentazioni stentate o condurre ad arresti fermentativi deleteri per la vinificazione. Inoltre dosi elevate di anidride solforosa causano l'insorgere di difetti olfattivi nel vino difficilmente eliminabili e risvolti negativi per la salute del consumatore.

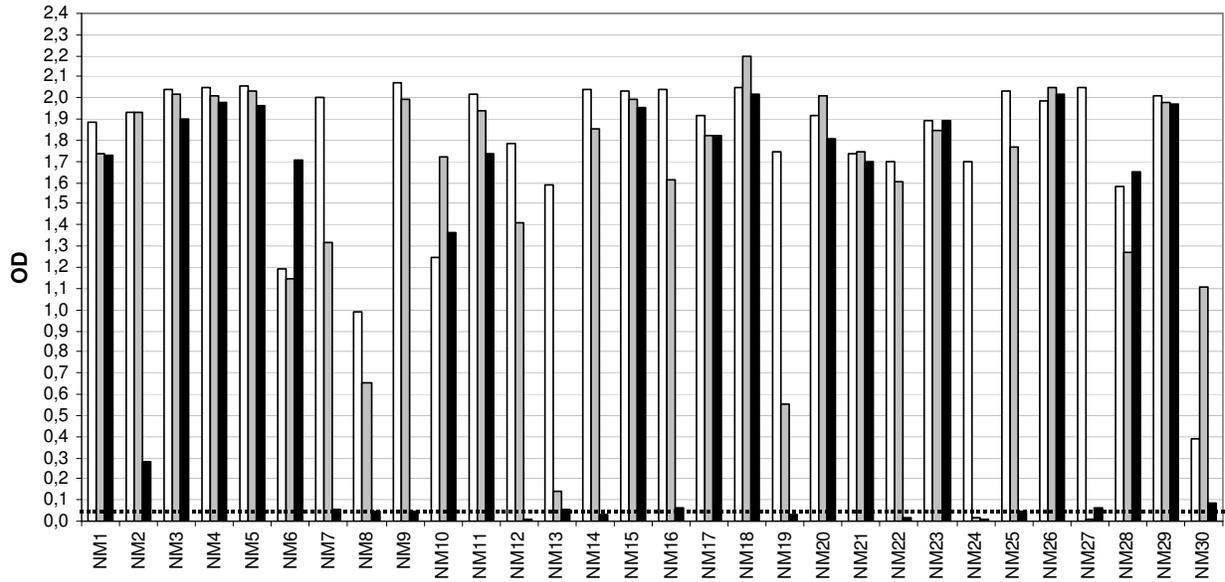
Questo importante carattere tecnologico è stato valutato cercando di ricostruire in laboratorio condizioni più simili a quelle enologiche. E' stato scelto perciò mosto sintetico a pH 3,5 come terreno di crescita in cui viene verificata la capacità del ceppo di resistere a dosi scalari di SO₂ aggiunta. Aliquote provenienti da rispettive colture ottenute su un terreno solido incubato per 3 giorni a 25°C sono state utilizzate per preparare un preinoculo in YPD. Con lo scopo di standardizzare ulteriormente le operazioni le colture liquide sono state incubate 30 ore a 25°C in modo che la popolazione di lievito raggiunga la fase stazionaria e una densità cellulare di almeno 10⁷ cellule/ml. Le precolture così allestite sono state utilizzate per ottenere un inoculo di circa 10⁶ cellule/ml in mosto sintetico a pH 3,5 contenenti dosi crescenti di SO₂ (0, 50, 100, 200 mg/l). Le quantità di antisettico scelte sono state calibrate in modo da prevedere le dosi che più spesso vengono usate in cantina (50-70 mg/l). La crescita è stata valutata a 24 e 48 ore misurando l'OD₆₀₀ allo spettrofotometro. Sono stati scelti questi due intervalli di tempo e non

periodi più lunghi in quanto un tempo di latenza inferiore o al massimo di 48 ore risulta accettabile in condizioni enologiche per l'innesco di una regolare fermentazione alcolica.

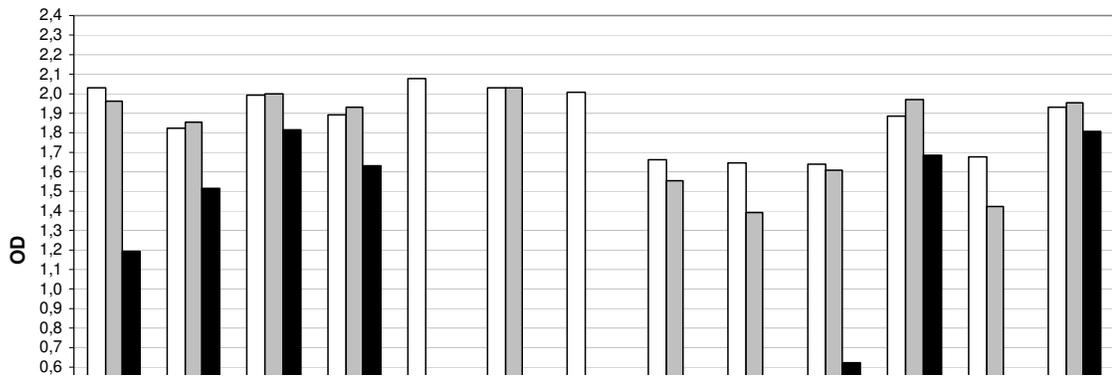
Nelle figure 4.13, 4.14, 4.15 sono riportati i valori di densità ottica misurati in presenza di 50 e 100 mg/l di solforosa dei ceppi analizzati suddivisi in base alla tipologia della vinaccia di provenienza. E' stato scelto di tracciare un valore di densità ottica soglia sopra il quale il ceppo viene considerato resistente. Tale valore, pari a 0,05 è dettato dalla torbidità generata dall'inoculo della precoltura in mosto sintetico. Il ceppo viene considerato fortemente inibito dall'antisettico se dopo 48 ore di incubazione il valore di OD risulta molto simile a quello soglia indicando quindi assenza di crescita.

Nella tabella 4.3 sono riportate le percentuali degli isolati sensibili e resistenti calcolate in base al valore soglia di densità ottica 0,05. I risultati così elaborati indicano che alla concentrazione di 50 mg/l, corrispondente alla quantità comunemente usata in cantina, la maggior parte dei lieviti analizzati non viene inibita. Le percentuali di ceppi resistenti osservati nelle diverse vinacce varia infatti tra 92 e 100%. Considerando la concentrazione di 100 mg/l indipendentemente dall'origine si verifica in genere un notevole calo dei ceppi resistenti che risultano compresi tra 62 e 100%. Inoltre un numero limitato di ceppi (solo 6 ceppi tutti isolati da vinacce di Moscato (NM) e Prosecco (NP) insilate direttamente in cantina) a 48 ore dall'inoculo, in presenza di 200 mg/l di SO₂, mostra un valore di OD superiore a 0,05 (dati non riportati), ma la crescita di questi ceppi è estremamente lenta e non consente di affermare che siano resistenti a questa dose di antisettico. In relazione alla tipologia di matrice vegetale e al trattamento i ceppi che dimostrano maggiore resistenza provengono da vinacce di Prosecco non acidificate prima dell'insilamento (NR), mentre quelli a minor resistenza sono stati isolati da vinacce di Prosecco insilate direttamente in cantina (NP).

NM 1-30



NP 1-13



AR 1-20

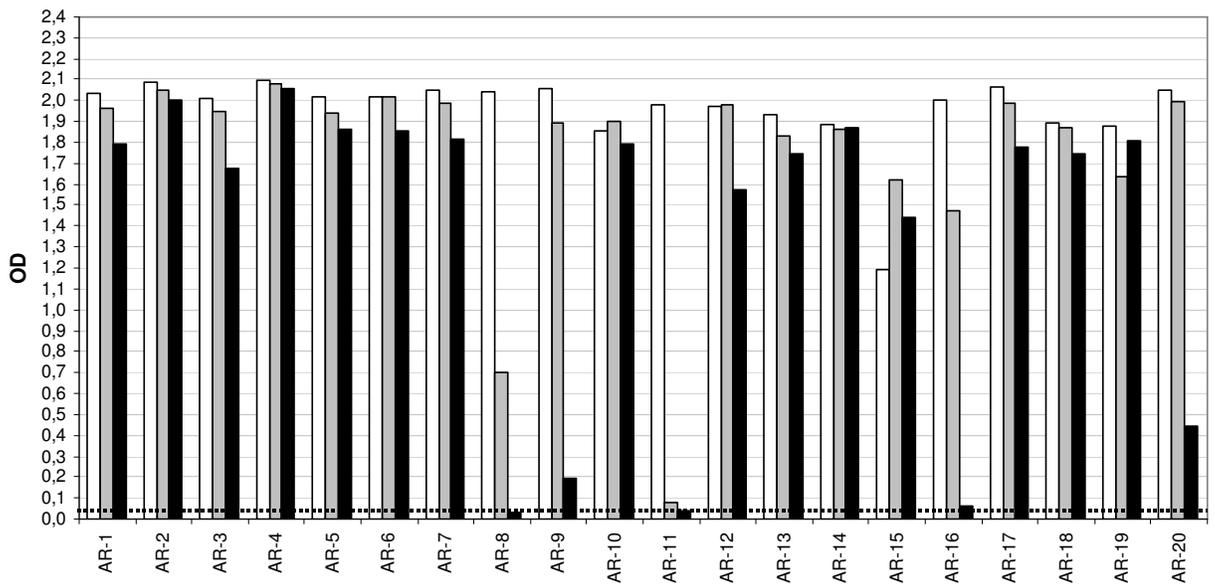


Fig. 4.14 Effetto della presenza di SO₂ sulla crescita dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco acidificate (AR) e non acidificate (NR).
 Concentrazione di SO₂: 0 (□), 50 (■), 100 mg/l (■).

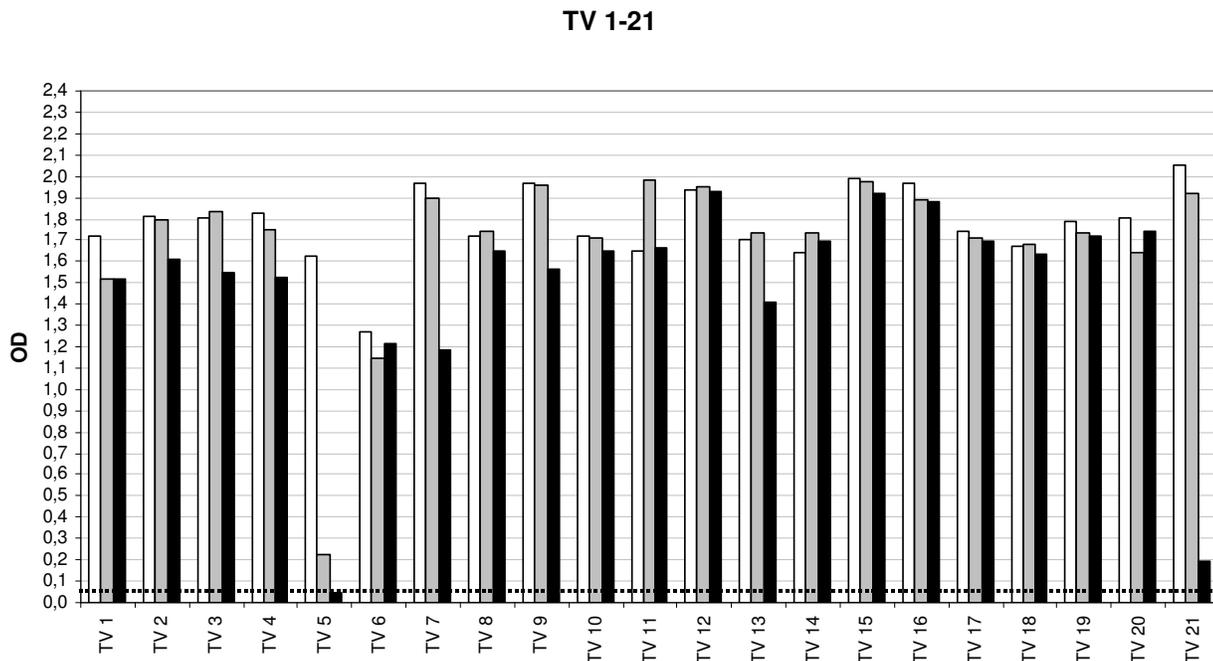


Fig. 4.15 Effetto della presenza di SO₂ sulla crescita dei ceppi isolati da vinacce miste insilate a temperatura non controllata.

Concentrazione di SO₂: 0 (□), 50 (■), 100 mg/l (■).

	50mg/l SO ₂		100mg/l SO ₂	
	sensibili	resistenti	sensibili	resistenti
AR	5%	95%	15%	85%
NR	0%	100%	5%	95%
NM	7%	93%	43%	57%
NP	8%	92%	38%	62%
TV	0%	100%	5%	95%

Tab. 4.3 Percentuali degli isolati sensibili e resistenti calcolate in base al valore di OD di 0.05.

AR: vinacce acidificate di Prosecco, NR: vinacce non acidificate di Prosecco, NM: vinacce di Moscato insilate direttamente in cantina, NP di Prosecco, TV: vinacce miste insilate a T° non controllata.

4.3.5 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA MEDIANTE CRESCITA SU CELLOBIOSIO

E' stato utilizzato dapprima un metodo che prevede la crescita dei ceppi su piastra contenente un terreno selettivo caratterizzato dalla presenza di cellobiosio come unica fonte di carbonio, disponibile per il lievito dopo che il legame β - 1,4 è stato scisso. Tale metodo può essere considerato semiquantitativo in quanto il livello di crescita è proporzionale all'espressione dell'attività dei singoli lieviti. Per ridurre i falsi positivi le colture ottenute da ciascun ceppo, cresciuto per 24 ore in un terreno liquido completo, sono state centrifugate e il pellet cellulare risospeso in un mezzo privo della fonte di carbonio. Dopo un breve periodo di incubazione un'aliquota della coltura è stata trasferita sul terreno solido contenente cellobiosio. Per confermare la vitalità cellulare al momento del trasferimento un'analogia quantità è stata trasferita su un terreno di crescita completo. Sono state utilizzate come controlli positivi *Dekkera anomala* e *Saccharomyces ludwigii* la cui attività β -glucosidasi è ampiamente dimostrata in letteratura (Kurtzman C., 1998). Dopo 10 giorni di incubazione è stata valutata la crescita con l'attribuzione di un punteggio compreso tra 0 (assenza completa di crescita) e 10 (crescita rigogliosa comparabile a quella dei controlli positivi). I risultati, espressi come frequenze relative dei ceppi appartenenti alle diverse classi di distribuzione calcolate sul punteggio attribuito sono riportate in fig. 4.16. In generale pur non essendoci alcun ceppo in cui la crescita è totalmente inibita (punteggio 0) lo sviluppo è piuttosto ridotto (punteggio massimo 5) indice di una bassa attività β -glucosidasi che è tipica delle specie *Saccharomyces cerevisiae* (Rosi G. et al., 1994). Considerando i risultati in base al tipo di matrice vegetale per le vinacce di Moscato (NM) alla classe di isolati più presente (con una frequenza pari a 30%) è stato attribuito il punteggio 1, mentre negli altri casi (ad eccezione di NP in cui la distribuzione è molto omogenea) alla medesima classe sono stati attribuiti valori più alti (2 per AR, 3 per NR e TV). I risultati ottenuti con questo tipo di approccio indicano che i lieviti provenienti dalle vinacce di Moscato, maggiormente dotati dal punto di vista del vigore fermentativo, sono, in media, più carenti per quanto riguarda l'attività β -glucosidasi. Il numero maggiore di isolati con alti livelli di attività è stato osservato all'interno del *pool* proveniente da vinacce di Prosecco stoccate direttamente in cantina (NP). In questo caso le classi a cui sono stati

attribuiti i punteggi più elevati (4 e 5) comprendono il 46,2% degli isolati totali (31,8% in TV, 30% in NR, 26,6% in NM e 15% in AR).

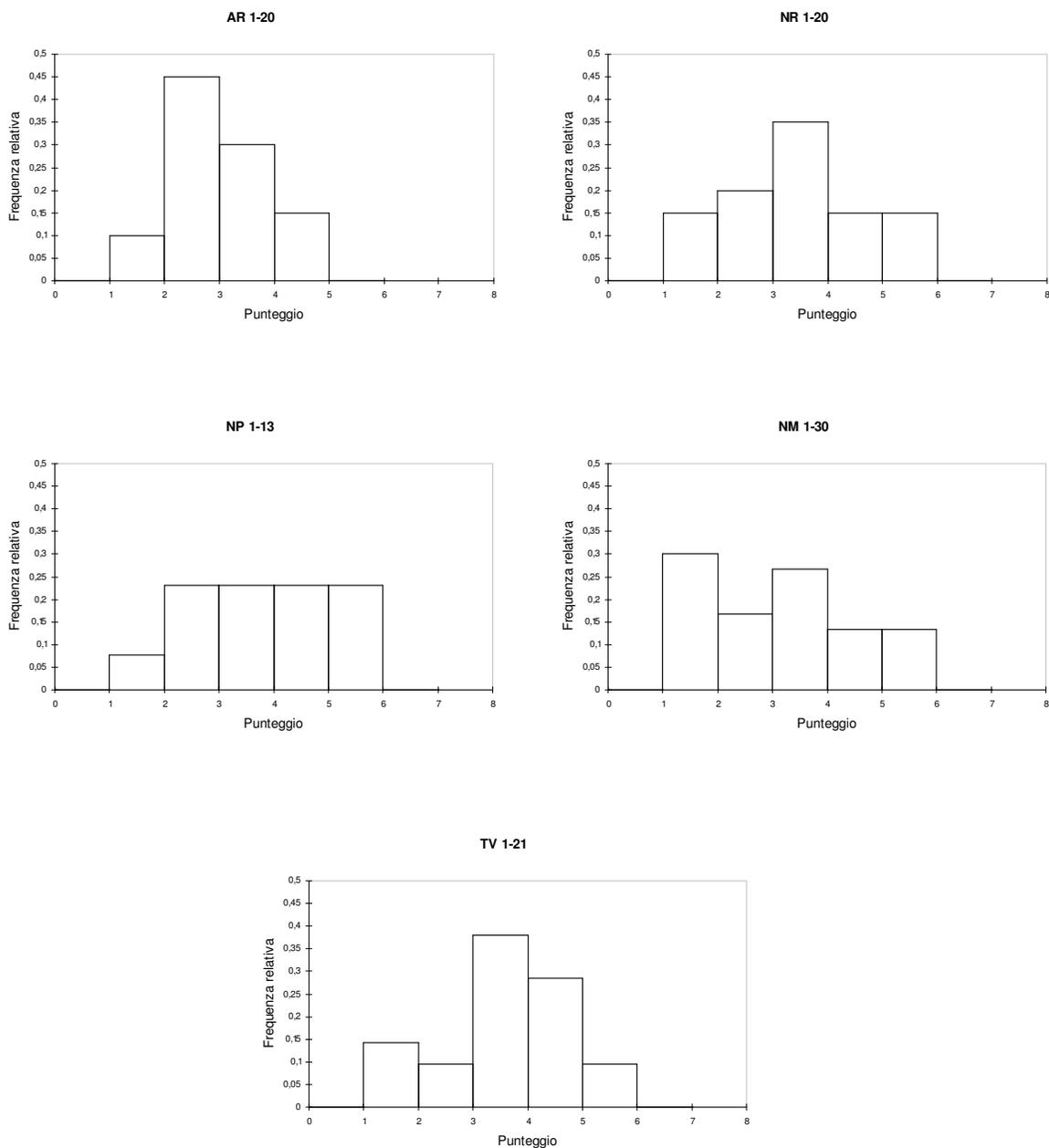


Fig. 4.16 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, dei punteggi attribuiti alla crescita su terreno selettivo contenente cellobiosio dei ceppi isolati da vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non trattate prima dell'insilamento (NR), di Prosecco (NP) e di Moscato (NM) insilate direttamente in cantina, e da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

Punteggio 0: assenza di crescita

Punteggio 10: crescita rigogliosa comparabile ai controlli positivi.

4.3.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA MEDIANTE TEST IN FLUORESCENZA

Un secondo approccio di tipo quantitativo per la valutazione della produzione di aromi varietali correlata all'attività β -glucosidasica nei lieviti, ha previsto la messa a punto di un metodo che fosse efficace, di rapida esecuzione e perciò adatto all'analisi di un elevato numero di ceppi, da condurre in condizioni sperimentali il più possibile riproducenti l'ambiente enologico. Sono presenti principalmente due tipologie di metodiche: i saggi in piastra e test in coltura liquida.

I primi determinano, come nel caso della crescita su cellobiosio, delle risposte semiquantitative o molto spesso a carattere qualitativo. Generalmente viene utilizzato un terreno di crescita sintetico a pH 6 o addirittura neutro arricchito di un substrato che contiene un legame glucosidico in grado di essere demolito dai lieviti. L'idrolisi del composto determina la formazione di glucosio e di una sostanza cromogena che diffonde dai bordi della colonia nella piastra formando un alone caratteristico le cui dimensioni sono correlate all'intensità dell'attività β -glucosidasica.

Tra i principali substrati cromogeni si annovera l'esculina, una sostanza incolore, la cui formula chimica corrisponde a 6 (β -D-glucopiranosio)7idrossi2H-1benzopirano. Dall'idrolisi di questa molecola si ottiene glucosio e esculetina (idrossi-benzopirano). Quest'ultima reagisce con i sali di ferro aggiunti al terreno di crescita sotto forma di citrato ferrico trasformandosi in un composto dal colore marrone scuro-nero. Purtroppo l'esculina può essere utilizzata solo quando il pH del mezzo ha valori attorno alla neutralità. Il pH acido tipico dell'ambiente enologico infatti determina il mancato svolgimento della reazione (Hernandez L.F. *et al.*, 2003).

Un altro substrato molto comune in letteratura è l'arbutina (p-idrossifenil- β -D-glucopiranoside). In questo caso dall'idrolisi del composto si libera il p-idrossifenile caratterizzato da un colore marrone che si distingue abbastanza bene sulla piastra. Anche questo substrato ha il grosso svantaggio di non poter essere usato in ambiente acido, quale il mosto.

Dall'idrolisi del p-nitrofenil- β -D-glucopiranoside, conosciuto con la sigla di pNPG, invece, si ottiene un prodotto (p-nitrofenolo) con una colorazione giallina che si confonde spesso, quando usato in piastra, con il colore del terreno di crescita.

Infine, invece di una molecola cromogena, è possibile anche utilizzare un fluoroforo che è in grado emettere una radiazione elettromagnetica solo quando non è legato a glucosio. E' il caso del composto 4-metilumbelliferil- β -D-glucopiranoside (MUD), in cui il metilumbelliferone (MU) libero viene eccitato da una lunghezza d'onda di 365 nm ed emette a 460 nm, producendo una fluorescenza blu. E' sufficiente illuminare la piastra con una lampada ad UV per osservare, quando è presente l'attività enzimatica, un alone fluorescente attorno alla colonia. Sia pNPG che MUD vengono utilizzati anche in ambienti a pH acido (Fia G. *et al.*, 2005).

Considerando invece i saggi in terreno liquido, in questo caso il risultato è molto più preciso e le misure permettono una valutazione quantitativa dell'attività. Generalmente viene adoperato un terreno di crescita contenente ridotte quantità di glucosio (0,5%), a pH neutro.

I substrati utilizzati possono essere pNPG oppure MUD che rimangono in contatto con le cellule di lievito per un tempo molto breve (5-10 minuti) prima che la reazione venga bloccata con l'aggiunta di una soluzione di NaHCO₃ che porta il pH a valori decisamente basici. La misura dell'attività, che in certi casi viene effettuata sul surnatante in altri sul pellet cellulare, si determina mediante l'uso dello spettrofotometro a 405nm con pNPG, oppure mediante spettrofluorimetro con MUD (Fia G. *et al.* 2005).

4.3.6.1 Test in piastra

Un primo screening su piastra dell'attività β -glucosidasica dei ceppi di lievito è stato effettuato utilizzando come substrato, tra quelli precedentemente descritti, il 4-metilumbelliferil- β -D-glucopiranoside (MUD), composto scelto sulla base delle considerazioni fatte nel paragrafo precedente. Le prove sono state condotte impiegando i seguenti ceppi di riferimento: *Saccharomyces cerevisiae* DSM70449 (ceppo tipo); *Saccharomyces cerevisiae* ceppo enologico, proveniente dal preparato commerciale Premium 444 (Vason); *Saccharomyces cerevisiae* 4-00-041, isolato naturale da vinaccia proveniente dalla zona dei Colli Euganei con bassa attività β -glucosidasica (Lante A. *et al.* 2006); *Saccharomyces ludwigii* CBS822 (ceppo tipo), specie avente, secondo dati riportati in letteratura, un'elevata attività β -glucosidasica; *Saccharomyces ludwigii* PC99 isolato naturale da vinaccia di Prosecco che ha rivelato un'attività β -glucosidasica particolarmente elevata (Lante A. *et al.* 2006).

Sono state effettuate tre tipologie di prove su piastra. La prima ha previsto l'impiego del terreno di coltura YM agar, mezzo utilizzato molto spesso per la crescita di molte specie di lievito, sopra il quale è stato steso uno strato della soluzione contenente il substrato MUD. Sono state comparate due piastre, una in cui sono stati effettuati strisci e spot di quattro ceppi di lievito testati (*S. cerevisiae* DSM70449, *S. cerevisiae* 444, *S. ludwigii* CBS822, *S. ludwigii* PC99) l'altra in cui sono stati versati 20 µl di coltura liquida cresciuta per 24 ore in YM. Le piastre così inoculate sono state incubate a 25°C per 48h e successivamente esaminate al transilluminatore UV. I ceppi con attività β-glucosidasica che hanno idrolizzato il substrato sviluppano un alone fluorescente.

Come mostrato in fig. 4.17 non si osservano differenze relativamente all'intensità e all'ampiezza degli aloni dei diversi ceppi, come invece atteso. Probabilmente il terreno YM, a causa della sua composizione, è poco adatto a evidenziare questa attività enzimatica. La seconda prova effettuata ha previsto l'impiego di un altro terreno di coltura terreno YPD. Questo mezzo che contiene 20 g/l di glucosio è spesso utilizzato in saggi per la rilevazione di attività enzimatiche (Vincenzini M. *et al.*, 2005). Sopra la piastra è stato steso uno strato della soluzione contenente il substrato MUD. In questo caso i ceppi di lievito (*S. cerevisiae* DSM70449, *S. cerevisiae* 4-00-041, *S. ludwigii* CBS822, *S. ludwigii* PC99) sono stati inoculati solamente mediante strisci e spot. Successivamente le piastre sono state incubate a 25°C per 24 ore e poi esaminate al transilluminatore UV. Come mostrato in fig. 4.18 anche questa prova conferma quanto detto in precedenza, in particolare l'alone sviluppato dal ceppo *S. cerevisiae* 4-00-041, avente bassa attività β-glucosidasica è comparabile con quelli di *S. ludwigii*, considerati invece alti produttori.

L'ultima prova è stata condotta utilizzando due terreni, YPD contenente 20 g di glucosio e mosto sintetico (pH 3,5). Anche in questo caso i lieviti sono stati inoculati sia mediante strisci e spot, sia versando 20 µl di coltura liquida cresciuta per 24 ore in YM. Dopo 48 ore di incubazione a 25°C le piastre sono state esaminate al transilluminatore UV.

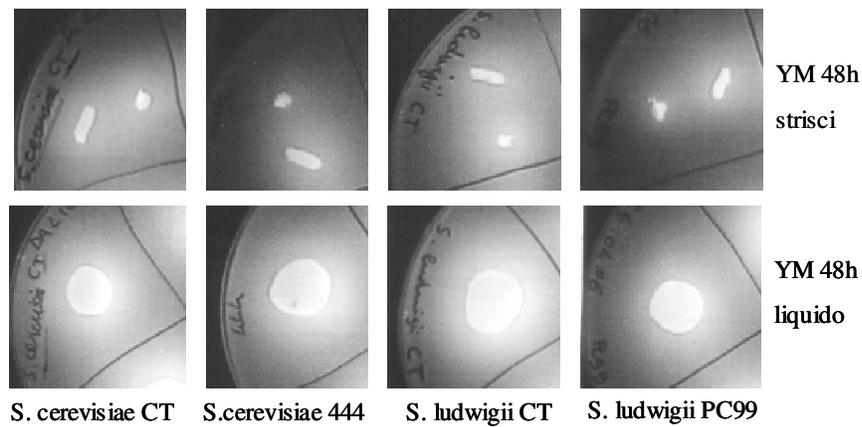


Fig. 4.17 Saggio in piastra per la valutazione dell'attività β -glucosidasica, determinata in terreno YM.

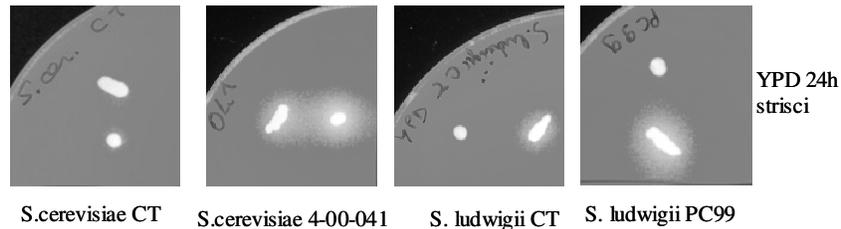


Fig. 4.18 Saggio in piastra per la valutazione dell'attività β -glucosidasica, determinata in terreno YPD (20 g/l di glucosio).

In fig. 4.19 è possibile osservare che nel terreno YPD lo striscio del ceppo *S. cerevisiae* 4-00-041 sembra avere un alone più intenso di quello di *S. ludwigii*. Probabilmente ciò non è dovuto ad una più elevata attività del ceppo ma ad una maggiore degradazione del substrato dovuta alla crescita più veloce della specie *S. cerevisiae*. Per quanto riguarda la prova in mosto sintetico invece si osserva il risultato atteso: i ceppi appartenenti alla specie *S. ludwigii* presentano un'attività più elevata.

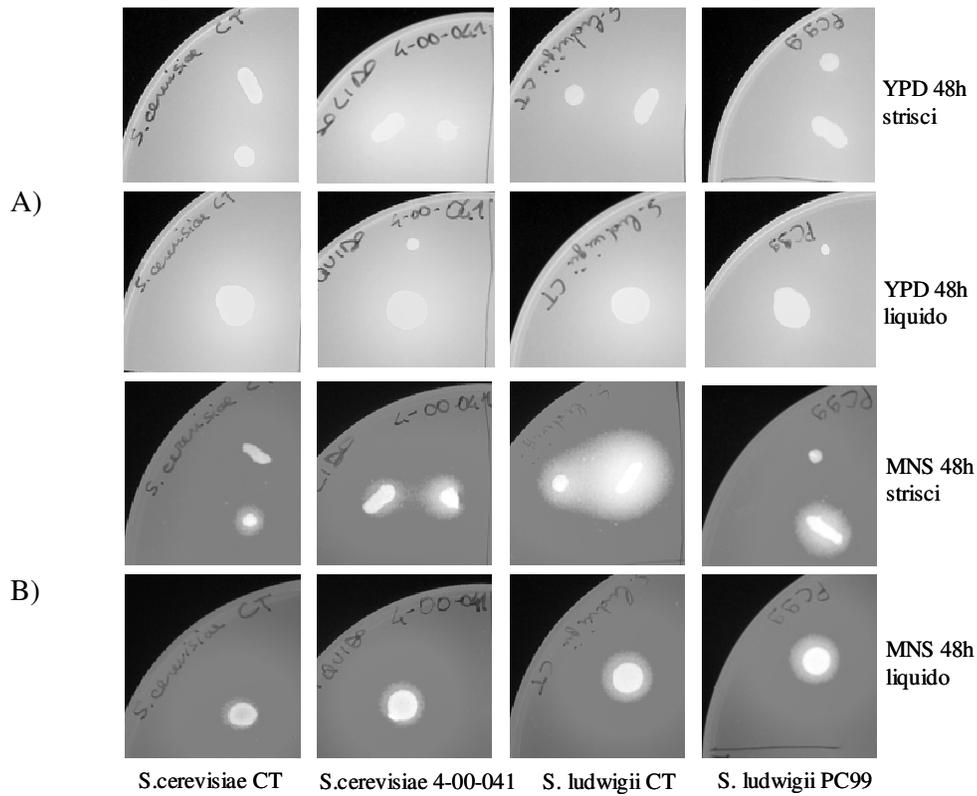


Fig. 4.19 Saggio in piastra per la valutazione dell'attività β -glucosidasi, determinata in terreno YPD con 20 g/l di glucosio (A) e mosto sintetico a pH 3,2 (B).

Osservando complessivamente i risultati ottenuti dalle prove in piastra, il sistema utilizzato si è rivelato insoddisfacente per una serie di motivi. Innanzitutto è difficile valutare l'attività enzimatica in base all'intensità e all'ampiezza dell'alone, e l'attività stessa può essere collegata alla crescita più o meno lenta in piastra, fattore che con questo metodo non viene preso in considerazione. Questa situazione si concretizza spesso con aloni di dimensioni diverse a seconda della prova. Inoltre cambiando le condizioni di crescita, terreno o modalità di inoculo su piastra, non sempre l'attività si esprime in modo corretto, tanto che alcuni ceppi sembrano avere un comportamento opposto a quello descritto in precedenti lavori e in letteratura.

4.3.6.1 Test in liquido

Per i motivi precedentemente citati si è scelto di procedere all'analisi in liquido mediante il substrato MUD (4-metilumbelliferil- β -D-glucopiranoside) utilizzando a piastre del tipo microtiter, che offrono il vantaggio di poter verificare l'attività di numerosi ceppi contemporaneamente. I ceppi di collezione utilizzati per le prove preliminari descritti in precedenza, sono *S. cerevisiae* DSM70449, *S. cerevisiae* 4-00-041, *S. ludwigii* CBS822, *S. ludwigii* PC99.

La procedura generale di screening ha previsto la messa a punto di una serie di passaggi evidenziati in fig. 4.20. Partendo da una coltura di lieviti messi a crescere in terreno liquido YPD per 24 ore si è proceduto all'inoculo in mosto sintetico liquido per 24 ore a 30°C. Un volume di coltura di 100 μ l è stato centrifugato per eliminare il surnatante ed il pellet di cellule risospeso in 50 μ l di acetato di sodio 0.05M a pH 5,0.

Successivamente il substrato di reazione MUD 0,76 mM, è stato aggiunto alla soluzione e la piastra messa ad incubare per 5 minuti a 37°C. La reazione è stata quindi bloccata con 50 μ l di bicarbonato di sodio saturo; si è proceduto infine alla lettura del dato di fluorescenza allo spettrofluorimetro.

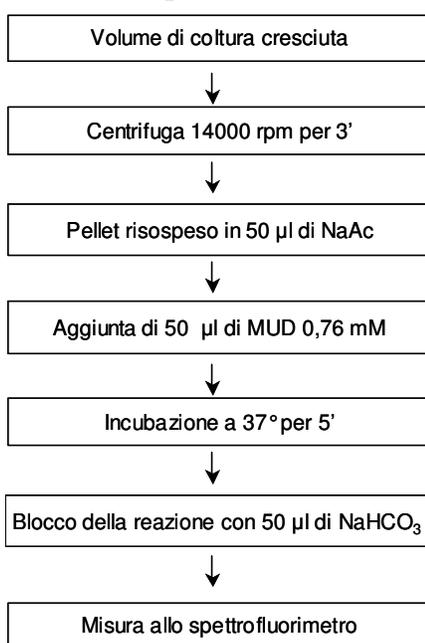


Fig. 4.20 Procedura generale del test in microtiter.

In tabella 4.4 sono riportate le principali prove effettuate per mettere a punto il metodo di quantificazione. Per verificare la quantità di volume più favorevole alle condizioni del saggio sono stati testati 50, 100, 200, 300, 500, 1000 e 2000 μ l di

coltura liquida, prelevati e centrifugati per eliminare il surnatante. Le prime prove effettuate hanno messo in evidenza che i volumi di coltura più interessanti sono 100, 200, 300 e 500 µl. La prova condotta prelevando le cellule direttamente da piastra e risospendendo in acetato di sodio ha evidenziato attività costanti per tutti i ceppi, pertanto non è più stata presa in considerazione.

Successivamente i ceppi di riferimento sono stati messi a crescere in terreni di coltura a diverse concentrazioni di zuccheri quali mosto sintetico (MNS), YPD con 5 g/l di glucosio, e YPD con 20 g/l di glucosio. E' stata fatta una prova anche risospendendo direttamente un'ansata di cellule, cresciute su piastra, in acetato di sodio. E' stato inoltre verificato che la presenza del terreno di crescita influenza notevolmente il dato di fluorescenza, confermando che la prima centrifugazione è necessaria per eliminare l'interferenza del mezzo.

In base a dati riportati in letteratura (Fia G. *et al.*, 2005) il tempo di incubazione per la reazione di idrolisi del substrato MUD è di 5 minuti a 37°C. Nella fase di messa a punto però sono stati verificati anche i risultati ottenuti incubando le piastre di reazione per 10 e 20 minuti. Ciò ha evidenziato che non vi sono differenze significative, facendo ricadere la scelta per il protocollo definitivo su 5 minuti di incubazione.

Considerando infine la misura allo spettrofluorimetro è stata testata l'attività, oltre che sulle cellule ottenute dal brodo di coltura come previsto dal protocollo generale, anche sulla coltura stessa tal quale e sul surnatante. Queste ultime due prove, che non verranno discusse di seguito, non hanno sottolineato marcatamente differenze di attività, che vengono addirittura appiattite nel caso della misura sul surnatante.

VOLUME	50µl	100µl	200µl	300µl	500µl	1000µl	2000µl	da piastra
MEZZO DI CRESCITA	YPD(5g/l)			YPD(20g/l)			MNS	
PRESENZA TERRENO	+ terreno				- terreno			
TEMPO DI INCUBAZIONE	5'			10'			20'	
MISURA ALLO SPETTROFLUORIMETRO	Cellule A/P*			Surnatante			Tal Quale	

Tab. 4.4 Fattori considerati per la messa a punto del metodo di quantificazione del test in microtiter (*A=assenza, P=presenza).

In figura 4.21 sono riportati i dati dei valori di fluorescenza relativi a due dei quattro ceppi analizzati, *S. cerevisiae* DSM70449 e *S. ludwigii* CBS822, cresciuti

in coltura liquida di YPD 5 g per 24 ore. Sono riportati i valori relativi ai volumi più interessanti come citato precedentemente e per ognuno di questi, i valori ottenuti in assenza o in presenza di cellule, cioè centrifugando o meno prima di misurare la fluorescenza dopo aver effettuato il test. In particolare osservando i valori di fluorescenza all'aumentare della quantità di coltura si rileva un corretto andamento, tendenzialmente lineare, solo quando il saggio viene condotto in presenza delle cellule.

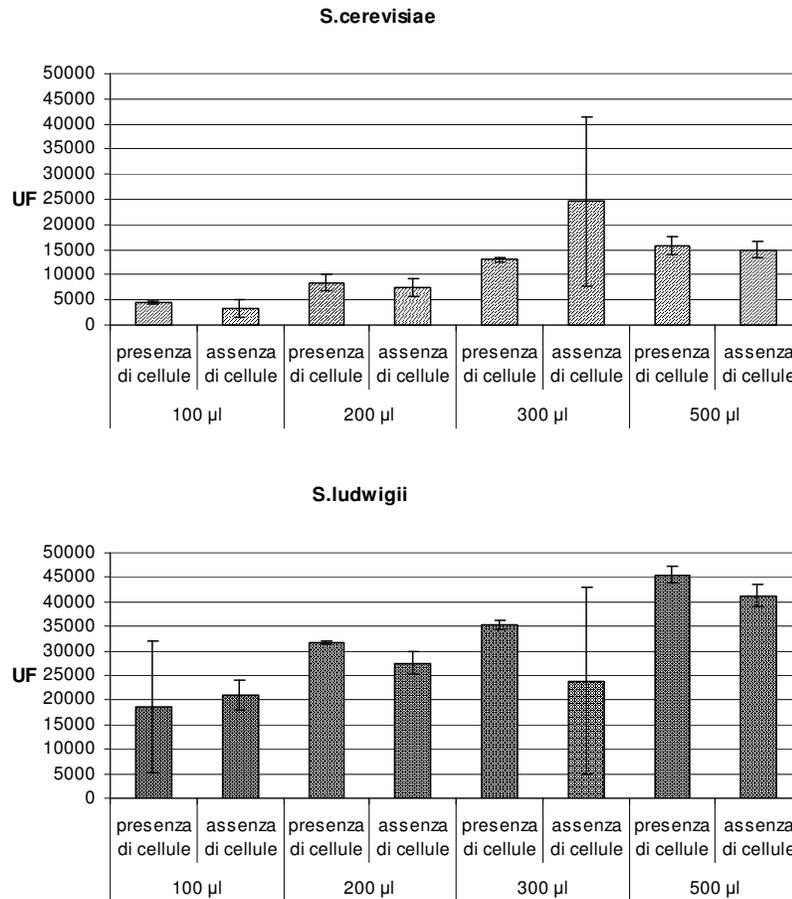


Fig 4.21 Attività β -glucosidasi espressa dai ceppi *Saccharomyces cerevisiae* (A) e *Saccharomyces ludwigii* (B) cresciuti in YPD 5g/l di glucosio, relativa a volumi diversi, in presenza e in assenza di cellule al momento della lettura. UF: unità di fluorescenza.

Successivamente è stata valutata l'attività β -glucosidasi espressa dai lieviti quando cresciuti in presenza di diverse concentrazioni di zucchero. In fig. 4.22 sono riportati i valori di fluorescenza misurati, considerando i volumi di coltura già precedentemente testati, dopo la crescita in YPD 5g e in YPD 20g. E' possibile notare che non vi sono differenze significative tra i due terreni,

confermando che la quantità di glucosio presente sembra non influenzare l'attività enzimatica.

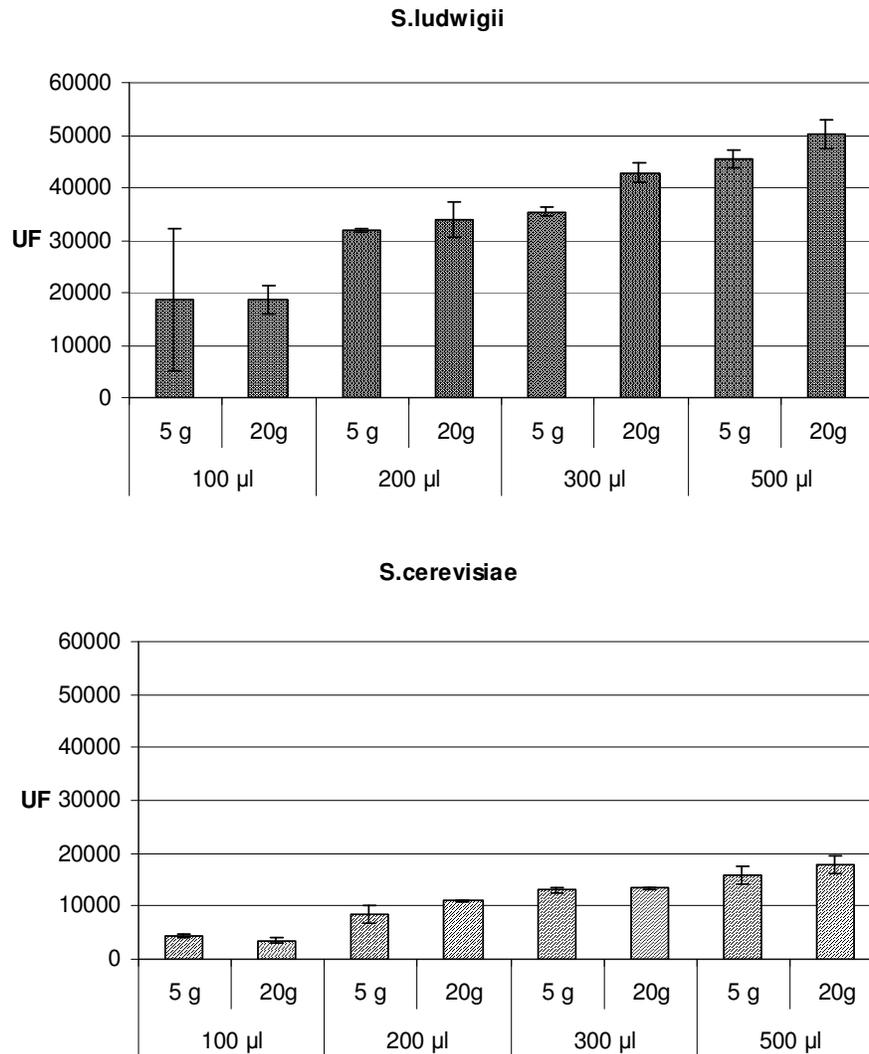


Fig 4.22 Attività β -glucosidasi espressa dai ceppi *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces ludwigii* cresciuti in YPD 5 e 20 g/l di glucosio, relativa a volumi diversi in presenza di cellule al momento della lettura. UF: unità di fluorescenza.

Considerando invece i volumi di coltura, per le prove successive e per l'analisi degli isolati da vinaccia, si è stabilito di prelevare 100 µl perché questa quantità consente di amplificare le differenze tra ceppi, che si appiattiscono invece con l'aumento del volume.

La figura 4.23 mette in risalto le differenze nei valori di fluorescenza ottenuti testando i lieviti cresciuti in YPD (20g/l) e in mosto sintetico, misurati prelevando 100 µl di volume di coltura. E' possibile osservare che si verifica un calo

dell'attività in mosto sintetico per quanto riguarda *S. ludwigii*. Non vi sono al contrario differenze nel caso di *S. cerevisiae*, la cui attività β -glucosidasi non sembra influenzata, almeno per quanto riguarda il ceppo considerato, dall'elevata concentrazione di glucosio, 200g/l, tipica del mosto.

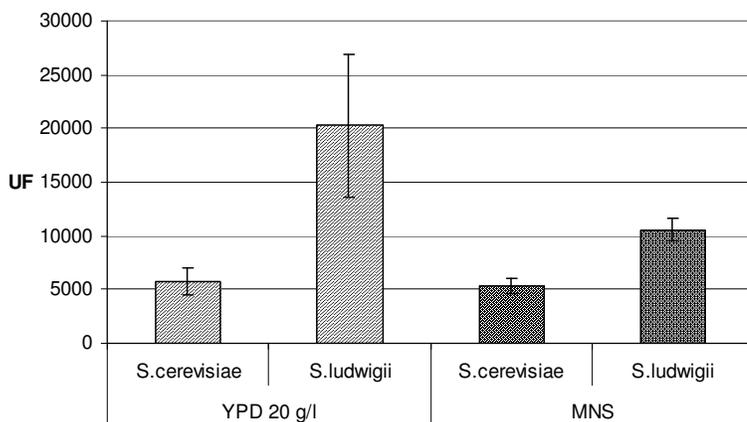


Fig 4.23 Attività β -glucosidasi espressa dai ceppi *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces ludwigii* cresciuti in YPD 20g e in mezzo nutritivo sintetico (mosto sintetico). UF: unità di fluorescenza.

4.3.6.2 Standardizzazione dell'inoculo in mosto sintetico

Dati riportati in letteratura (Fia G. *et al*, 2005) sembrano indicare che la biosintesi dell'enzima β -glucosidasi è connessa alla fase attiva di crescita dei lieviti. In particolare, la massima attività viene riscontrata all'inizio della fase stazionaria. Con lo scopo di ottenere una misura dell'attività enzimatica nella medesima fase di crescita per tutti i lieviti saggiati, le procedure di inoculo sono state standardizzate in modo tale da consentire ai ceppi di raggiungere la fase stazionaria al momento dell'allestimento del test in liquido. Alcuni ceppi isolati da vinaccia sono stati pre-inoculati, partendo da piastre cresciute precedentemente, in 10 ml di YPD 5g e messi ad incubare a 30 °C overnight. Dopo 22 ore è stata monitorata la crescita misurando la densità ottica a 600 nm, che si è attestata a valori compresi tra 1,2 e 1,5. Partendo da questa coltura si è proceduto poi con un inoculo 1:20, corrispondente a 500 μ l in 10 ml di mezzo nutritivo sintetico (mosto sintetico), messo a incubare a 30°C overnight. L'entità dell'inoculo è stata verificata effettuando la conta delle ufc/ml con il metodo delle diluizioni su piastra. Questa procedura è stata ripetuta dopo 30 ore di incubazione della coltura in YPD, quando la densità ottica è salita a valori compresi tra 1,6 e 1,7. L'inoculo effettuato in MNS ai due tempi è del tutto comparabile e raggiunge valori di circa

$2 \cdot 10^6$ ufc/ml. In questo modo è stato possibile verificare che, per valori di OD del pre-inoculo compresi tra 1,2 e 1,7, la coltura in mosto sintetico si svilupperà 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.

Infine, per verificare che le colture in mosto sintetico al momento del test raggiungessero la fase stazionaria, consentendo così l'esecuzione del saggio nelle sue condizioni ottimali, dopo 24 ore sono state misurate le densità ottiche e i dati confrontati con la conta su piastra delle ufc/ml. Ciò ha permesso di concludere che a valori di OD compresi tra 1,5 e 2,0, dopo almeno 24 ore di incubazione, si è raggiunta la fase stazionaria poiché le ufc/ml sono circa $5 \cdot 10^7$ per tutti i ceppi.

4.3.6.3 Screening dell'attività dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati da vinacce

Il test sugli isolati naturali è stato condotto crescendo le colture in YPD ed effettuando l'inoculo in mosto sintetico a pH 3,5 seguendo le modalità descritte nei paragrafi precedenti. Il test è stato condotto su un volume di coltura di 100 μ l e la misura è stata eseguita in microtiter da 96 pozzetti. L'attività di ciascun ceppo è stata valutata in triplicato. È stato necessario utilizzare rette di taratura, costruite come indicato in precedenza, utilizzando il prodotto della reazione enzimatica (MU), poiché sono state confrontate attività misurate su microtiter diverse. 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 μ moli/l di prodotto (MU), sono riportati nelle fig. 4.24, 4.25.

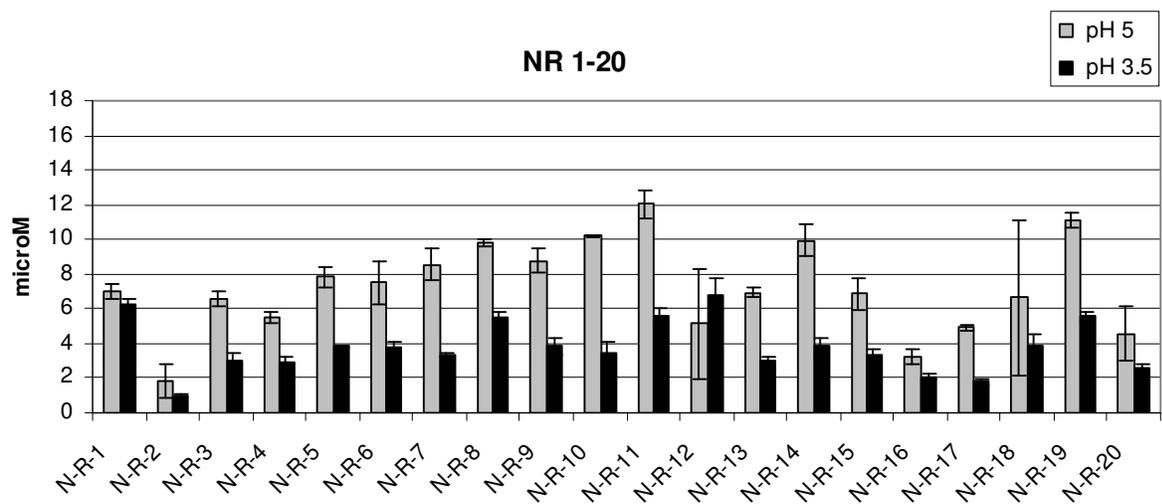
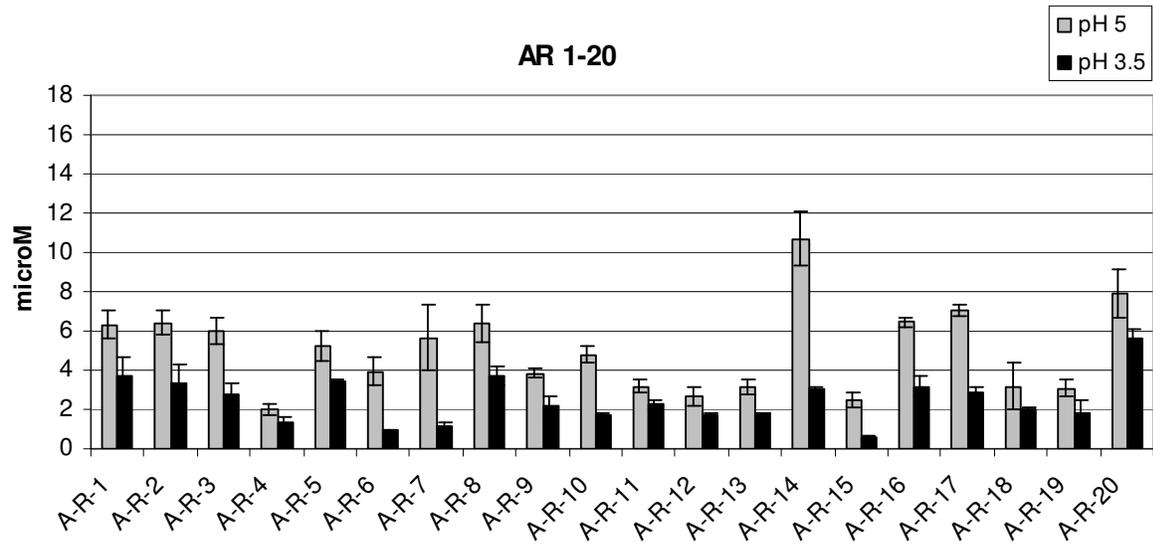


Fig 4.24 Attività β -glucosidasi in isolati naturali da vinaccia di Prosecco refrigerata acidificata (AR) e non acidificata (NR), espressi in $\mu\text{mol/l}$ di prodotto (MU).

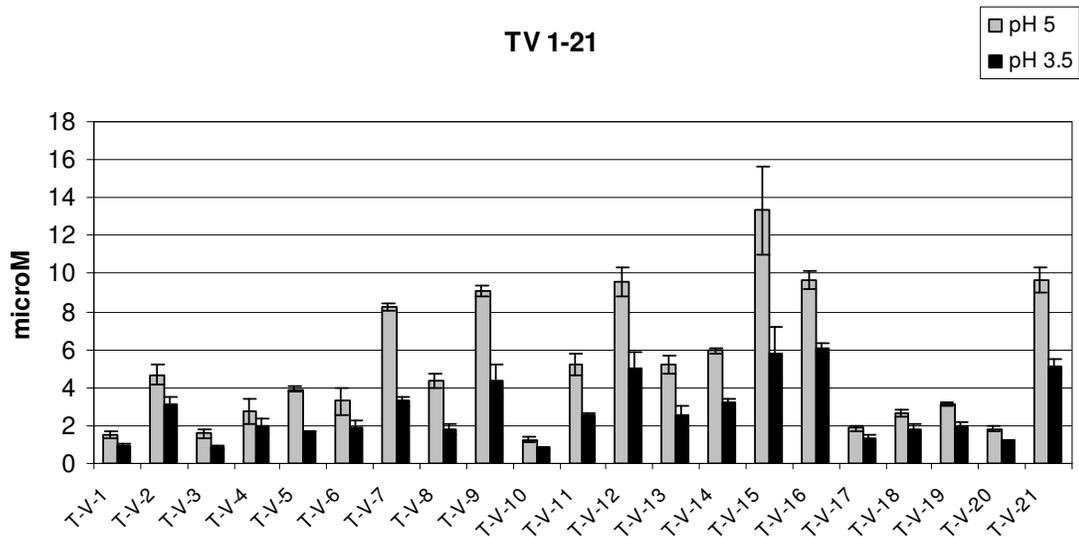
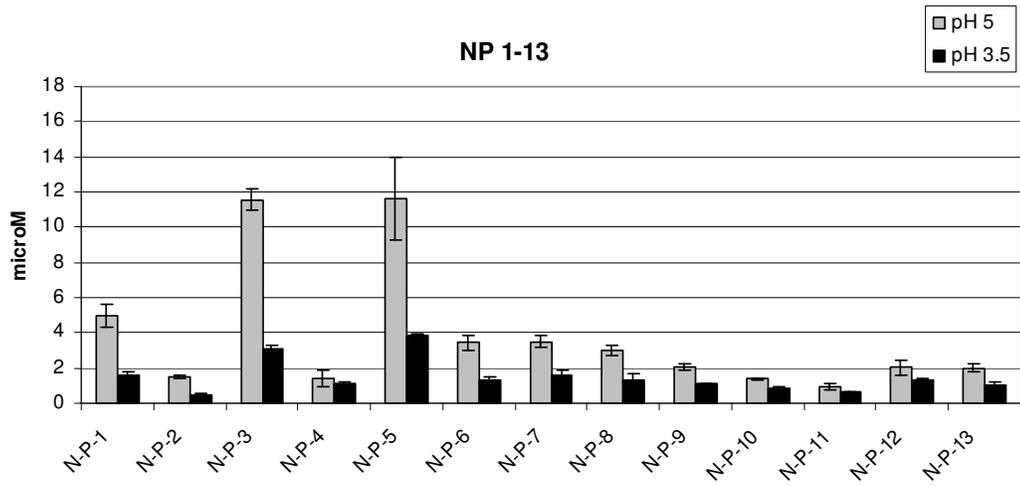
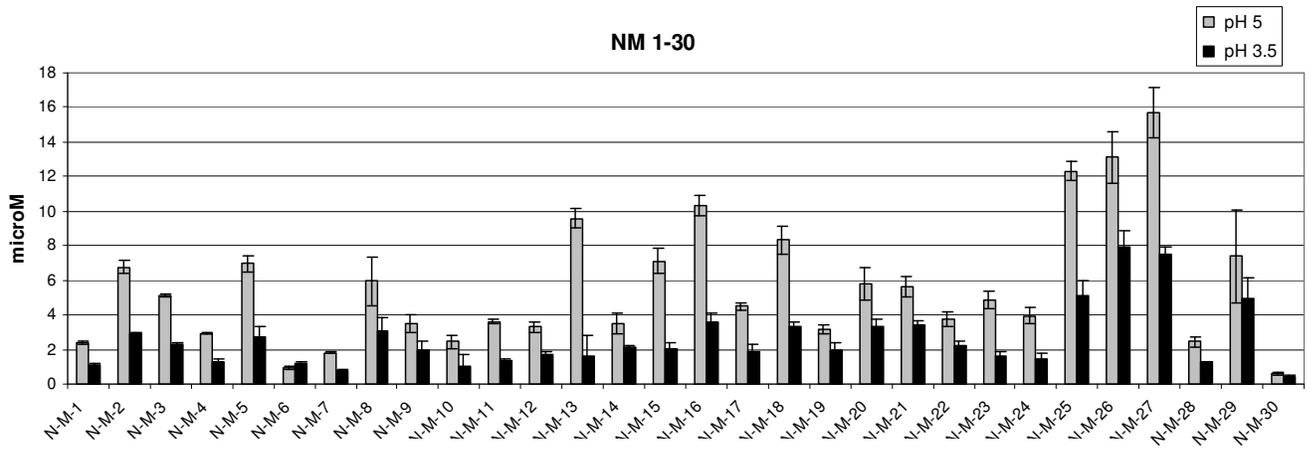


Fig 4.25 Attività β -glucosidasi in isolati naturali da vinaccia di Moscato (NM) e di Prosecco (NP) insilata direttamente in cantina, e vinaccia mista insilata a temperatura non controllata (TV) espressi in μ mol/l di prodotto (MU).

Come si può osservare facilmente 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 ottenuti nella loro globalità il massimo di attività a pH 5 (15,7 μ M) è stato ottenuto dal campione NM 27 mentre il minimo (0,9 μ M) nel campione NM 30, all'interno quindi dello stesso gruppo di isolati. In fig 4.26 e 4.27 sono riportate le distribuzioni, calcolate in forma di frequenza relativa, dei valori misurati suddivisi in classi, mentre in tab. 4.5 sono riportati i valori minimi, massimi e medi ottenuti in ciascun gruppo di isolati.

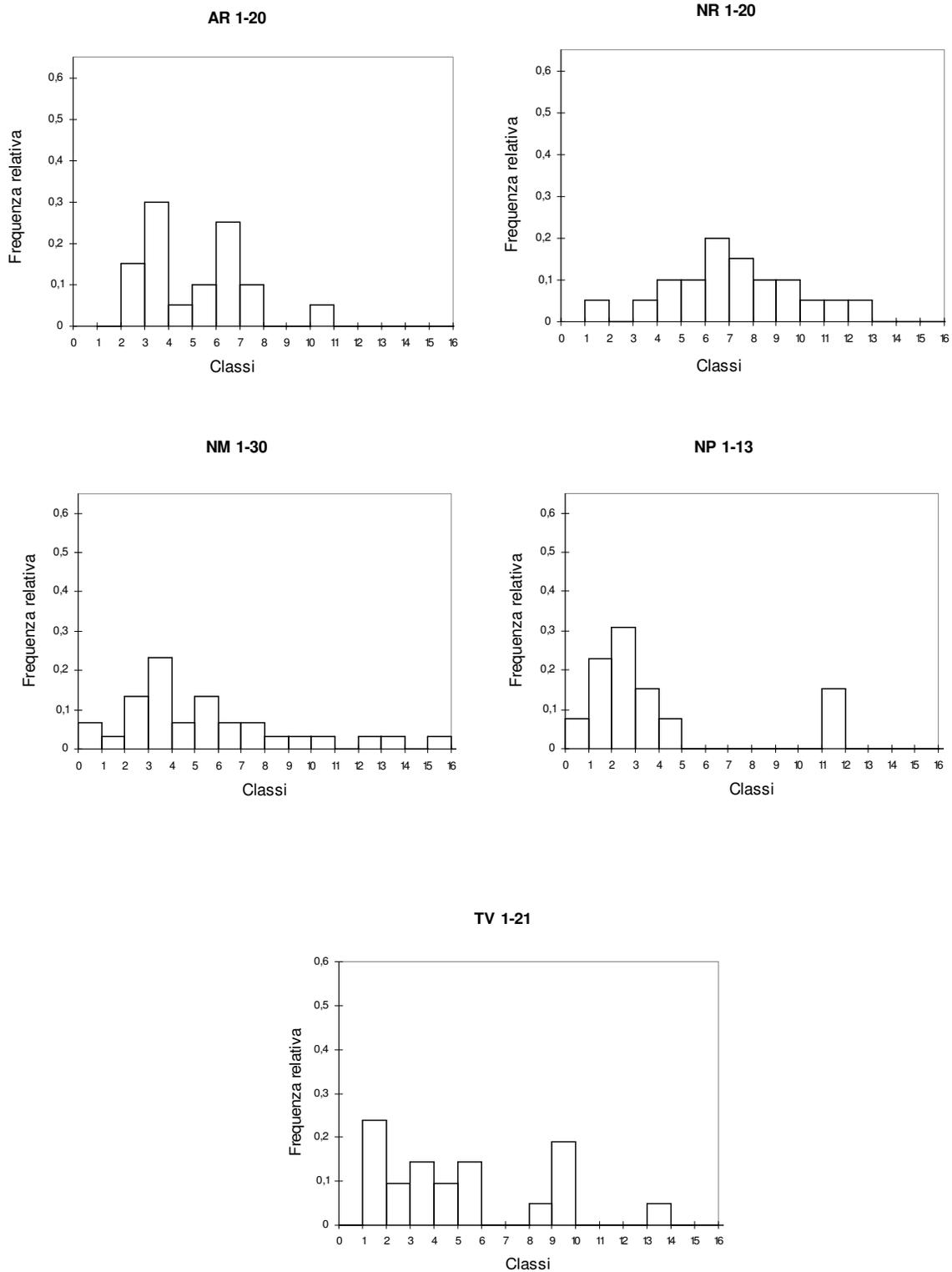


Fig. 4.26 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, dei valori di attività enzimatica ottenuti a pH 5.

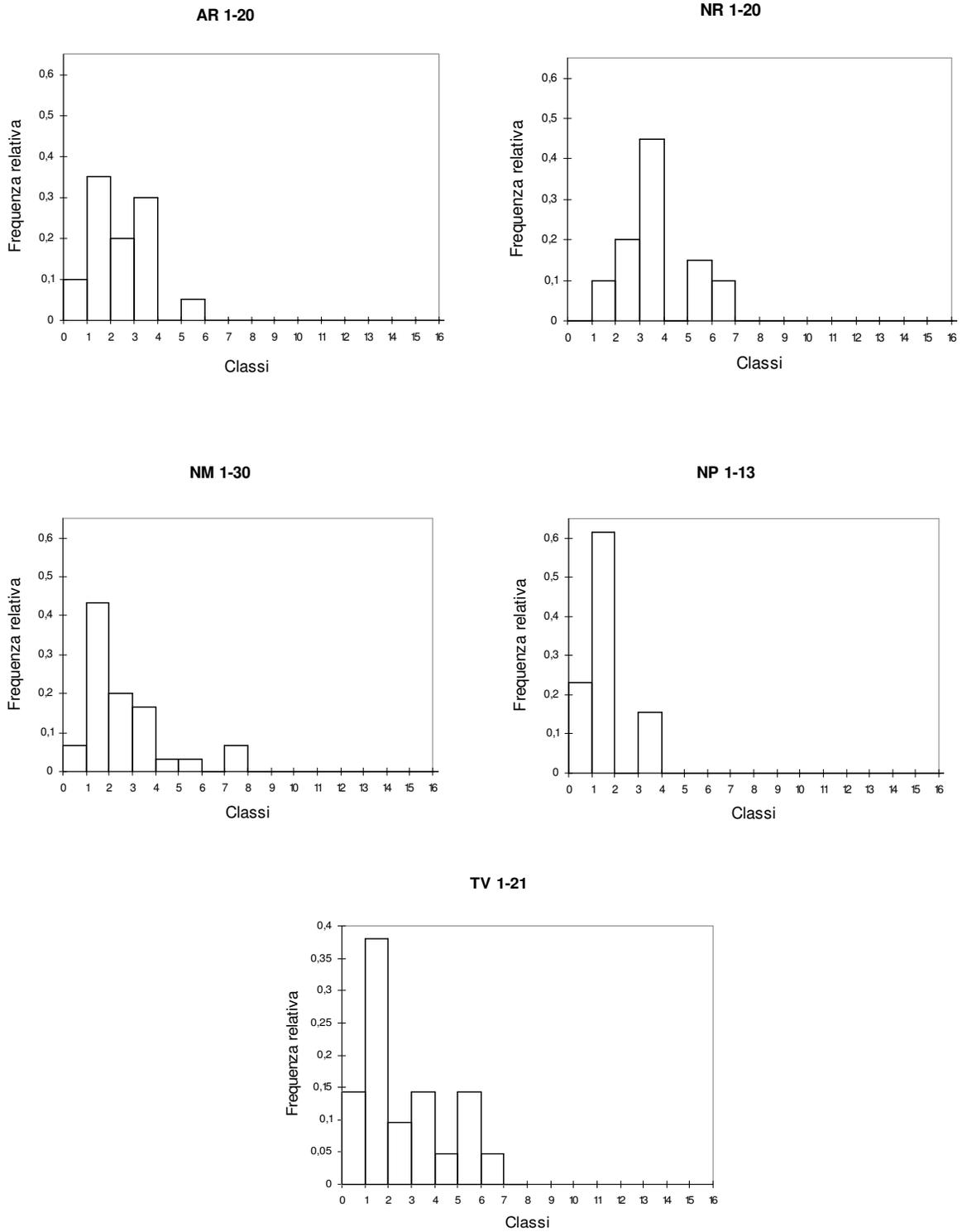


Fig. 4.27 Distribuzione, calcolata in forma di frequenza relativa, dei valori di attività enzimatica ottenuti a pH 3,5.

Gruppi	pH 5			pH 3,5		
	Minimo	Massimo	Media	Minimo	Massimo	Media
AR	2,0	10,7	5,0	0,6	5,7	2,5
NR	1,8	12,0	7,2	1,0	6,8	3,7
NM	0,6	15,7	5,6	0,4	8,0	2,6
NP	0,9	11,6	3,8	0,5	3,8	1,5
TV	1,3	13,3	5,2	0,8	6,1	2,7

Tab. 4.5 Valori minimi, massimi e medi dell'attività enzimatica (misurati in μM di MU prodotto) per ciascun gruppo microbico.

Considerando i ceppi provenienti da vinacce di Prosecco acidificate (AR) e non trattate (NR), isolati nella medesima sperimentazione, ad entrambi i pH il valore medio più elevato misurato si osserva tra gli isolati ottenuti da vinacce non acidificate. Sia la distribuzione che i dati riportati in tabella indicano che ad entrambi i pH tra gli isolati provenienti dalle vinacce di Moscato (NM) sono stati identificati i ceppi con maggiore attività. Al contrario gli isolati provenienti dalle vinacce di Prosecco insilate direttamente in cantina (NP) ad entrambi i pH mostrano i valori medi più bassi. Infine i ceppi provenienti da vinacce miste esposte ad alte temperature si collocano tra quelli con attività medio-alta.

I ceppi di lievito indigeni isolati da vinaccia nel corso di successive sperimentazioni, sono stati sottoposti ad una serie di prove fisiologiche con lo scopo di fornire un quadro di alcuni caratteri tecnologici utilizzati come parametri per l'individuazione di un possibile candidato da inoculare appositamente nell'ambiente vinaccia. Tra tutte le caratteristiche che la crescita in mosto consente di valutare, la capacità di avviare una pronta fermentazione è sicuramente uno dei più importanti. Un lievito in grado di convertire rapidamente il glucosio in alcol agisce riducendo lo sviluppo dei lieviti apiculati poco alcoligeni, e soprattutto di microrganismi dannosi come i batteri acetici. In relazione alle *performance* di fermentazione i ceppi provenienti dalle vinacce di Moscato (MN) hanno dimostrato le migliori caratteristiche in termini di vigore fermentativo, espresso come quantità di zucchero consumato dopo due giorni fermentazione. Il risultato è stato confermato dai valori di zucchero consumato

dopo sette giorni e dalla durata della fermentazione che nei casi migliori (13,3% degli isolati da Moscato) è di 10 e 11 giorni.

Considerando i dati relativi alla produzione di schiuma gli isolati provenienti dalle diverse matrici vegetali o sottoposte a diverse tipologie di trattamento si comportano in modo simile. Non si individua perciò nessun tipo di relazione tra questo carattere e il trattamento tecnologico eseguito o la matrice vegetale.

In relazione alle modalità di sviluppo la maggior parte dei ceppi, indipendentemente dalla matrice vegetale e dal trattamento, presenta uno sviluppo polverulento. Soltanto nelle vinacce di Moscato è presente una piccola percentuale di lieviti che si sviluppa in forma aggregata (6,7% del totale in questa matrice).

L'esito dell'indagine olfattiva indica che le caratteristiche aromatiche dei fermentati non sono in relazione al tipo di matrice o trattamento tecnologico utilizzato, e neppure alle *performance* di fermentazione. Infatti il maggior numero di ceppi che non solo ha ottenuto un giudizio positivo ma di cui il fermentato è stato segnalato perché dotato di intense note aromatiche è stato osservato nel gruppo di lieviti provenienti da vinacce di Prosecco non acidificate, caratterizzato da basse *performance* di fermentazione.

In relazione alla sintesi di idrogeno solforato, la maggior parte degli ceppi è dotata di una capacità intermedia, fanno eccezione le vinacce non trattate di Prosecco (NP), caratterizzate da una percentuale rilevante di lieviti in grado di produrne quantità elevate.

La crescita in presenza di dosi crescenti di anidride solforosa ha rivelato che nessun ceppo è risultato resistente a concentrazioni di 200 mg/l, mentre la maggior parte è in grado di sopportare concentrazioni di 50 mg/l (quantità comunemente impiegata in vinificazione). Alla dose intermedia di 100 mg/l, i ceppi che dimostrano una maggiore tolleranza provengono dalle vinacce di Prosecco non trattate prima dell'insilamento, mentre, in termini di velocità di crescita, i ceppi isolati da vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV) risentono meno dell'effetto dell'antisettico.

La valutazione delle caratteristiche di qualità ha riguardato essenzialmente la produzione di aromi varietali, liberati a partire da composti glicosilati non odorosi attraverso una serie di attività enzimatiche, in particolare l'attività β -glucosidasi. La crescita su terreno selettivo contenente cellobiosio come unica fonte di

carbonio ha permesso di caratterizzare in modo semiquantitativo l'attività β -glucosidasica presente nei 104 lieviti analizzati. È stato confermato, come riportato in letteratura, il basso livello di attività presente in generale all'interno della specie *Saccharomyces cerevisiae*. Lo screening effettuato con il metodo fluorimetrico basato sull'idrolisi di un substrato artificiale che contiene un legame β -glucosidico, evidenzia come i valori determinati siano sempre più alti 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. In questo caso negli isolati provenienti dalle vinacce di uve Moscato è stata osservata un'attività media più elevata, dovuta alla spiccata attività di una certa percentuale di ceppi, e a quella piuttosto bassa di altri.

4.3.7 ANALISI FATTORIALE DISCRIMINANTE

Mediante l'analisi delle frequenze è stato possibile valutare quali dei 103 ceppi esaminati possiedono le caratteristiche migliori relativamente a ciascuna proprietà tecnologica e qualitativa analizzata. In questo modo però non si è in grado di confrontare tutti gli isolati in relazione alle caratteristiche nel loro complesso, e neppure di sapere quali influiscano maggiormente nel distinguere i ceppi in base al gruppo di appartenenza, dato dall'origine o dal trattamento della vinaccia.

L'analisi fattoriale discriminante (CDA) costituisce un ottimo mezzo statistico per studiare graficamente le distanze tra gruppi e comprendere quali caratteristiche contribuiscano meglio alla discriminazione. Consente di effettuare la comparazione tra vari gruppi sulla base di un numero elevato di variabili mettendo in luce quali di queste rivestano un ruolo primario nella separazione dei gruppi.

La variabile di raggruppamento degli isolati è l'origine/trattamento della vinaccia, le variabili analitiche sono le seguenti: quantità di glucosio consumata a 2gg e a 7gg dall'inizio della fermentazione, la durata della fermentazione espressa in giorni, l'altezza della schiuma prodotta, la produzione di idrogeno solforato osservata su terreno Biggy, la resistenza all'anidride solforosa, la crescita su cellobiosio, l'attività β -glucosidasica misurata a pH 3,5 e a pH 5,0.

L'analisi consente di selezionare un insieme di poche variabili fattoriali (o canoniche) in grado di sostituire, ai fini della classificazione dei dati, le molte variabili quantitative di partenza. Nella tabella 4.6 sono riportate le correlazioni in base al coefficiente di Pearson tra i primi tre fattori (F1, F2, F3) ricavati dal

programma XLSTAT 2007 statistical software (Addinsoft), che indicano quanto le singole proprietà fenotipiche influiscano sulla variabilità totale dei campioni, e le variabili analizzate. Applicando il test di Student è possibile attribuire un valore di significatività a questi coefficienti. Si può osservare come l'asse F1 sia in grado di interpretare molto bene la variabilità relativa al consumo di glucosio a 2 e 7 giorni, e alla resistenza a 100 mg/l di SO₂. L'asse F2 è in grado di giustificare con un'elevata significatività anche le variabili durata di fermentazione e crescita su terreno Biggy. Meno significative sono invece le correlazioni con la produzione di schiuma e la resistenza a 50 mg/l di SO₂.

L'asse F3 è in grado di interpretare anche la variabilità legata ai rimanenti caratteri analizzati: la produzione di schiuma, la crescita su cellobiosio e l'attività β-glucosidasica testata ad entrambi i pH.

Variabile	Coefficiente di correlazione di Pearson					
	F1		F2		F3	
Glucosio consumato a 2gg	0,806	***	0,307	**	-0,064	
Glucosio consumato a 7gg	0,400	***	0,632	***	-0,013	
Giorni di fermentazione	0,052		-0,434	***	0,405	***
Schiuma	-0,025		0,318	**	-0,257	**
Valutazione olfattiva	0,028		-0,016		-0,047	
Crescita su terreno Biggy	0,154		-0,481	***	-0,122	
Crescita su cellobiosio	-0,135		-0,097		-0,283	**
Attività β-glucosidasica pH 5	-0,015		-0,027		0,587	***
Attività β-glucosidasica pH 3,5	-0,151		-0,052		0,750	***
Resistenza SO ₂ 50mg	-0,183		-0,215	*	0,177	
Resistenza SO ₂ 100mg	-0,332	***	-0,025		0,263	**

Tab. 4.6 Coefficiente di correlazione di Pearson di ciascuna variabile per gli assi F1, F2 ed F3 (*P<0,05; P<0,01; *** P<0,001).

In figura 4.28 sono riportati i grafici ottenuti con l'analisi fattoriale discriminante dei 103 isolati appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* di cui sono state definite le performance di fermentazione in mosto sintetico.

La variabile fattoriale F1, riportata sull'asse X dei grafici, da sola giustifica il 63,75% del totale della variabilità del sistema, mentre la variabile F2, riportata sull'asse Y, spiega il 17,55%. Sommando le due percentuali si ottiene l'interpretazione dell'81,30% della variabilità totale, risultato che dal punto di vista statistico indica che quest'analisi è in grado di descrivere molto bene i dati

sperimentali ottenuti. Le variabili F3 ed F4 con il 13,85% e il 4,84% rispettivamente, se sommate alle prime due rendono conto dell'intera variabilità dei dati.

Considerando il primo grafico, lungo l'asse F1, come riportato in tabella, i campioni si distribuiscono in base a differenze nelle variabili "glucosio consumato a 2 e 7 giorni" con correlazione positiva, e resistenza a 100 mg/l di SO₂ con correlazione negativa. Lungo l'asse F2 si distribuiscono ancora rispetto al consumo di glucosio, ma anche rispetto alla "durata della fermentazione", "schiuma", alla "crescita su terreno Biggy" e meno significativamente alla "resistenza a 50 mg/l di SO₂". La suddivisione in quadranti permette di definire le caratteristiche comuni degli isolati che si collocano nella stessa area del grafico. Nel primo quadrante si raggruppano gli isolati che consumano rapidamente il glucosio, concludono più rapidamente la fermentazione, producono quantità maggiori di idrogeno solforato, e hanno una buona resistenza ad alte concentrazioni di antisettico. La maggior parte dei ceppi isolati da vinacce di Moscato (NM) si trova in questa situazione. Poiché il parametro consumo di glucosio è rappresentato significativamente lungo entrambi gli assi, i ceppi meno vigorosi sono collocati nell'area negativa, cioè nel terzo quadrante. Qui si trovano anche i ceppi che portano a termine la fermentazione in un numero maggiore di giorni.

Nel secondo quadrante vi sono invece i ceppi veloci nel completare la fermentazione ma non sempre in grado di degradare il glucosio rapidamente fin dall'inizio. Si può osservare come quasi tutti i ceppi provenienti da vinaccia mista insilata a temperatura non controllata (TV) si trovino in questa situazione.

Per quanto riguarda invece il secondo grafico, sull'asse F3 delle ordinate i campioni si distribuiscono secondo le variabili "giorni di fermentazione", "resistenza a 100 mg/l di solforosa", "attività β -glucosidasi", "crescita su cellobiosio" e "produzione di schiuma", queste ultime con correlazione negativa, e con una significatività minore. Nel primo quadrante quindi si trovano non solo i ceppi maggiormente vigorosi e che concludono la fermentazione più velocemente ma anche quelli dotati di una buona attività β -glucosidasi relativamente alla misura effettuata con il metodo fluorimetrico. Considerando invece la crescita su cellobiosio i ceppi migliori si trovano nella parte sinistra del grafico (secondo e

terzo quadrante). Questo dato si può spiegare con la diversa tipologia dei due metodi, quest'ultimo non quantitativo, che valuta la crescita del lievito in quanto in grado di idrolizzare il substrato cellobiosio, ma non fornisce una risposta diretta alla misura dell'attività come nel caso dell'idrolisi del substrato specifico MUD.

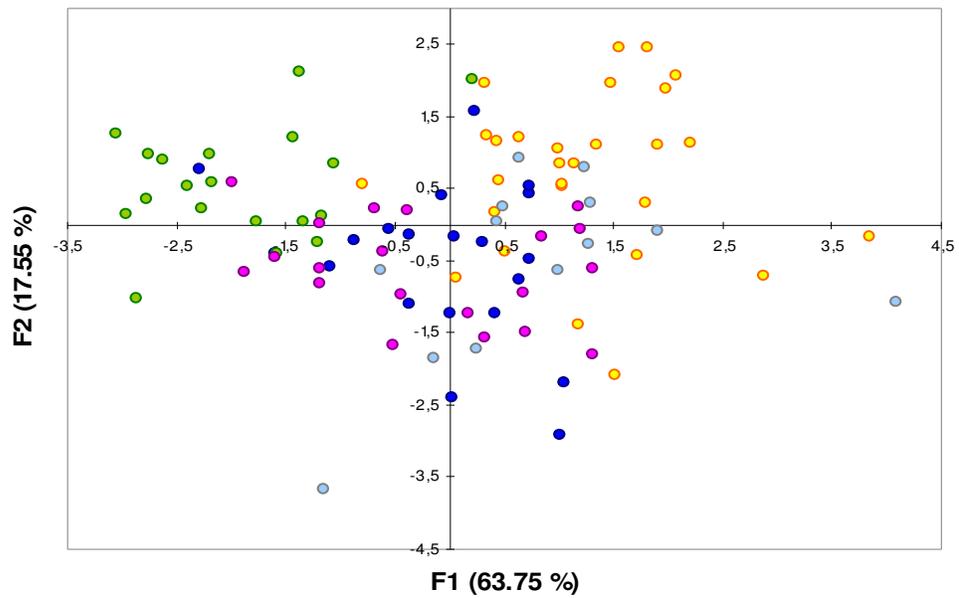
Nel complesso pertanto, i ceppi da considerare come migliori sono quelli localizzati in questo settore in quanto possiedono buone caratteristiche tecnologiche e di qualità. Anche in questo caso, si tratta principalmente dei lieviti provenienti dalle vinacce di Moscato. Questo dato potrebbe essere correlato alle caratteristiche del vitigno: la quantità di aromi varietali che si sviluppano nell'uva Moscato è molto più elevata rispetto a quella riscontrabile in Prosecco. Ciò è dovuto all'elevata presenza di composti glicosilati nelle bucce, che costituiscono i precursori oggetto di idrolisi da parte delle glicosidasi del lievito. Infine si può osservare come i ceppi isolati da vinacce di Prosecco sia acidificate sia non acidificate, e quelli da vinacce sempre di Prosecco ma insilate direttamente in cantina, non siano localizzati in una parte definita del grafico. Risultano sparsi nella zona centrale attorno all'origine degli assi, evidenziando quindi un'elevata eterogeneità relativamente alle caratteristiche fisiologiche analizzate. Questa diversità indica che i lieviti appartenenti a questi tre gruppi non sembrano avere caratteristiche comuni, come accade invece per i gruppi NM e TV.

L'analisi fornisce anche il risultato del test della variabile Lambda di Wilks (una variabile casuale continua utilizzata nei test di verifica d'ipotesi nell'ambito della statistica multivariata), in base al quale va accettata l'ipotesi che almeno una delle medie dei cinque gruppi sia diversa dall'altra ($P < 0,05$). La tabella 4.7 riporta le variabili fenotipiche analizzate in ordine di importanza ed il relativo valore F, calcolato dal test. Come si può osservare dai valori riportati le variabili che incidono più significativamente nello spiegare le differenze tra gruppi sono il glucosio consumato a 2 e 7 giorni, e l'attività β -glucosidasi.

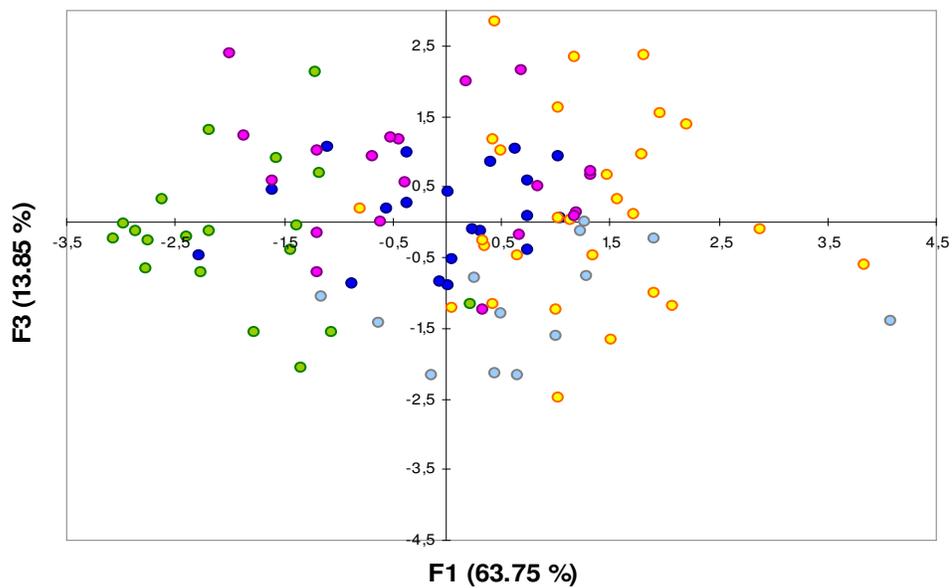
Variabile	Lambda	F	p-value	
Glucosio consumato a 2gg	0,600	16,168	< 0.0001	***
Glucosio consumato a 7gg	0,798	6,126	0,000	***
Giorni di fermentazione	0,910	2,405	0,055	
Schiuma	0,951	1,261	0,291	
Valutazione olfattiva	0,983	0,422	0,792	
Crescita su terreno Biggy	0,919	2,148	0,081	
Crescita su cellobiosio	0,944	1,425	0,231	
Attività β -glucosidasica pH 5	0,904	2,574	0,042	
Attività β -glucosidasica pH 3,5	0,837	4,722	0,002	**
Resistenza SO ₂ 50mg	0,960	1,014	0,404	
Resistenza SO ₂ 100mg	0,912	2,333	0,061	

Tab. 4.7 Variabili statistiche analizzate e significatività statistica.

Questo tipo di analisi multivariata si è rivelato efficace nel mettere in relazione la diversa origine della vinaccia o il trattamento al quale è stata sottoposta con le caratteristiche fenotipiche degli isolati, consentendone una valutazione complessiva invece che distinta in base al gruppo.



● AR ● TV ● NM ● NR ● NP



● AR ● TV ● NM ● NR ● NP

Fig. 4.28 Distribuzione dei 103 isolati da vinaccia in base all'analisi fattoriale discriminante. Vinacce di Prosecco sottoposte al trattamento di acidificazione (AR), non acidificate prima dell'insilamento (NR), di Prosecco (NP) e di Moscato (NM) insilate direttamente in cantina, vinacce miste lasciate fermentare senza alcun controllo dei parametri chimico-fisici (TV).

**5. Costruzione di mutanti di delezione per geni
codificanti per esoglucanasi coinvolte nell'attività
 β -glucosidasica**

5.1 INTRODUZIONE

5.1.1 IL RUOLO DELLE ESOTRIPOLISACCARIDASI NELLA PRODUZIONE DI AROMI PRIMARI

Lo screening dell'attività β -glucosidasi, condotto sui 104 ceppi di lievito isolati da vinaccia analizzati in questo lavoro, ha confermato come nei lieviti *Saccharomyces* l'attività di idrolisi dei glicosidi dell'uva da parte dell'enzima sia piuttosto ridotta. In generale, il taglio selettivo dei legami glicosidici è cruciale in una varietà di processi biologici fondamentali per tutti gli organismi. Il numero crescente di famiglie di glicosidasi (GH) riflette la diversità di substrati e la necessità di effettuare tagli selettivi del legame glicosidico. Sono state individuate circa 90 famiglie GH: le β -glucosidasi costituiscono un gruppo importante all'interno delle famiglie GH1 e GH3 e sono in grado di idrolizzare sia i legami O- β -D-glicosidici (β -D-glucoside glucoidrolasi, EC 3.2.1.21) sia S-glicosidici (β -D-tioglucoide glucoidrolasi, EC 3.2.3.1).

Nessuna delle open reading frame presente nel database genomico di *S. cerevisiae* può essere incluso nelle famiglie di β -D-glucosidasi GH1 e GH3 (Gil J. *et al.* 2005). Dati relativi a studi di specificità di substrato e di inibizione (Ridruejo *et al.*, 1989) hanno suggerito che le β -glucanasi esocellulari sono da considerarsi idrolasi con attività principalmente β -glucosidasi (EC3.2.3.21). La specie *Saccharomyces cerevisiae* possiede un gran numero di endo- e eso-1,3- β -glucanasi, e sembra che una quindicina di geni codifichino per polipeptidi con attività glucanasi o correlata. Le glucanasi di fungo si dividono in due categorie in relazione alla loro modalità di azione: le endoglucanasi tagliano legami glicosidici interni, mentre le esoglucanasi (Exg) attaccano la parte terminale delle catene rilasciando solo glucosio. Esse svolgono un ruolo all'interno di processi di accrescimento, riproduzione, coniugazione, gemmazione, produzione di ascospore, fermentazione dei polisaccaridi, che richiedono l'idrolisi localizzata dei β -glucani di parete, crescita della parete cellulare (Baladron V. *et al.* 2002). Di seguito sono descritte le principali:

- la proteina Eng1p è coinvolta nella scomparsa del setto durante la divisione cellulare.
- la singola delezione del gene *SCW11*, uno dei geni appartenente alla famiglia di geni *SCW* codificanti per glucanasi di parete solubili, ha

evidenziato una notevole inibizione della separazione cellulare dopo divisione. Il gene *SCW3*, noto anche come *SUN4* è il quarto membro della famiglia genica *SUN*, che codifica per proteine con funzione cellulare omologa a quella di una β -glucosidasi (Adams D. *et al.* 2004).

- La β -endoglucanasi Bgl2, potrebbe essere coinvolta nell'introduzione di legami β 1,6 nella struttura di 1,3- β -glucano della parte cellulare dei funghi. Delezioni singole e doppie dei geni *SCW* hanno consentito di definire la funzione delle singole proteine e le interazioni sinergiche tra esse, verificando i mutamenti fenotipici indotti a livello di efficienza di coniugazione. Inoltre la delezione del gene *BGL2* ha rivelato un effetto antagonistico sul ruolo delle proteine Scw4 e Scw10 (Cappellaro C. *et al.*, 1998).
- In *Saccharomyces cerevisiae* sono presenti inoltre tre attività eso-1,3- β -glucanasiche codificate dai geni *EXG1*, *EXG2* e *SSG1*. Il trascritto di quest'ultimo è stato individuato solo in diploidi che sporificano.

5.1.1.2 Le esoglucanasi Exg1p ed Exg2p di *Saccharomyces cerevisiae*

Il gene *EXG1* codifica per il principale isoenzima Exg1 e si colloca nel braccio destro del cromosoma XII. L'open reading frame ha una lunghezza di 1344 pb e codifica per un polipeptide di 448 aminoacidi. Il primo prodotto della traduzione subisce poi un processo di glicosilazione lungo la via di secrezione (*sec*) che determina la formazione di diverse glicoforme, le maggiori sono Exg1a ed Exg1b, che vengono secrete nel mezzo di coltura.

Il gene *EXG2* invece è localizzato nel braccio destro del cromosoma IV, e la sua ORF comprende 1686 nucleotidi che codificano una sequenza polipeptidica di 562 aminoacidi, che presenta un'omologia significativa con il prodotto del gene *EXG1* (Larriba G. *et al.*, 1995), a differenza di questa non è rilasciata nel mezzo ma si associa alla membrana plasmatica tramite un'ancora di GPI (glicosilfosfatidilinositolo). I due enzimi, prodotti costitutivamente, secondo alcuni autori possono agire come β -glucosidasi tagliando i legami 1,3- β e 1,6- β del glucano. Nebreda *et al.* (1987) hanno dimostrato che Exg1 ed Exg2 riescono ad idrolizzare glicosidi sintetici come il *p*-nitrofenil- β -D-glucoside. Per chiarire il ruolo di queste esoglucanasi nella liberazione dei composti odorosi l'enzima

EXG1 di *S. cerevisiae* è stato recentemente sovraespresso (Gil *et al.* 2005). Sono stati utilizzati due approcci complementari, uno che ha previsto l'utilizzo del promotore proprio di *EXG1* (classificato come promotore forte durante la fase di crescita esponenziale), e l'altro in cui l'espressione è stata guidata dal promotore *ACT1*, anch'esso altamente espresso ma costitutivamente. Testando l'attività dei mutanti con pNPG si è visto che tutti i trasformati hanno evidenziato un'aumento dell'attività compreso tra 20 e 40 volte, dopo uno e sei giorni di crescita rispettivamente, principalmente associata alle cellule intere. Inoltre la determinazione del contenuto di alcoli superiori e terpenoli nel mosto prodotto durante esperimenti di microvinificazione ha mostrato un aumento dei composti volatili rispetto al ceppo di controllo, in particolare alcol 2-feniletilico, nerolo e geraniolo.

Nel presente lavoro è stato preso in considerazione un approccio basato non sulla sovraespressione dei due geni *EXG1* ed *EXG2*, quanto sulla loro delezione con lo scopo di delucidare il ruolo di queste esoglucanasi in relazione all'attività β -glucosidasi. Si è voluto inoltre verificare se il protocollo di trasformazione utilizzato, tra i più efficienti e rapidi quando si lavora con ceppi di laboratorio, fosse applicabile con esito positivo anche a ceppi naturali.

5.1.2 METODI DI TRASFORMAZIONE E DELEZIONE

L'efficienza di trasformazione dei lieviti è inferiore rispetto a quella dei batteri, a causa della rigida parete costituita da glucani e mannoproteine. La trasformazione genetica di *Saccharomyces cerevisiae* è stata descritta per la prima volta da Oppenoorth (1960) e successivamente studiata in molti lavori. Si è scoperto che non solo i protoplasti, cellule di lievito private della parete mediante lisi enzimatica, ma anche le cellule intere possono essere trasformate con DNA plasmidico. Con lo scopo di aumentare l'efficienza di trasformazione sono stati sviluppati diversi metodi di pretrattamento delle cellule, come lo shock termico, il trattamento con cationi alcalini monovalenti (Na^+ , K^+ , Cs^+ e in particolare Li^+) o composti tiolici, che rendono le cellule maggiormente competenti. Per la trasformazione di cellule intere di lievito, un protocollo più comunemente utilizzato, messo a punto e ottimizzato da Gietz *et al.* (1995), fa uso di polietilenglicole e acetato di litio. Recentemente il ruolo di questi composti nella

trasformazione è stato investigato mediante microscopia di fluorescenza. Il Li⁺ modifica la porosità della parete cellulare, che costituisce una barriera al passaggio del DNA, e accresce la disponibilità di siti di legame sulla superficie. Il trattamento con PEG invece favorisce il legame del DNA, rendendone possibile l'entrata all'interno del lievito (Ito H. *et al.* 1982). Un altro metodo impiegato in alcuni casi è rappresentato dall'elettroporazione, il cui vantaggio principale è la semplice e rapida inserzione del DNA nelle cellule senza trattamenti chimici o shock termici. Questo tipo di permeabilizzazione di breve durata consente di minimizzare i cambiamenti nella fisiologia delle cellule durante la trasformazione, aspetto importante nel caso di lieviti sensibili alla temperatura (Ishiguro J. *et al.* 1995).

Il metodo di delezione genica è utilizzato correntemente per assegnare una funzione ai geni di *S. cerevisiae* la cui attività non è ancora nota. Questo approccio consente la sostituzione di ogni open reading frame con un marcatore di selezione eterologo, e la successiva indagine sul fenotipo risultante (Wach *et al.* 1994). Classicamente questa strategia richiedeva l'impiego di diversi passaggi di clonazione per creare un costrutto in cui il marcatore è incluso tra le estremità 5' e 3' del gene di interesse. Questa procedura è stata semplificata introducendo un unico passaggio di amplificazione con PCR.

La scelta del marcatore di selezione è uno dei fattori chiave che influenzano l'efficienza del metodo ed è correlata al tipo di lievito che si vuole studiare. I ceppi industriali o isolati da ambienti naturali sono nella maggiorparte dei casi prototrofi, pertanto non è possibile utilizzare, come per i ceppi di laboratorio, geni marcatori che codificano per enzimi chiave di vie metaboliche come la sintesi de novo degli aminoacidi (Pronk J., 2002). Un esempio sono i geni *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* che codificano per gli aminoacidi L-istidina, L-leucina, L-triptofano. L'uso di questi marcatori è limitato ai ceppi di autotrofi per un certo tipo di nutriente a causa della mancanza di una copia funzionale nel cromosoma.

In questi casi pertanto si ricorre all'impiego di geni che conferiscono la resistenza ad antibiotici per selezionare i trasformanti. Uno dei problemi connessi a questo approccio però, consiste nella necessità di eliminare il marcatore una volta ottenuto il mutante nullo. Il sistema messo a punto da Güldener U. *et al.* (1996), descritto più avanti, ha consentito di ovviare a questo problema, facilitando inoltre

il chiarimento della funzione dei membri di intere famiglie geniche mediante delezioni multiple.

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 CEPPI DI LIEVITO

Per le trasformazioni sono stati utilizzati due ceppi di lievito. Il primo, indicato con la sigla NM-12, è stato isolato da vinaccia di Moscato insilata direttamente in cantina durante la vendemmia 2002. Il secondo è un *Saccharomyces* isolato da uva di Raboso, durante la vendemmia 2005, identificato con la sigla R150.1.

5.2.2 PLASMIDI

I plasmidi utilizzati in questo lavoro sono elencati in tabella:

Plasmide	Descrizione	Provenienza
pUG6	Plasmide con il marcatore kanMX4 che contiene il gene per la resistenza alla geneticina fiancheggiato dai siti loxP.	Watch <i>et al.</i> (1994)
YEp351-cre-cyh	Plasmide episomale che contiene il gene della ricombinasi Cre sotto il controllo del promotore del gene GAL1, e il gene marcatore cyh2 che conferisce la resistenza alla cicloesimide.	Delneri <i>et al.</i> (2000)

5.2.3 MEZZI E SOLUZIONI

5.2.3.1 Mezzi di propagazione ordinaria e mezzi minimi

YPD 20g

estratto lievito	10 g/l
bactopeptone	10 g/l
glucosio	20 g/l

YPD 5g

estratto lievito	10 g/l
bactopeptone	10 g/l
glucosio	5 g/l

LB

estratto lievito	5 g/l
bactotriptide	10 g/l
NaCl	10 g/l

Per la preparazione di terreni solidi sono stati aggiunti 20 g/l di Bacto Agar (OXOID).

YPGal

estratto lievito	10 g/l
bactopeptone	10 g/l
galattosio	20 g/l

YNB

Yeast Nitrogen Base	1,5 g/l
---------------------	---------

SD (Synthetic Dextrose minimal medium)

Yeast Nitrogen Base (senza amminoacidi)	1,7 g/l
glucosio	20 g/l
solfato di ammonio	5 g/l

5.2.3.2 Soluzioni

DNA carrier

Per preparare una soluzione 2 mg/ml, pesare 200 mg di DNA ad alto peso molecolare di sperma di salmone (Sigma D1626) in 100 ml di acqua sterile. Sciogliere la soluzione mescolando vigorosamente in agitatore magnetico per 2-3 ore.

Acetato di litio

Per preparare uno stock di acetato di litio 1M sciogliere 102,2 g in 100 ml di acqua deionizzata e autoclavare a 121°C per 20 minuti.

PEG Polietilenglicole 50%

Sciogliere 50 g di polietilenglicole, PM 3350 (Sigma P3640), in 100 ml di acqua deionizzata e sterilizzare per filtrazione.

5.2.3.3 Condizioni di crescita

I ceppi di lievito sono stati cresciuti in liquido in provette tipo Falcon da 50 ml contenenti 10 ml di mezzo YPD, o in beute contenenti 50 ml dello stesso terreno. La coltura è stata sottoposta ad una temperatura di 30 °C con agitazione (80-100 rpm/min) per 24 h. I ceppi di lievito cresciuti su piastra sono stati incubati a 30 °C per 4-5 giorni.

Il ceppo di *E. Coli* è stato cresciuto in mezzo LB a 37°C con agitazione (100-130 rpm/min) o su piastra a 37°C per 2-3 giorni.

Quando richiesto ai mezzi culturali sono stati aggiunti gli opportuni antibiotici, alle seguenti concentrazioni:

Ceppo	Antibiotico	conc. finale	conc. stock
Lieviti	Geneticina-G418 (GibcoBRL)	200 mg/l	20 mg/ml
Lieviti	Cicloesimide	2 µg/mL	10 mg/ml
E.Coli	Ampicillina	50 µg/ml	50 mg/ml

5.2.4 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO SU LARGA SCALA DA *E.Coli*

Per ottenere DNA plasmidico in piccola quantità è stato fatto un inoculo di *E. coli* in 10 ml di terreno LB con ampicillina ed è stato applicato il metodo della lisi alcalina descritto da Sambrook e Russel (2001). La coltura è stata trasferita in tubini Eppendorf contenuti 1,5 ml ciascuno, e centrifugata a 12000 rpm per 2 minuti in una microcentrifuga (Eppendorf). Al pellet sono stati aggiunti 100 µl di soluzione di risospensione (glucosio 50 mM, Tris-HCl 25 mM a pH 8, EDTA 10 mM a pH 8). Dopo aver agitato vigorosamente sono stati aggiunti 200 µl di soluzione di lisi (NaOH 0,2 N, SDS 1%) e si è mescolato per inversione. La soluzione è stata lasciata in ghiaccio per 5 minuti, successivamente sono stati aggiunti 150 µl di soluzione di neutralizzazione (per 100 ml di soluzione: 60 ml di acetato di potassio 5M, 11,5 ml di acido acetico glaciale e 28.5 ml di H₂O). Dopo aver agitato con vortex le provette sono state lasciate in ghiaccio per 10 minuti, poi centrifugate a 12000 rpm per 15 min. Il surnatante è stato recuperato con attenzione e centrifugato nuovamente alle stesse condizioni. Per favorire la precipitazione del DNA sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto corrispondenti a 900 µl e dopo aver agitato vigorosamente i tubini sono stati posti a -20°C per 3-4 h. I campioni sono stati quindi centrifugati per 15 minuti a 13000 rpm, a 4°C, in una centrifuga di tipo Sigma 3K15 (Germania), lavati con 200 µl di etanolo al 70%. Dopo un'ulteriore centrifugata alle stesse condizioni è stato eliminato il surnatante, il pellet è stato seccato e risospeso in 50 µl di acqua. E' stata aggiunta RNAsi (0,2 µg/µl) e l'incubazione è stata fatta a 37°C per un'ora.

5.2.5 TRASFORMAZIONE DI LIEVITI

I ceppi di *S. cerevisiae* sono stati trasformati utilizzando il protocollo basato sull'incubazione con acetato di litio ottimizzato da Gietz *et al.* (1995). E' stato effettuato un preinoculo in 10 ml di terreno liquido YPD, utilizzato per inoculare 50 ml dello stesso terreno con lo scopo di ottenere la crescita della coltura fino ad una densità ottica a 600nm di circa 1,6. Dopo circa 3 ore le colture sono state centrifugate a 3500 rpm per 3 minuti in una centrifuga di tipo Sigma 3K15. Il pellet è stato lavato con 25 ml di acqua milliQ sterile e successivamente centrifugato. E' stato poi risospeso in 1 ml di acetato di litio 100 mM e trasferito in provette tipo eppendorf. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 30 secondi in una microcentrifuga tipo Eppendorf, è stato eliminato il surnatante, e il pellet è stato risospeso in 400 µl di acetato di litio 100 mM. Dopo aver vortexato, le cellule risospese sono state separate in aliquote da 50 µl, una per la trasformazione e una per il controllo non trasformato. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 30 secondi, è stato eliminato il surnatante e sono stati aggiunti in ordine i seguenti componenti:

Componenti	Volume	Concentrazione stock
Cassetta di delezione/plasmide YEp 351-cre-cyh *	34/15 µl	100-10 ng/ µl
DNA carrier	50 µl	2 mg/ml
Acetato di litio	36 µl	1M
PEG	240 µl	50%

* Il componente indicato varia in base al tipo di trasformazione, nel caso del controllo non trasformato sono stati aggiunti gli stessi volumi di acqua milliQ sterile.

Le cellule sono state fatte crescere in terreno YPD senza aggiunta di antibiotico durante tutta la notte, con lo scopo di favorire la crescita della coltura. Successivamente si è proceduto alla centrifugazione della coltura, e dopo eliminazione del surnatante il pellet è stato risospeso in 1 ml di YPD liquido. Rispettivamente 150 e 50 µl delle colture di trasformati, e 50 µl delle colture utilizzate come controllo sono stati strisciati in terreno YPD agar addizionato con 200 mg/l di geneticina. Le piastre sono state incubate a 30°C per 48-72 ore.

5.2.6 ELIMINAZIONE DEL MARCATORE DI SELEZIONE INTEGRATO NEL GENOMA

Per eliminare il marcatore kanamicina, è stata fatta crescere overnight con agitazione, in 15 ml di terreno YPD addizionato con antibiotico cicloesimide (2µg/ml), una coltura di lieviti trasformati con la cassetta di delezione del gene di interesse. E' stata quindi misurata l'OD₆₀₀ nm in modo da inoculare in 25 ml di YPD un volume di cellule avente circa $5 \cdot 10^6$ cellule/ml. Dopo 2 ore di incubazione la coltura è stata lavata con 25 ml di acqua sterile e centrifugata a 3500 rpm per 3 minuti. Le cellule sono state risospese in 25 ml di terreno YPGal e cresciute a 30°C per 3 ore, con lo scopo di indurre la sintesi della ricombinasi Cre. Successivamente è stata misurata l'OD₆₀₀ e sono state calcolate le opportune diluizioni in modo da piastrare su terreno YPD agar un numero di cellule compreso tra 25 e 150. Le piastre sono state incubate a 30°C per 48 ore. Le colonie cresciute sono state replicate in YPD addizionato con geneticina con lo scopo di verificare la perdita del marcatore. Le colonie cresciute solo in YPD e non in YPD-G418, che hanno pertanto perso la resistenza, sono state selezionate per i successivi passaggi di trasformazione.

5.2.7 AMPLIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

La verifica dell'eliminazione dei geni e del marcatore è stata verificata mediante PCR. Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore i-Cycler (Biorad). I primer utilizzati sono stati forniti in forma liofilizzata dalla ditta Isogen (Olanda), sono stati risospesi in acqua sterile alla concentrazione di 100 µM. I primer utilizzati sono riportati in tabella 5.1 :

Primer	Lunghezza	Sequenza (5'-3')	Uso
EXG1-S1	56 bp	<u>CTAGTTAATTACCAACTAAAATGCTT</u> <u>TCGCTTAAAACGCGTACGCTGCAGGT</u> CGAC	Cassetta di delezione del gene EXG1
EXG1-C2	58 bp	<u>CGGACTGAGGGCGACTTAGTTAGAAA</u> <u>TTGTGCCACATTGGACTAGTGGATCT</u> GATAT	Cassetta di delezione del gene EXG1
EXG1-S1b	56 bp	<u>GTTGACTGTGTCATCAGTACTCGCTA</u> <u>CCCCAGTCCCTGCGTACGCTGCAGGT</u> CGAC	Cassetta di delezione del gene EXG1
EXG1-C2b	57 bp	<u>GGCATCTAGTTGTGCCTCCACATAAC</u> <u>GTCTTGTGTTTTTACTAGTGGATCTGA</u> TAT	Cassetta di delezione del gene EXG1
EXG1-A1	20 bp	CTAAAGTTTACGAGAGGACC	Verifica della delezione del gene EXG1
EXG1-A3	20 bp	CAGTGTCCAAGTATTCCTCC	Sonda in 3' del gene EXG1
EXG1-A2	23 bp	GGGGTAGATAAAATTAACGTTCTG	Verifica della delezione del gene EXG1
EXG2-S1	58 bp	<u>CGTTCGTTACTTGGGACGTCCTAATAT</u> <u>GCCTTTGAAGTCCACTAGTGGATCTG</u> ATATC	Cassetta di delezione del gene EXG2
EXG2-C2	58 bp	<u>CACCACACTGTTGCGCTTTACTTTAAA</u> <u>GAGAAGCGCAAAGCGTACGCTGCAG</u> GTCGAC	Cassetta di delezione del gene EXG2
EXG2-S1b	60 bp	<u>GCAAACGACACTATCACCGTGAAAGG</u> <u>TATTACTATTGGCGGCACTAGTGGA</u> TCTGATATC	Cassetta di delezione del gene EXG2
EXG2-C2b	56 bp	<u>GATAGCGAGTGCGCATAACGCTCGCTT</u> <u>TCCAGGTCAAACCGTACGCTGCAGGT</u> CGAC	Cassetta di delezione del gene EXG2
EXG2-A1	20 bp	CGTGAGATTTTAGCGGTTC	Verifica della delezione del gene EXG2
EXG2-A3	19 bp	CCGTCATGAATAACAAACG	Sonda in 3' del gene EXG2
EXG2-A2	21 bp	CTACATAGTGCTACGTTCTG	Verifica della delezione del gene EXG2
K2	20 bp	GGGACAATTCACGCGTCTG	Primer interno di pUG6

Tab 5.1: Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati in questo lavoro. La sequenza sottolineata corrisponde all'estremo 5' (primer S1) o 3' (primer C2) dei geni corrispondenti. La sequenza non sottolineata corrisponde alla sequenza del plasmide pUG6 utilizzato come stampo.

Le prove di PCR sono state eseguite in volumi di reazione di 25 µl nel caso di amplificazioni analitiche, e di 50 µl nel caso di amplificazioni preparative.

Per la costruzione della cassetta di delezione dei geni EXG1 e EXG2 i vari componenti della miscela di reazione sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni in un volume finale di 50 μ l:

Componenti	Concentrazione finale
Primer EXG1-S1/EXG2-S1	1 μ M
Primer EXG1-C2/EXG2-C2	1 μ M
Buffer	1X
dNTPs (Amersham)	50 μ M (ciascuno)
Taq polimerasi (Amersham)	0,2 U/ μ l
DNA plasmidico	34 ng/ μ l

Il protocollo termico utilizzato è riportato in tabella:

<u>Programma di amplificazione</u>		
Ciclo 1 (1X)	94°C	2'
Ciclo 2 (30X)	94°C	15''
	52°C/53°C	30''
	72°C	2'
Ciclo 3 (1X)	72°C	2'
Ciclo 4 (1X)	4°C	∞

*: La temperatura di melting utilizzata con la coppia di primer EXG1-S1/ EXG1-C2 è 52°C, con i primer EXG2-S1/EXG2-C2 è di 53°C.

Per la verifica dei trasformati i componenti sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni in un volume finale di 25 μ l.

Componenti	Concentrazione finale
Primer EXG1-A1/ EXG1-A2	1 μ M
Primer EXG1-A2/ EXG1-A2 (o K2)	1 μ M
Buffer	1X
dNTPs (Amersham)	50 μ M (ciascuno)
Taq polimerasi (Amersham)	0,2 U/ μ l
Sospensione cellulare	3 μ l

Le condizioni di amplificazione finali sono state le seguenti:

Programma di amplificazione		
Ciclo 1 (1X)	94°C	5'30''
Ciclo 2 (30X)	94°C	15''
	53°C/55°C°/56°C *	30''
	72°C	2'/1' *
Ciclo 3 (1X)	72°C	2'
Ciclo 4 (1X)	4°C	∞

*: La temperatura di melting utilizzata con la coppia di primer EXG1-A1/EXG1-A2 è 53°C con un tempo di elongazione di 2 minuti, per la coppia EXG2-A1/EXG2-A2 è di 56°C con un tempo di elongazione di 2 minuti. Per la coppia di primer EXG1-A1/EXG1-K2 è di 53°C con un tempo di elongazione di 1 minuto, mentre per EXG2-A2/EXG2-K2 è di 55°C con lo stesso tempo.

5.2.8 ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI SU GEL DI AGAROSIO

La separazione di frammenti lineari di DNA è avvenuta come descritto nel paragrafo 2.2.8, utilizzando agarosio alla concentrazione dell'1% per separare gli amplificati.

Dopo la corsa i gel sono stati osservati al transilluminatore UV e fotografati con il sistema EDAS (Kodak).

5.2.9 TEST PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA

L'esperimento per la determinazione dell'attività β -glucosidasica è stato effettuato seguendo il protocollo descritto in precedenza nel paragrafo 4.2.7, con le seguenti modifiche alla preparazione delle colture. Il preinoculo dei lieviti in liquido è stato

effettuato utilizzando come mezzo YPD contenente 20 g/l di glucosio. Da una coltura su piastra è stata prelevata una certa quantità di materiale cellulare e inoculata in provette tipo Falcon da 50 ml contenenti 10 ml di terreno. Le provette sono state incubate in agitazione a 30°C per circa 10 ore. E' 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 prelevando dei volumi opportunamente calcolati di coltura in YPD, in modo tale da ottenere un inoculo di circa 10^6 CFU/ml in mosto. Le provette tipo Falcon sono state incubate in agitazione a 30°C per circa 24 ore.

Dopo 24 ore di crescita in MSN è stata misurata la densità ottica a 600 nm. Le colture con densità ottica compresa tra 1,7-1,9 sono state utilizzate per eseguire il test in microtiter, quelli con valori di OD inferiore sono stati lasciati in incubazione fino al raggiungimento del valore desiderato. E' stata preparata una curva di taratura a diverse concentrazioni di substrato fluorescente MU (par. 4.2.2.7) e dopo aver caricato i campioni nei pozzetti della piastra microtiter si è proceduto con la lettura allo spettrofluorimetro.

5.2.10 FERMENTAZIONI

Le fermentazioni sono state effettuate in 6 bioreattori identici (Multifors, Infors HT) da 1 l controllati da un'unica CPU. Essi sono dotati di sonde per temperatura, pH, pO_2 ed un misuratore di flusso in uscita (red-y mod. GSM-A95A-BN00) tarato per la CO_2 (range 1-20 ml/min).

In tutti gli esperimenti è stato usato mosto di Prosecco dell'annata 2008, filtrato con filtro a $0,45\mu m$, poi conservato a 4°C e portato a 25° C solo al momento dell'uso.

Gli inoculi sono stati preparati nel seguente modo: un'ansata di cellule da piastra è stata inoculata in falcon contenente 10 ml di mezzo YPD con 5g/l di glucosio. Raggiunta la fase stazionaria, 1 ml di questa precoltura è stata inoculata in 100 ml dello stesso mezzo e fatta crescere in beuta a 25°C con agitazione a 150 rpm/min. Dopo 18 ore si è effettuato l'inoculo dei 100 ml direttamente in mosto a 25°C in modo da avere circa $5 \cdot 10^6$ cell/ml.

Durante la fermentazione in bioreattore la temperatura è stata mantenuta a 25°C e l'agitazione a 100 rpm/min. Questi parametri ed il flusso di anidride carbonica sono stati controllati tramite il programma IRIS NT (Infors AG).

5.3 RISULTATI

5.3.1 SCELTA DEI LIEVITI

Sono stati considerati due ceppi di lievito da sottoporre a delezione dei geni *EXG1* ed *EXG2*, uno proveniente dal pool di 104 ceppi di lievito isolati da vinaccia e oggetto del presente lavoro, e uno isolato da grappoli di Raboso, un vitigno autoctono del Veneto. I ceppi sono stati scelti tra tutti effettuando una comparazione delle loro proprietà tecnologiche e di qualità, cercando di individuare quali avessero le caratteristiche migliori. In particolare entrambi i ceppi possiedono innanzitutto un buon livello di attività β -glucosidasi, criterio principale di scelta, e di vigore fermentativo, portano a termine la fermentazione in un tempo intermedio (14-15 giorni), non presentano odori sgradevoli (il ceppo da vinaccia ha dato un giudizio positivo) e hanno una discreta resistenza all'anidride solforosa.

Va sottolineato che il ceppo da vinaccia su cui è ricaduta la scelta finale non è il migliore in assoluto tra quelli analizzati. Esso ha rappresentato un punto di partenza per l'approccio a questo tipo di trasformazione molecolare in lieviti isolati da vinaccia, permettendo di valutare se il metodo adottato fosse efficace nei confronti di questi ceppi naturali, ben diversi dai ceppi di laboratorio impiegati in esperimenti di biologia molecolare, le cui caratteristiche genetiche sono solitamente note.

5.3.2 DELEZIONE GENICA MEDIANTE IL METODO “SHORT FLANKING HOMOLOGY”

Le trasformazioni integrative per l'eliminazione delle sequenze dei geni *EXG1* ed *EXG2* nel genoma dei ceppi di interesse, sono state condotte utilizzando la tecnica descritta inizialmente da Baudin *et al.* (1993), in seguito modificata (Wach *et al.* 1994; Güldener *et al.* 1996) per dare origine a molecole di DNA contenenti marcatori di selezione. Queste molecole di DNA sono caratterizzate dal fatto che il marcatore di selezione è fiancheggiato da piccole sequenze di DNA omologhe al locus che si vuole interrompere (38-42 pb) e da regioni denominate siti *loxP*. Le regioni *loxP* (34 nucleotidi) sono sequenze di riconoscimento per l'enzima Cre del fago P1, una ricombinasi che induce l'escissione del gene marcatore di selezione.

Il sistema consente la costruzione di cassette di delezione senza passaggi di clonazione e richiede solo l'individuazione della sequenza di DNA del gene di interesse.

In questo lavoro è stato utilizzato come marcatore di selezione il gene del trasposone batterico Tn903 (KanMX4) che codifica per una aminoglicosilfosfotransferasi la cui caratteristica principale nei lieviti è quella di conferire un fenotipo di resistenza all'antibiotico geneticina, impedendone la crescita mediante inibizione della sintesi proteica, a causa dell'interazione con i ribosomi 80S (Hadfield *et al.*, 1990).

5.3.3 COSTRUZIONE DELLE CASSETTE DI DELEZIONE

La cassetta di delezione è stata ottenuta utilizzando il plasmide pUG6 come DNA stampo in una reazione di PCR contenente i primer S1 e C2 (tab. 5.1). L'estremo 5' del primer S1 contiene tra 38 e 42 nucleotidi omologhi all'estremo 5' del gene da interrompere seguiti da 20 pb complementari alla zona del sito di clonazione multipla (MCS) adiacente alla regione del marcatore Kan^R. L'estremo 5' dell'oligonucleotide C2 comprende 38-42 nucleotidi omologhi all'estremo 3' del gene considerato, seguito da 20 pb complementari alla zona MCS contigua alla regione 3' del marcatore Kan^R. In questo modo, il frammento di PCR sintetizzato (cassetta di interruzione) contiene il gene marcatore fiancheggiato da sequenze omologhe agli estremi della sequenza che si desidera eliminare. Questi estremi omologhi dirigono l'integrazione in corrispondenza del locus di interesse, e per ricombinazione omologa determinano la sostituzione della sequenza genica silvestre con quella del gene marcatore. L'efficienza di integrazione nel corretto locus genomico è solitamente abbastanza elevata, pari al 70% (Güldener *et al.* 1996).

Sono state prodotte due cassette di delezione, una per la ORF del gene EXG1, YLR300W e l'altra per EXG2, YDR261C. L'introduzione del costrutto all'interno della cellula è avvenuto applicando il protocollo di Gietz (1995). Si tratta di un protocollo ad alta efficienza che può essere impiegato per trasformare non solo con frammenti di DNA, ma anche con plasmidi integrativi. Esso si basa sull'incubazione dei lieviti con acetato di litio, che ha la funzione di diminuire la permeabilità della parete cellulare, ed il successivo shock termico che consente il

passaggio del DNA di interesse associato al DNA carrier ad alto peso molecolare, che ne favorisce appunto il trasporto attraverso la membrana. Non sono state apportate sostanziali modifiche al protocollo, tranne nella fase immediatamente successiva alla trasformazione, nella quale le cellule sono state lasciate crescere per una notte a 30°C in YPD, prima di essere trasferite su piastre di YPD con geneticina per la selezione. Inizialmente questo passaggio in terreno liquido era stato effettuato aggiungendo l'antibiotico, seppur ad una concentrazione più bassa (1/10), con lo scopo di effettuare fin da subito una selezione dei trasformanti positivi e lasciando moltiplicare le cellule solo per tre ore. In questo modo però non si osservava la crescita di nessuna colonia di trasformati, probabilmente perché la presenza dell'antibiotico seleziona i lieviti che hanno introdotto Kan^R, ma in tre ore non consente loro di moltiplicarsi per poter poi essere rilevati su piastra.

La trasformazione nei ceppi NM12 e R.150.1 ha evidenziato una resa soddisfacente di trasformati (50 –80 colonie), pari a circa 15-20 trasformati/μg di cassetta.

5.3.4 VERIFICA DELL'ELIMINAZIONE DEL GENE

La verifica della delezione è stata condotta mediante PCR. Sono stati costruiti dei primer complementari a sequenze esterne al gene da interrompere, A1 (regione 5') e A2 o A3 (regione 3'), e un oligonucleotide che ibrida all'interno della sequenza del gene marcatore (K2). Nella reazione di PCR in cui viene amplificato il DNA di un trasformato, la coppia di primer A1-A2, genera un frammento corrispondente all'allele silvestre e un altro corrispondente all'allele che ha subito la ricombinazione, differenziabili in base alle diverse dimensioni dell'amplificato. Nel caso in cui il ceppo sia diploide si dovrebbero ottenere entrambi i frammenti. Tra tutte le colonie di trasformati cresciuti su terreno contenente la resistenza G418, ne sono state scelte a caso per la verifica una decina per ognuno dei due ceppi mutati e per ognuna delle due ORF analizzate.

Come evidenziato in fig. 5.1 le dimensioni del frammento corrispondente all'allele silvestre del gene *EXG1* sono di 1523 pb, mentre quelle dell'allele che ha subito ricombinazione integrando correttamente la cassetta, sono di 1821 pb. Il risultato

ottenuto conferma l'avvenuta trasformazione di un allele con inserimento del gene per il marcatore Kan^R.

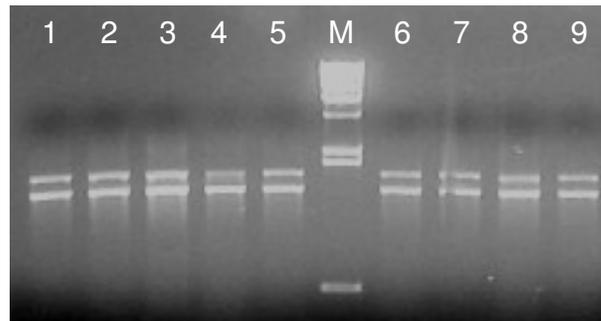


Fig 5.1 Amplificazione mediante i primer A1-A2 di colonie di trasformati per il gene *EXG1* dei ceppi NM12 (dall'1 al 5) e di R150.1 (dal 6 al 9).

M: Marker II (Roche).

Per quanto riguarda il gene *EXG2* il frammento corrispondente all'allele silvestre è di 1851 pb mentre quello dell'allele ricombinato è di 1767 pb. Anche in questo caso l'amplificazione ha confermato l'evento di ricombinazione.

Invece la coppia di primer A1-K2, o A2-K2 (nel caso del gene *EXG2*), origina un unico frammento di rispettivamente 453 pb e 429 pb. Come si può vedere in fig. 5.2 tutti i trasformati tranne il numero 8, mostrano il frammento corrispondente, che invece non amplifica nei ceppi wild type non trasformati, che non hanno integrato il marcatore.



Fig. 5.2 Verifica della ricombinazione del marcatore Kan^R. Da 1 a 6: trasformazione per la delezione del gene *EXG1*. 1: controllo wt, 2 e 3: trasformati del ceppo NM12, 4: controllo wt, 5 e 6: trasformati del ceppo R150.1. Da 7 a 12: trasformazione per la delezione del gene *EXG2*. 7: controllo wt, 8 e 9: trasformati del ceppo NM12, 10: controllo wt, 11 e 12: trasformati del ceppo R150.1.

Ma:marker 50pb (Sigma Aldrich) Mb: Marker II (Roche).

5.3.5 ELIMINAZIONE DEL MARCATORE DI DELEZIONE INTEGRATO NEL GENOMA

Il sistema messo a punto da Güldener *et al.* (1996) e ottimizzato da Delneri *et al.* (2000) consente l'eliminazione del marcatore dopo aver introdotto un plasmide YEp351-cre-cyh, che possiede la sequenza codificante per la ricombinasi Cre del batteriofago P1 di *E. coli*, sotto il controllo di un promotore indotto dalla presenza di galattosio nel terreno di crescita (fig. 5.3).

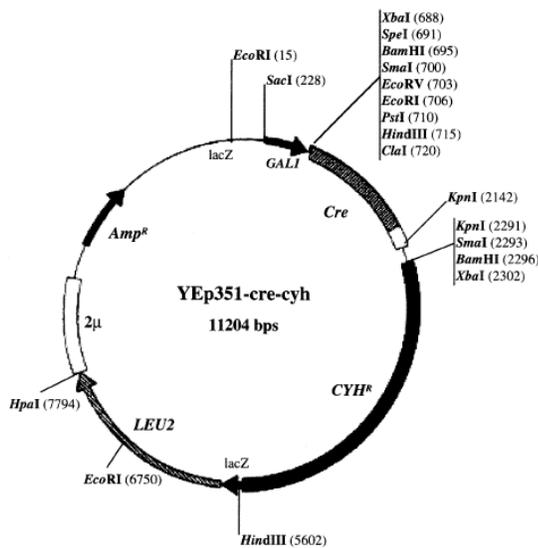


Fig. 5.3 Mappa del plasmide Yep351-cre-cyh contenente la ricombinasi cre sotto il controllo del promotore *GAL*I e il marcatore di selezione *CYH*^R.

La ricombinasi Cre riconosce le sequenze *loxP* che fiancheggiano il gene di interesse, si lega e induce la formazione di un loop di DNA in corrispondenza dei due siti, poi taglia e riunisce i frammenti promuovendo così l'eliminazione della cassetta di delezione mediante ricombinazione. In questo modo, la possibilità di eliminare il marcatore di selezione integrato nel genoma, consente di utilizzare varie volte il medesimo sistema di selezione fino all'ottenimento di mutanti nulli e sicuri, cioè di microrganismi senza nessun tipo di resistenza o gene eterologo, denominati anche "organismi generalmente riconosciuti come sicuri" (Generally Recognised As Safe, GRAS).

Pertanto i ceppi nei quali è stata inserita la cassetta di delezione sono stati successivamente trasformati con il plasmide YEp351-cre-cyh, ed è stata indotta

l'espressione della ricombinasi Cre in mezzo YP con aggiunta di galattosio al 2%, per 2h a 30°C con agitazione. Dopo incubazione sono state piastrate circa 150 cellule (calcolando le opportune diluizioni) in piastre di YPD. Dopo 48h di incubazione le colonie cresciute sono state replicate in mezzo selettivo contenente YPD con geneticina. Infine, sono state selezionate solamente le colonie in grado di crescere in YPD ma non nel terreno contenente l'antibiotico.

Per verificare l'eliminazione del marcatore sono state condotte, come nel precedente passaggio, due reazioni di PCR, una utilizzando la coppia di primer A1-A2, e l'altra utilizzando la coppia A1-K2 (o A2-K2 nel caso del gene *EXG2*). In questo caso l'amplificazione con i primer esterni al gene ha dato origine a due bande di dimensioni diverse, una più bassa che risulta dall'escissione del marcatore assieme ad uno dei due siti *loxP*, e l'altra più alta corrispondente al frammento dell'allele silvestre non ancora mutato (fig. 5.4).

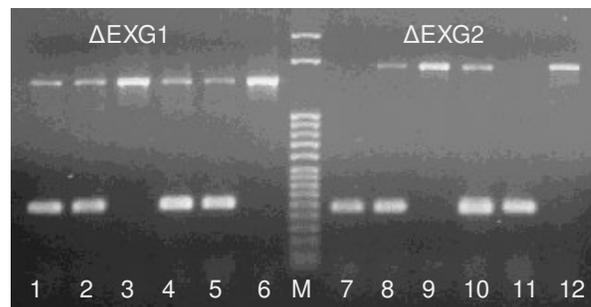


Fig. 5.4 Verifica dell'eliminazione del marcatore Kan^R. Da 1 a 6: trasformazione per la delezione del gene *EXG1*. 1 e 2: trasformati del ceppo NM12, 3: controllo wt, 4 e 5 : trasformati del ceppo R150.1, 6: controllo wt. Da 7 a 12: trasformazione per la delezione del gene *EXG2*. 7 e 8: trasformati del ceppo NM12, 9: controllo wt, 10 e 11: del ceppo R150.1, 12: controllo wt.

M: marker 50pb (Sigma Aldrich).

La presenza di questa banda è indice del fatto che i ceppi non sono aploidi, come è lecito attendersi in quanto si tratta di lieviti isolati dall'ambiente e non di ceppi di laboratorio di *S. cerevisiae* che nella maggiorparte dei casi hanno una sola copia del genoma.

5.3.6 TRASFOMAZIONI SUCCESSIVE PER LA DELEZIONE COMPLETA DEL GENE

L'eliminazione del marcatore per la resistenza consente di riutilizzare il sistema di delezione per costruire mutanti nulli. Il protocollo di trasformazione è stato quindi riapplicato ai mutanti parziali, utilizzando la stessa cassetta di delezione. La ricombinazione e la successiva eliminazione del marcatore sono stati verificati mediante PCR. In fig. 5.5 è mostrato il risultato della seconda trasformazione per il ceppo R150.1. I primi tre profili che rappresentano tre ceppi trasformati: si può notare come nel numero 3 sia presente solo la banda più bassa che conferma l'eliminazione del marcatore Kan^R, mentre non è amplificata la banda più alta corrispondente all'allele silvestre *EXG1*.

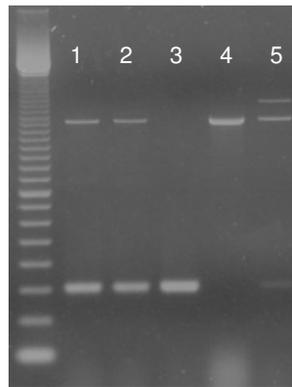


Fig. 5.5 Verifica della delezione del gene *EXG1* nel ceppo R150.1. Da 1 a 3 trasformati del ceppo R150.1, 4: controllo wt. 5: ceppo contenente il marcatore Kan^R utilizzato come controllo negativo. M: marker 100pb (Amersham).

Pertanto è possibile concludere che il ceppo R150.1 è stato deleto per entrambe le copie del gene *EXG1*, ottenendo un mutante “pulito” in quanto non contiene il DNA esogeno del marcatore, con l’eccezione della breve sequenza di 34 pb del sito *loxP*. Un risultato analogo è stato conseguito per la delezione del gene *EXG2*: un solo trasformato tra quelli cresciuti e successivamente analizzati mediante PCR ha evidenziato un profilo caratterizzato dall’assenza della banda corrispondente alla open reading frame di *EXG2*.

Considerando invece il ceppo isolato da vinaccia di Moscato NM12, dopo il secondo passaggio di trasformazione, in tutte le colonie di trasformati ottenuti e sottoposti a verifica ha amplificato nuovamente la banda corrispondente all’allele wild type, sia del gene *EXG1* sia di *EXG2*. Pertanto non è stato possibile

concludere che sia avvenuta la delezione completa di entrambe le copie dei geni di interesse. Ciò ha suggerito l'ipotesi che il ceppo isolato da vinaccia possa essere poliploide. Il lievito *S. cerevisiae* può esistere allo stato vegetativo nella condizione aploide, diploide o poliploide.

Vi sono notevoli differenze tra ceppi di laboratorio (che possono essere aploidi o poliploidi), ceppi clinici, isolati naturali e industriali (generalmente diploidi, aneuploidi o in alcuni casi poliploidi). Non è ancora chiaro quali vantaggi possa comportare la poliploidia per il lievito; secondo alcuni autori conferirebbe un maggior dosaggio di geni coinvolti nella fermentazione. Ezov K. *et al.* (2006) hanno analizzato una popolazione di lieviti naturali evidenziando diversi livelli di ploidia. I poliploidi eterozigoti potrebbero mostrare il vantaggio di un più alto livello adattativo.

Si è quindi proceduto con un ulteriore passaggio di trasformazione ma in questo caso è stato necessario disegnare una nuova coppia di primer (S1b e C2b) riportati in tabella 5.1, per la costruzione della cassetta di delezione. In presenza di più di due copie di un gene infatti è possibile che, impiegando gli stessi primer, si verifichi un'indesiderata ricombinazione della cassetta con il marcatore, proprio nel punto in cui il gene è appena stato deletato. La sequenza degli oligonucleotidi scelti è complementare a due tratti di DNA del gene più interni rispetto alla coppia utilizzata nelle prime due trasformazioni. Questo permette di evitare che la sequenza della cassetta contenente il marcatore riconosca i siti da cui sono state escisse le copie del gene.

Il risultato della terza trasformazione è stato verificato utilizzando gli stessi primer (A1, A2 e K2) perché risultano comunque esterni alla sequenza dei geni. Anche in questo caso, dopo eliminazione del marcatore si osserva ancora la presenza delle bande di 1523 pb e 1821 pb degli alleli silvestri dei due geni, rispettivamente *EXG1* ed *EXG2*. Si è proceduto quindi con una quarta trasformazione nelle stesse condizioni della precedente. Una decina di trasformati sono stati verificati per entrambi i geni: tutti mostrano la banda a 450 pb circa che deriva dall'amplificazione con il primer K2 (interno a Kan^R), e che conferma l'integrazione della cassetta. Inoltre l'amplificazione con i primer esterni alla ORF rivela solamente la presenza della banda di piccole dimensioni relativa alle

delezioni precedenti, ma non mostra quella più alta corrispondente all'allele silvestre e presente nel controllo wild type.

Dopo eliminazione del marcatore mediante l'induzione della ricombinasi Cre, l'amplificazione ottenuta ha confermato l'assenza della banda del wild type. Il risultato di quest'ultimo passaggio relativo ad una decina di trasformati $\Delta exg2$ è riportato in fig. 5.6, che mostra come il profilo di quasi tutti i ceppi analizzati sia caratterizzato da 4 bande, due vicine a circa 300 pb e due a 500 pb. Esse sono imputabili all'amplificazione dei tratti di sequenza che hanno subito la rimozione della cassetta contenente il marcatore nei 4 passaggi di trasformazione. La diversa lunghezza delle bande è dovuta al fatto che è stata utilizzata una prima coppia di primer (S1 e C2) per la delezione di due copie dell'allele, che da un amplificato di 305 pb, e successivamente una coppia diversa (S1b e C2b) che essendo costruita più internamente rispetto alla prima amplifica una regione più ampia di 521 pb.

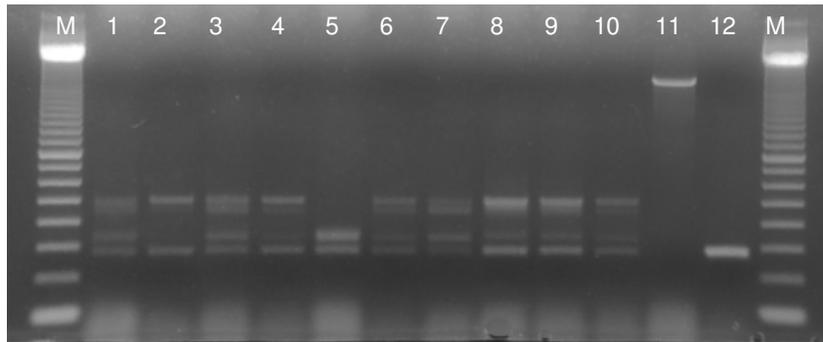


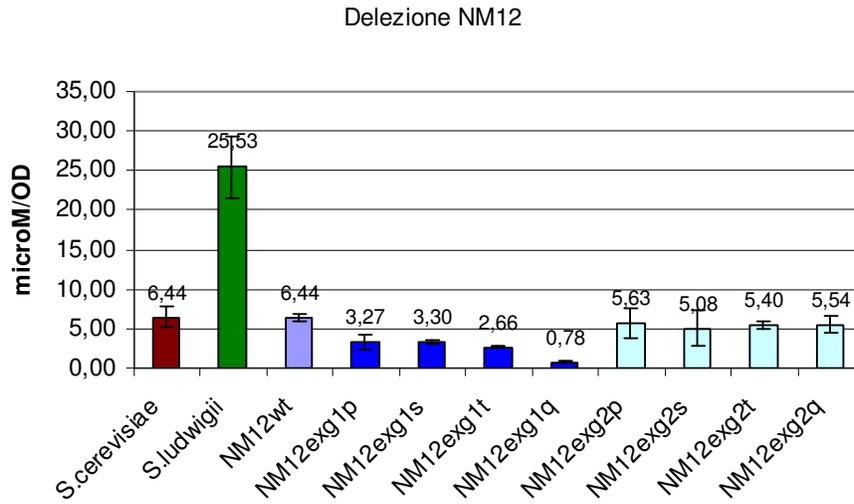
Fig 5.6 Verifica della delezione del gene *EXG2* nel ceppo R150.1. Da 1 a 10 trasformati del ceppo NM12, 11: controllo wt del ceppo NM12, 12: ceppo contenente il marcatore Kan^R. M: marker 100pb (Amersham).

La procedura utilizzata per la trasformazione, che ha riguardato la costruzione di una specifica cassetta di delezione sulla base della sequenza genomica dei ceppi di lievito analizzati, l'introduzione della stessa all'interno della cellula, la selezione dei trasformanti e la rimozione del marcatore, si è rivelata altamente efficiente, nonostante sia stata condotta su isolati naturali che a differenza dei ceppi di laboratorio possono dare risposte imprevedibili nei confronti di queste alterazioni indotte.

5.3.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' β -GLUCOSIDASICA

La determinazione dell'attività β -glucosidasica è stata effettuata utilizzando il test spettrofluorimetrico descritto nel capitolo 4, basato sull'emissione della fluorescenza da parte del substrato metilumbelliferone. Sono state effettuate tre misure indipendenti dell'attività sui ceppi mutati NM12 e R150.1, sia sui mutanti nulli, sia su quelli ottenuti dopo i vari passaggi di trasformazione. Inoltre sono stati inclusi anche due ceppi tipo, uno di *S. cerevisiae* DSM70449 (ceppo tipo) e uno di *S. ludwigii* CBS822 (ceppo tipo), specie avente secondo dati riportati in letteratura, un'elevata attività β -glucosidasica. I valori di attività ottenuti sono riportati in microM di MU prodotto/OD (600 nm), con le relative deviazioni standard (fig. 5.7).

A)



B)

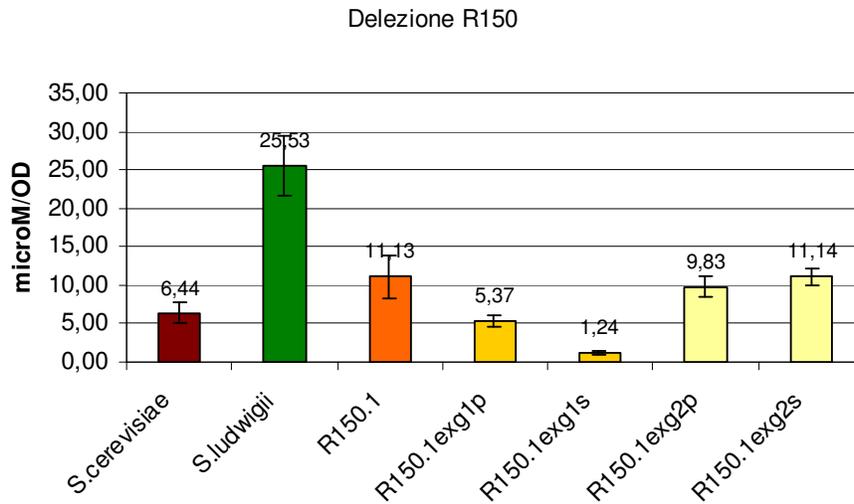


Fig 5.7 Attività β -glucosidasica media ceppi di lievito così suddivisi:

- A) Ceppi tipo di *S. cerevisiae*, *S. ludwigii* e NM12 isolato naturale da vinaccia di Moscato, relativi mutanti prima, seconda, terza e quarta copia del gene EXG1, mutanti prima, seconda, terza, quarta copia del gene EXG2.
- B) Ceppi tipo di *S. cerevisiae*, *S. ludwigii* e R150.1 isolato naturale da Raboso, relativi mutanti prima, seconda, terza e quarta copia del gene EXG1, mutanti prima, seconda, terza, quarta copia del gene EXG2.

Considerando l'isolato NM12 da vinaccia è possibile notare come l'attività del ceppo silvestre sia del tutto simile a quella del ceppo tipo di *S. cerevisiae*, dato già rivelato nello screening dell'attività effettuato in precedenza. Rispetto al ceppo tipo di *S. ludwigii*, come atteso, l'attività è decisamente più bassa. Si può notare come i mutanti *EXG1* per la prima e seconda copia presentino già un'attività più ridotta rispetto al wild type. Il valore decresce ancora nel mutante terza copia per poi raggiungere un valore decisamente basso nel mutante nullo. Per quanto riguarda invece i mutanti in cui è stata fatta la delezione del gene *EXG2* si può notare come vi sia una lieve diminuzione dell'attività rispetto al ceppo silvestre ma si mantiene allo stesso livello per tutti i mutanti dalla prima alla quarta copia deleta. Una situazione del tutto simile si verifica anche per il ceppo R150.1: in questo caso il valore del mutante nullo diminuisce drasticamente di ben 10 volte. Per quanto riguarda la mutazione di *EXG2* l'attività non si discosta di molto da quella del wild type.

Va sottolineato che la delezione della ORF *YLR300W* codificante per la proteina Exg1 non porta alla completa assenza di rilevazione dell'attività, in quanto come si è detto in precedenza sono diverse le glucanasi coinvolte nella scissione dei legami glicosidici in lievito con liberazione di glucosio e disaccaridi. Queste pertanto potrebbero compensare la ridotta ma non del tutto inesistente attività causata dal knock-out del gene *EXG1*. In base ai risultati ottenuti si può osservare che la proteina Exg1 sembra influenzare maggiormente l'attività β -glucosidica rispetto alla proteina Exg2.

La delezione di questi geni coinvolti in processi fondamentali per lo sviluppo della cellula non ha prodotto modificazioni nel fenotipo del lievito. Ciò ha permesso di paragonare l'attività enzimatica di interesse senza incorrere in problemi derivanti da rallentamenti nella crescita dei ceppi.

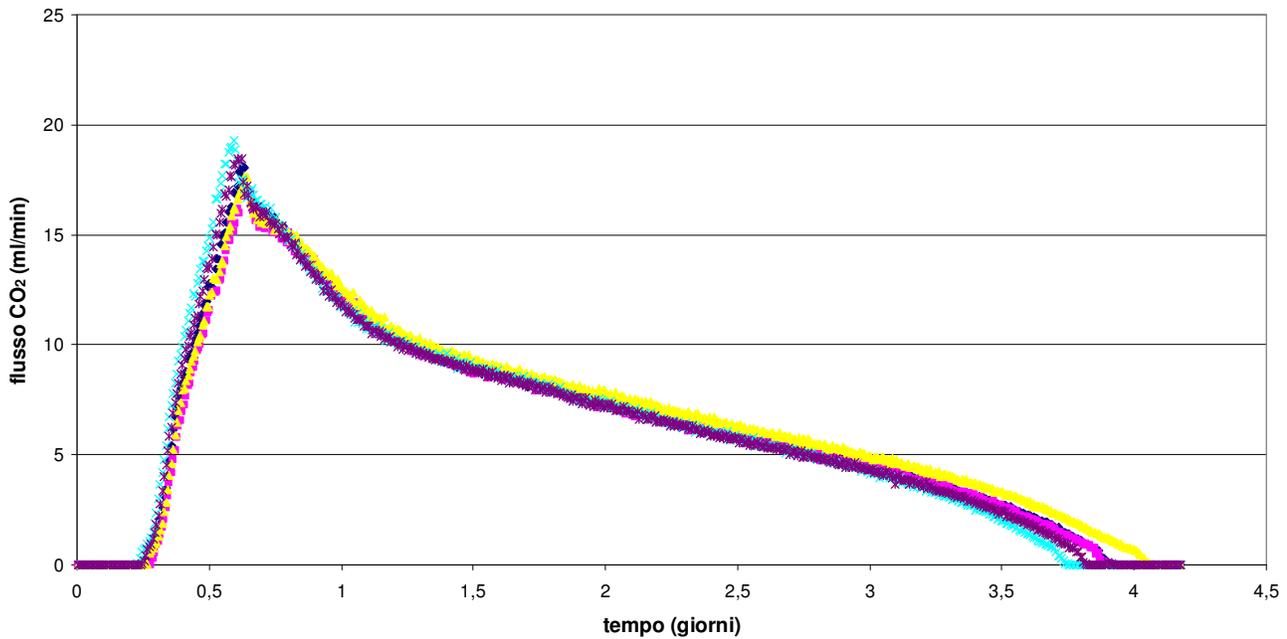
5.3.7 FERMENTAZIONE IN MOSTO NATURALE

Con lo scopo di verificare le performance di fermentazione dei lieviti mutanti, i ceppi sottoposti a delezione e successiva analisi dell'attività β -glucosidica sono stati inoltre saggiati per la crescita in mosto naturale di Prosecco. Le fermentazioni sono state condotte in bioreattori da 1 L, ad una temperatura costante di 25°C e con agitazione a 100 rpm/min. Rispetto ai sistemi tradizionali che monitorano

l'andamento del consumo della CO₂ totale sviluppata dalla degradazione degli zuccheri, questo sistema consente di visualizzare l'andamento del processo fermentativo in termini di velocità di fermentazione. In figura 5.8 e 5.9 sono riportate le curve di fermentazione relative ai ceppi NM12 ed R150.1 e dei rispettivi mutanti. Si può osservare come tutti i ceppi nella prima parte della fermentazione evidenzino un andamento simile: una fase iniziale di adattamento nella quale la cellula attiva la risposta ad elevate concentrazioni di glucosio nel mezzo, seguita da un rapido aumento della velocità, quando ha inizio la fase di consumo degli zuccheri. Successivamente si osserva un calo del flusso di CO₂ prodotta per unità di tempo. I due ceppi selvatici, pur non evidenziando comportamenti estremamente diversi, mostrano alcune differenze: la velocità massima di fermentazione, coincidente con il picco della curva, ha un valore lievemente più elevato per il ceppo NM12 mentre nella fase successiva la decelerazione della fermentazione avviene in modo meno marcato per il ceppo R150.2. Questo diverso comportamento tende a bilanciare la produzione totale di CO₂ e porta alla chiusura della fermentazione in tempi molto simili per entrambi i ceppi. Confrontando i ceppi wild type con i mutanti deleti per ciascun gene, si può notare che non vi sono differenze sostanziali nelle cinetiche e tutti portano a termine la fermentazione in tempi comparabili ai rispettivi ceppi selvatici. Risultati sicuramente interessanti sono attesi dalle analisi degli aromi che verranno condotte nel prossimo futuro sui rispettivi prodotti di fermentazione. Particolare attenzione verrà posta nell'evidenziare eventuali variazioni nella produzione di composti secondari e nella quantità di aromi varietali liberati dai ceppi mutanti rispetto ai corrispondenti lieviti selvatici.

A)

Cinetiche di fermentazione del ceppo NM12 e dei ceppi Δ exg1



B)

Cinetiche di fermentazione del ceppo NM12 e dei ceppi Δ exg2

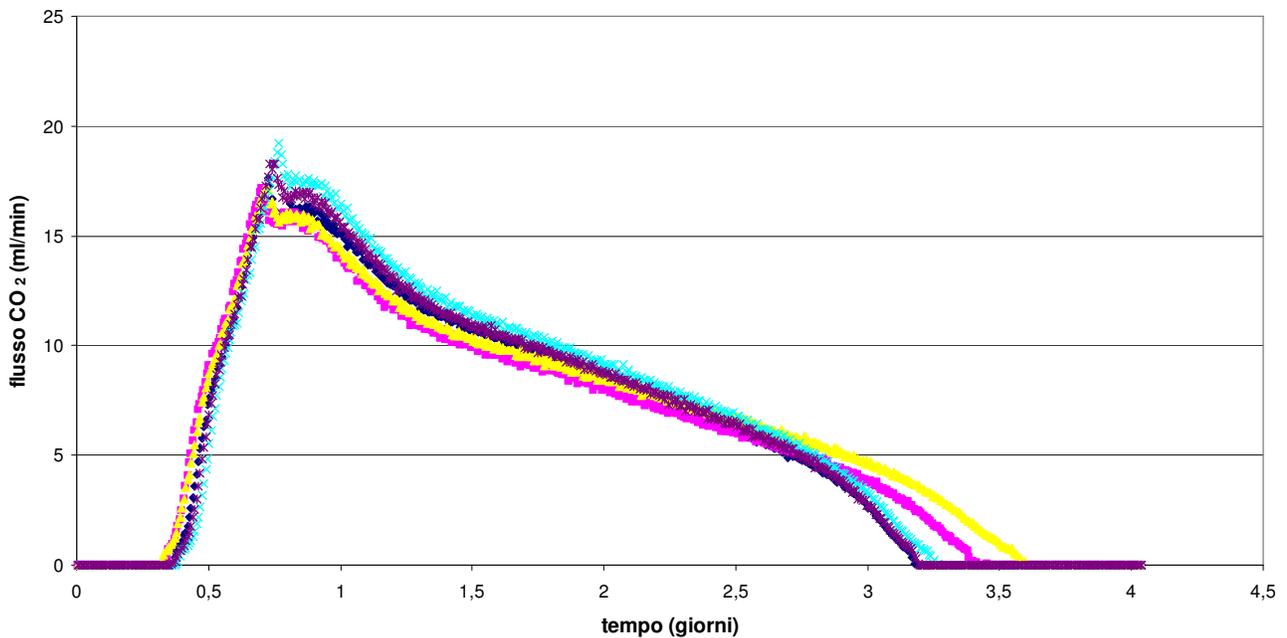


Fig. 5.8 Cinetiche di fermentazione A) del ceppo NM12 e dei mutanti per il gene EXG1, B) del ceppo NM12 e dei mutanti per il gene EXG2 (p=prima copia, s=seconda, t=terza, q=quarta).

Cinetiche di fermentazione del ceppo R150.1 e dei ceppi Δexg1 e Δexg2

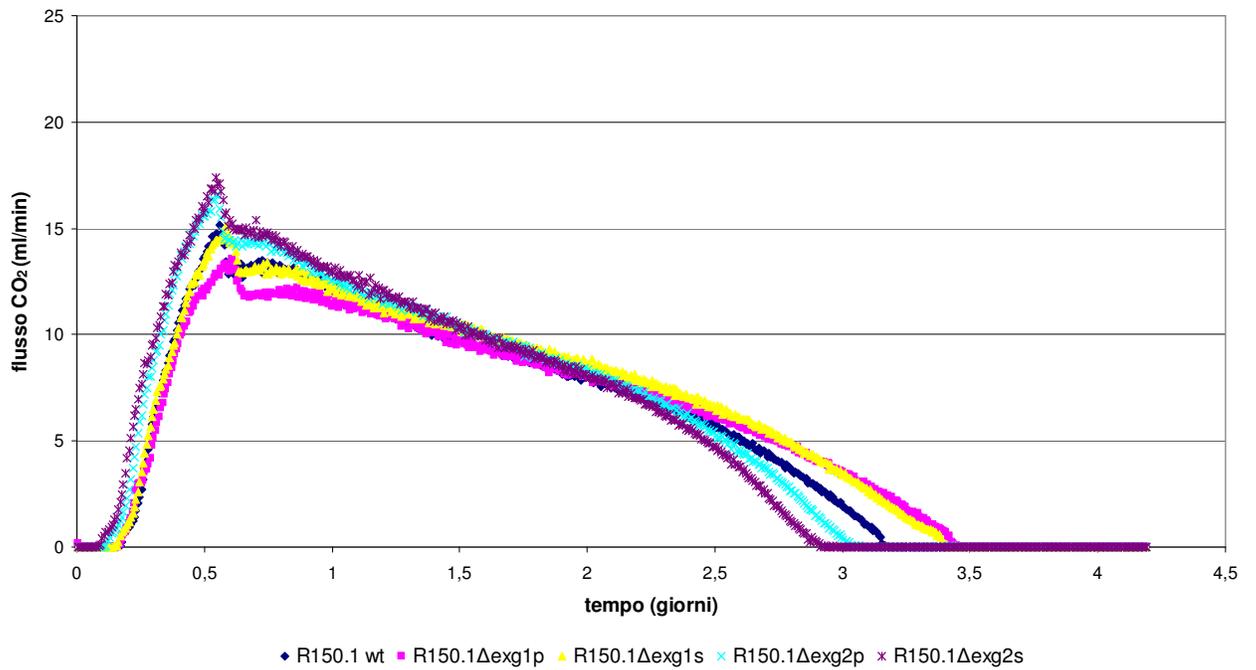


Fig. 5.9: Cinetiche di fermentazione del ceppo R150.1 e dei mutanti per il gene EXG1 ed EXG2 (p=prima copia, s=seconda).

6. Conclusioni

La Grappa è un'acquavite unica al mondo, e la sua peculiarità è rappresentata dal fatto di derivare da una materia prima prodotta e lavorata esclusivamente in Italia. Nata inizialmente come bevanda alcolica dei poveri, a partire dagli anni '60 il suo consumo ha subito un incremento legato all'affermarsi del fenomeno della grande distribuzione, che ha depenalizzato però l'aspetto qualitativo per far fronte agli elevati costi di produzione. Solo negli ultimi decenni, anche a fronte della concorrenza di altri superalcolici e quindi del calo dei consumi, i produttori hanno rivisto le loro politiche di vendita, perseguendo l'obiettivo della qualità finale del prodotto (De Rosa e Castagner, 1994).

Per questi motivi, senza tralasciare il ruolo che la tradizione secolare riveste nel processo produttivo, enologi e distillatori hanno adottato una serie di norme tecnologiche innovative in relazione sia alla scelta e alla gestione delle materie prime, sia alle procedure di distillazione e stabilizzazione.

Rispetto al settore enologico pertanto, il campo della distillazione pone problemi diversi di natura sia economica che tecnologica.

Il punto di partenza per qualsiasi tipo di considerazione riguardante l'ottenimento di un buon prodotto finito è costituito dalla vinaccia. Per molte aziende essa rappresenta però semplicemente un sottoprodotto della vinificazione, e solo una parte esigua viene conferita in distilleria per la produzione di grappa. La legislazione riguardante il suo smaltimento inoltre è piuttosto restrittiva, e destina la materia di scarto alla produzione di concimi o alcol.

La vinaccia racchiude in sé tutto il potenziale per l'ottenimento di un distillato dalle caratteristiche tipiche del vitigno da cui proviene, e dalla sua lavorazione dipendono eventuali pregi e difetti della bevanda. Ciò è dovuto essenzialmente alla sua composizione, data da bucce, vinaccioli, una parte di mosto e in taluni casi anche raspi. Nelle bucce si concentrano infatti i composti glicosidati inodori, che costituiscono i precursori da cui, attraverso azioni enzimatiche da parte della pianta ma soprattutto dei microrganismi presenti sul grappolo, si liberano le molecole odorose volatili responsabili degli aromi varietali.

Al fine di preservare queste caratteristiche di partenza è opportuno porre particolare attenzione alle operazioni di conservazione e fermentazione della vinaccia vergine, dal momento della pressatura in cantina fino alla distillazione.

Si è visto infatti come alcuni parametri chimico-fisici quali la presenza di ossigeno, la temperatura che si sviluppa all'interno della massa, le variazioni di pH durante il periodo critico dello stoccaggio in distilleria, influenzino e siano allo stesso tempo conseguenza dell'attività della microflora indigena presente inizialmente sull'uva e che evolve poi nel corso dell'insilamento. I microrganismi, ed i lieviti in particolare degradano gli zuccheri presenti trasformandoli in etanolo; accanto alla fermentazione alcolica però hanno luogo anche una serie di trasformazioni chimiche che portano alla produzione di composti indesiderati, che vengono poi concentrati nel processo di distillazione. La conoscenza delle dinamiche riguardanti l'evoluzione della popolazione indigena che si sviluppa in questo contesto, rappresenta la chiave per attuare una serie di procedure appropriate per una corretta conservazione della vinaccia.

I sistemi adottati dalle distillerie tecnologicamente più sviluppate, sono spesso gli stessi che normalmente vengono impiegati nelle fermentazioni dei mosti. In particolare, oltre ai sistemi di stoccaggio che consentono di limitare l'aerazione della vinaccia, pressando la massa in modo da eliminare le sacche d'aria, si fa spesso ricorso all'acidificazione con SO₂, in modo da abbassare il pH, sfavorendo così la proliferazione dei batteri. Una pratica molto diffusa riguarda l'utilizzo di colture starter di lieviti selezionati. Ciò è dovuto al fatto che il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, protagonista della fermentazione alcolica, è presente sul grappolo in numero così limitato da essere sopraffatto da altre specie più numerose o da non essere in grado di avviare fermentazioni rapide. Nel settore enologico sono abbondanti gli studi riguardanti le dinamiche delle popolazioni di lieviti autoctoni, dal vigneto al mosto. Lo scopo infatti è quello di selezionare dei ceppi capaci di portare a termine la fermentazione in tempi brevi, ma allo stesso tempo di dare origine ad un prodotto che conservi gli aromi derivanti da una fermentazione naturale.

L'utilizzo di questa pratica comincia a diffondersi anche nel campo della produzione di distillati, ma l'inoculo viene preparato impiegando lieviti secchi solitamente in commercio per le fermentazioni dei mosti. La conseguenza è

sicuramente un prodotto ricco in alcol, in quanto la dominanza assoluta del ceppo inoculato fa sì che gli zuccheri vengano degradati rapidamente e completamente, ma probabilmente potrebbero essere maggiormente esaltate le caratteristiche aromatiche di una matrice vegetale così ricca di composti organoletticamente interessanti con l'uso di lieviti selezionati ad hoc in grado di interagire più proficuamente con il substrato e la microflora naturale presente. Gli studi riguardanti gli aspetti microbiologici legati all'ambiente vinaccia sono pressoché assenti, probabilmente come conseguenza del fatto che il settore della distillazione, ed in particolare quello della grappa, prodotto tipicamente italiano, è più limitato rispetto a quello enologico.

Questo progetto di dottorato ha riguardato il monitoraggio delle dinamiche delle popolazioni di microrganismi, in particolare di lieviti, che si sviluppano nel corso dello stoccaggio della vinaccia. I risultati ottenuti hanno gettato le basi per un'indagine sulle caratteristiche tecnologiche e qualitative possedute dai ceppi caratterizzati, con lo scopo di individuare quali contribuiscono maggiormente alla qualità del prodotto finale.

Nella prima parte del lavoro è stata monitorata una vinaccia, proveniente da due tipologie di vitigno tipiche della Regione Veneto, che è stata insilata direttamente in cantina, evitando così problemi connessi al trasporto in condizioni non controllate. L'approccio impiegato per l'allestimento della sperimentazione su scala pilota, che ha previsto la suddivisione del materiale vegetale in sacchi di plastica compressi e sigillati, si è rivelato efficace ai fini di creare un ambiente il più possibile privo di ossigeno. Inoltre ha permesso di effettuare le procedure di prelievo aprendo un sacco per ogni tempo di campionamento, evitando ogni forma di contaminazione. Mediante metodi convenzionali di analisi è stato possibile determinare quantitativamente il numero di lieviti presenti nella vinaccia. Al momento dello stoccaggio, per entrambe le vinacce analizzate (di Moscato e di prosecco) esso si attesta attorno ad un valore di $5 \cdot 10^5$ ufc/g, dopo 4 giorni cresce rapidamente di ben due logaritmi di grandezza e si mantiene costante fino a 15 giorni di stoccaggio quando gli zuccheri sono completamente assimilati. L'identificazione di questi isolati a livello di specie e di ceppo, effettuata mediante metodi molecolari, ha evidenziato come la specie *Saccharomyces cerevisiae*, assente all'inizio, si affermi poi nel corso della fermentazione, dominando su altre

specie poco alcoligene appartenenti ai generi *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Torulaspota*, *Issatchenkia*. Questo dato è interessante in quanto individua delle analogie con quanto accade nella fermentazione dei mosti, dove si verifica un avvicendamento simile nella popolazione di lieviti.

Una volta definito il quadro generale delle dinamiche di popolazione in una vinaccia naturale, si è voluto verificare l'effetto di trattamenti tecnologici sulle stesse dinamiche. La vinaccia è stata quindi trasportata dalla cantina alla distilleria in condizioni di refrigerazione con lo scopo di limitare la proliferazione incontrollata di microrganismi, e successivamente acidificata con acido solforico. La conta microbica ha evidenziato come il controllo della temperatura abbia avuto effetto contenitivo sui lieviti fino al momento dello stoccaggio. La pratica di acidificazione viene normalmente utilizzata con lo scopo di rallentare la crescita batterica, anche se non tutti i tecnici concordano sulla necessità del suo impiego. Senza dubbio l'anidride solforosa svolge un'azione antiossidante, soprattutto nelle vinacce vergini, subito separate dal mosto. La caratterizzazione della microflora di lieviti isolata in questa sperimentazione, ha mostrato un andamento del tutto simile a quello del precedente lavoro, con la presenza di *Saccharomyces* che dominano al 100% sia a 4 che a 15 giorni di stoccaggio. E' interessante notare come l'analisi del DNA mitocondriale impiegata per l'identificazione a livello di ceppo, abbia svelato la presenza di un'elevata biodiversità, maggiore rispetto a quella riscontrata nelle vinacce di Prosecco insilate senza trattamenti. Questo può essere dovuto al fatto che la vinaccia è una materia prima essenzialmente solida, ma la massa di bucce e vinaccioli, fa sì che si creino delle porosità in cui i microrganismi si insediano e sviluppano abbastanza indipendentemente gli uni dagli altri. Un residuo di liquido nelle vinacce determina un ambiente ancora più eterogeneo, identificando ulteriori nicchie di sviluppo dei lieviti, che si trovano a svolgere la fermentazione in condizioni sicuramente diverse. In conclusione quindi le dinamiche di tipo microbiologico che caratterizzano la vinaccia non possono essere perfettamente sovrapponibili a quelle del mosto, dove la massa risulta omogenea. In particolare le tempistiche tipiche dell'ambiente mosto vengono rispettate solo in parte. Anche nel caso della vinaccia, durante le prime fasi della conservazione si assiste ad un avvicendamento tra le specie di lievito che determina l'affermazione di quelle con sempre maggiore grado di tolleranza

all'alcol. I tempi di permanenza però, soprattutto delle specie più alcoligene, sono estremamente dilatati. Il calo nella concentrazione di *Saccharomyces* che nel vino si verifica immediatamente, dopo l'esaurimento degli zuccheri, nella vinaccia è molto più lento, e questa popolazione microbica risulta dominante sicuramente per i primi 30 giorni di conservazione.

La seconda parte del lavoro ha previsto quindi uno *screening* delle caratteristiche fisiologiche di un centinaio di ceppi, scelti tra tutti quelli isolati e geneticamente caratterizzati nelle tre diverse sperimentazioni, da vinacce di diversa origine e che hanno subito o meno i trattamenti descritti in precedenza. Inizialmente, la scelta dei caratteri da analizzare nei ceppi è ricaduta su alcune proprietà che normalmente si valutano nella selezione di lieviti da impiegare nelle fermentazioni dei mosti. Come sottolineato si tratta di due realtà piuttosto diverse, pertanto i criteri di valutazione dovrebbero essere studiati *ad hoc*, considerando che le stesse procedure di produzione sono diverse per un distillato rispetto ad un vino, e pongono problematiche specifiche. Tuttavia la valutazione di alcune *performance* di fermentazione rappresenta un primo approccio per verificare il comportamento di lieviti isolati da un ambiente ancora poco indagato. Poiché la pratica di acidificazione trova largo impiego anche in distilleria è stata presa in considerazione la capacità di resistere a diverse concentrazioni di anidride solforosa. Accanto alle caratteristiche prettamente tecnologiche (oltre al vigore fermentativo sono state monitorate produzione di schiuma, di idrogeno solforato, la liberazione di odori), successivamente, è stata valutata anche un'attività enzimatica essenziale per la liberazione di aromi primari, racchiusi principalmente nelle bucce della vinaccia, che vengono liberati attraverso l'azione di enzimi β -glucosidasici. Questo carattere di qualità risulta cruciale nella scelta di un ceppo da utilizzare per la produzione di un distillato come la Grappa, in cui il prodotto ottenuto da vinacce monovitigno risulta molto apprezzato sul mercato. L'analisi multivariata applicata alla mole di dati così ottenuti, si è rivelata un mezzo efficace nel fornire un quadro complessivo di tutte le caratteristiche in relazione al gruppo di provenienza dei ceppi. Ha consentito così di individuare quali caratteristiche influiscono con maggior significatività nel determinare le differenze tra gruppi, e di localizzare rapidamente quali sono i ceppi dotati sia di buone proprietà tecnologiche sia di elevata attività β -glucosidasica. Per il giudizio ci si è

basati quindi su valutazioni legate principalmente al buon vigore fermentativo, infatti se da un lato è indiscutibile l'importanza della capacità di un lievito di contribuire alla produzione di composti odorosi, è altrettanto importante che esso dia luogo ad una rapida fermentazione per evitare lo sviluppo di altre specie microbiche dannose. Nel complesso, i ceppi derivanti da vinaccia di Moscato insilata direttamente in cantina, hanno dimostrato di possedere queste caratteristiche, rappresentando così una possibile riserva di ceppi su cui concentrare l'attenzione per eventuali ulteriori caratterizzazioni, volte a selezionare un possibile candidato da usare come lievito starter nell'ambiente vinaccia.

Nell'ultima parte del lavoro si è cercato di chiarire il ruolo, ancora non del tutto definito, che le esoglucanasi di lievito svolgono nella produzione di aromi varietali. L'ottenimento di mutanti nulli per geni codificanti le esoglucanasi Exg1 ed Exg2 ha permesso di valutare l'entità della diminuzione dell'attività β -glucosidasi che viene suggerita per questi enzimi, principalmente coinvolti nella degradazione del glucano di parete durante la crescita della cellula. Il gene Exg1 sembra essere quello maggiormente coinvolto nell'attività di produzione degli aromi varietali, mentre Exg2 sembra non contribuire allo stesso modo, in quanto non vi sono differenze tra i ceppi deleti e il wild type quando viene saggiata l'attività in laboratorio. Le cinetiche di fermentazione dei mutanti nulli hanno dimostrato che la delezione di queste due esoglucanasi non influisce in negativo sull'andamento della fermentazione. Il passaggio successivo, non ancora affrontato ma d'obbligo, è quello di valutare se vi sono differenze sostanziali nella produzione di composti secondari e negli aromi varietali liberati dai ceppi mutati in confronto ai rispettivi ceppi selvatico.

Va detto che il merito della produzione di composti odorosi non va solamente all'attività β -glucosidasi, ma ve ne sono altre specifiche che possono essere studiate per avere un quadro più completo della liberazione degli aromi.

Con questo lavoro è stato possibile aumentare le conoscenze relative alla biodiversità e alle dinamiche di popolazioni di lievito presenti nell'ambiente vinaccia. Lo studio di questa matrice vegetale è stata l'occasione per affrontare l'ecologia microbica di un ambiente con caratteristiche decisamente peculiari in quanto costituito principalmente da una componente solida. La buccia d'uva e i

vinaccioli, infatti, possono fungere anche da supporto per la crescita microbica e per la loro struttura solida sono in grado di frammentare la massa in tanti compartimenti, che possono risultare a loro volta delle interessanti nicchie ecologiche atte a favorire l'incremento della biodiversità. Da un punto di vista più applicativo il lavoro svolto si inserisce in un più ampio progetto volto a chiarire, dal punto di vista microbiologico, le problematiche connesse alla distillazione della vinaccia, giustificando la pratica da parte dei produttori, di adottare alcuni accorgimenti tecnologici per migliorare le fasi di lavorazione della materia prima. Un aspetto su cui si sta lavorando parallelamente riguarda le dinamiche delle popolazioni batteriche, che interagiscono con la componente dei lieviti durante le fasi di stoccaggio. Sebbene risultino, decisive nell'orientare la qualità del prodotto finito, le prime tre settimane di conservazione, in cui si svolge la fermentazione degli zuccheri, sicuramente di grande importanza risulta il periodo successivo di stoccaggio. In questo contesto un ambito di studio estremamente interessante riguarda l'evoluzione della microflora durante tempi prolungati di conservazione. La considerazione di questo aspetto, risulta di estremo interesse non solo per la sua rilevanza scientifica, ma anche per le implicazioni tecnologiche. Spesso infatti le distillerie, per motivi di gestione logistica, arrivano a distillare la materia prima dopo 3 o addirittura 6 mesi di insilamento. Durante questo periodo prolungato sicuramente si verificano ulteriori modificazioni della vinaccia, non riscontrabili nei primi giorni.

Infine, come ultima considerazione, i risultati di questo lavoro sperimentale mettono in evidenza un nuovo aspetto associabile a questa matrice vegetale, mai messo in luce prima d'ora: la vinaccia come fonte di enorme biodiversità microbica, in particolare in relazione al gruppo *Saccharomyces*, che la rende l'ambiente ideale (ancor più del mosto in fermentazione) per la selezione di ceppi tecnologicamente rilevanti da impiegare non esclusivamente nel settore enologico e delle bevande alcoliche.

7.Bibliografia

ADAMS D. (2004), Fungal cell wall chitinases and glucanases, *Microbiology*, 150:2029-2035.

ARANDA A., JIMENEZ-MARTI' E., HOROZCO H., MATAALLANA E., DEL OLMO M. (2006), Sulfur and adenine metabolism are linked, and both modulate sulphate resistance in wine yeast, *J. Agric. Food Chem.*, 54:5839-5846.

BALADRON V., UFANO S, DUENAS E., MARTIN-CUADRADO A.B., DEL REY F., DE ALDANA V. (2002). Engp1, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 1: 774-786.

BALEIRAS COUTO M.M., EIJSMA B, HOFSTRA H., HUIS IN'T VELD J.H.J., VAN DER VOSSSEN J.M.B. (1996), Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 41-46.

BARATA A., SEBORRO F., BELLOCH C., MALFEITO-FERREIRA M., LOUREIRO V. (2007), Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot, *J. Appl. Microbiol*, 104:1182-1192.

BARDI L. COCITO C., MARZONA M. (1999), *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids, *Int. J. Food Microbiol*, 47:133-140.

BARNETT J.A., PAYNE R.W., YARROW D. (1990), *Yeast Characteristics and identification*. 2nd edn Cambridge University press Cambridge, UK.

BAUDIN A., OZIER-KAROGEROPOLOS O., DENOUEL A., LACROUTE F., CULLIN C. (1993), A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acid Res.*, 21:3329-3330.

BEKATOURU A., PSARIANOS C., KOUTINAS A.A. (2006), Production of food grade yeasts, *Food Technol. Biotechnol.*, 44:407-415.

BERNARDINI M.(2005), Tesi di Laurea, Valutazione mediante metodi molecolari dell'andamento di popolazioni di lievito in vinacce destinate alla produzione di Grappa.

BOUIX M. (1990), Application de l'immunofluorescence à la différenciation fine des souches de levures, Proc of 2nd Lalvin Meeting, Lallemand SA, Toulouse.

BUDRONI M. (2001), Metodologie di monitoraggio per le colture starter, *Industrie delle bevande*. XXX febbraio: 25-30.

CAI J., ROBERTS I.N., 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.

CADEZ N., POOT G.A., RASPOR P., SMITH M.TH., (2003), *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1671-1680.

CADEZ N., RASPOR P., SMITH M.TH., (2006), Phylogenetic placement of *Hanseniaspora*– *Kloeckera* species using multigene sequence analysis with taxonomic implications: descriptions of *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* sp. nov. and *Hanseniaspora occidentalis* var. *citrica* var. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1157–1165.

CALO' A., SCIENZA A., COSTACURTA A. (2001), *Vitigni d'Italia*, Ed agricole.

CAPPELLARO C., MRSA V., TANNER W. (1998) New potential cell wall glucanases for *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating, *Journal of Bacteriology*, 180:5030-5037.

CARNACINI A., DEL POZZO A. (1986), Sui componenti volatili dei mosti e dei vini in relazione alle tecnologie di ottenimento, *Vignevini*, 12: 17-27.

CARRARO A. (2003), Tesi di Dottorato, Aspetti microbiologici della vinaccia destinata alla distillazione per la produzione di grappa.

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 Microbiol.* 51: 1607-1618.

CHINNICI F., NATALI N., ANTONELLI A., RIPONI C. (2001), Influenza del ceppo di lievito sulle caratteristiche aromatiche della grappa da vinacce di cv. Trebbiano, *Industrie delle Bevande* XXX ottobre, 475-479.

CHRISTOPOULOU M.G, KYRIAKIDIS N.V., ATHANASAPOULOS P.E. (2005) The evaluation of grape pomace distillates from selected red grape varieties, *Int. J. Food Science and Technol.*, 41: 845-860.

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.

CORICH V., CARRARO A., GIACOMINI A. (2007), Valutazione della popolazione microbica in vinacce di uve Prosecco destinate alla produzione di Grappa, *Vignevini*, 11:128-134.

- D'AGOSTINO S., PAPUCCI A. (2001) Caratteristiche compositive di grappe di monovitigni autoctoni siciliani a frutto bianco, *Industrie delle bevande*, XXX, 238-243.
- D'AMORE T., CRUMPLEN R., STEWART G.G. (1990), The involvement of trehalose in yeast stress tolerance, *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.*, 7:191-195.
- DA PORTO C. (2002), Volatile composition of "grappa low wines" using different methods and conditions of storage on an industrial scale, *Int. J. Food Science and Technol.*, 37:395-402.
- DA PORTO C., DECORTI D. (2006), Effect of cooling conditions on separation of volatile compounds in grappa using tray and packed columns without reflux, *Int. J. Food Science and Technol.*, 43, 638-643.
- DEAK T. (1995), Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods, *Trends in Food science & Technology*, 6: 287-292 .
- DE BARROS LOPES M., SODEN A., MARTENS A.L., HENSCHKE P.A., LANGRIDGE P. (1998), Differentiation and species identification of yeast using PCR, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 279-286.
- DE BARROS LOPES M., RAINIERI S., HENSCHKE P.A., LANGRIDGE P. (1999), AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 915-924.
- DE BARROS LOPES M, BELLON JR, SHIRLEY NJ AND GANTER PF (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* 1: 323-331.
- DELFINI C. (1995), *Scienza e Tecnica di Microbiologia Enologica*, Edizioni "Il lievito".
- DELNERI D., TOMLIN G.C., WIXON J.L., HUTTER A., SEFTON M., LOUIS E., OLIVER S. (2000) Exploring redundancy in yeast genome: an improved strategy for the use of cre-*loxP* system, *Gene*, 252:127-135.
- DE PINA C.G, HOGG T.A. (1999), Microbial and chemical changes during the spontaneous ensilage of grape pomace, *J. Appl. Microbiol.*, 88: 777-784.
- DE ROSA T., CASTAGNER R. (1994), *Tecnologia delle grappe e dei distillati d'uva*, Ed agricole.
- DU PLESSIS H.W., STEGER C.L.C., DU TOIT M., LAMBRECHTS M.G. (2002), The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality, *J. Appl. Microbiol.*, 92: 1005-1013.
- EEC Council Regulation no. 1576/89 of 29 May 1989. *Official Journal of European Communities*, 12 June 1989, no. L160, 1-17.

ESTEVE-ZARZOSO B., BELLOCH C., URUBURU F., 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.

EZOV T.K., BOGER-NADJAR E., FRENKEL Z., KATSPEROVSKI I., KEMENY S., NEVO E., KOROL A., KASHI Y. (2006), Molecular genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from "Evolution Canyon": microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status, *Genetics*, 174:1455-1468.

FERNÁNDEZ-ESPINAR M.T., ESTEVE-ZARZOSO B., QUEROL A., 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.

FIA G., GIOVANI G., ROSI I. (2005), Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorometric method to determine enzymatic activity, *Journal of Applied Microbiology* 99: 509-517.

FLAMINI R. (2005), Some advances in the knowledge of grape, wine and distillate chemistry as achieved by mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 40: 705-713.

FLEET G.H. (2003), Yeast interaction and wine flavour, *Int. J. Food Microbiol.*, 86: 11-22.

FOSCHINO R., GALLINA S., ANDRIGHETTO C., ROSSETTI L., GALLI A. (2004). Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation on yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research* 4, 609-618.

FOURY F., ROGANTI T., LECRENIER N., PURNELLE B. (1998), The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 440: 325-331.

GAROGLIO P.G. (1980), *Nuova enologia*, Edizione rinnovata del volume III dell'enciclopedia vitivinicola mondiale, Edizione AEB.

GELADE' R., DE VELDE S.V., VAN DIJCK P., THEVELEIN J.M (2003) Multi-level response of the yeast genome to glucose, *Genome Biology*, 4:233.

GIL J.V., MANZANARES P., GENOVÉS S., VALLÉS S., GONZALEZ-CANDELAS L. (2004), Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine, *International journal of food microbiology*, 103: 57-68.

GIETZ R.D., WOODS R.A. (2002), Transformation of yeast by the Liac/Ss Carrier Dna/Peg Method, *Methods in Enzymology* 350: 87-96.

GOMES L.H., DUARTE K.M.R., ARGUESO J.L., ECHEVERRIGARAY S., TAVARES F.C.A. (2000), Methods for yeast characterization from industrial products. *Food microbiol.*, 17: 217-223.

GONZÁLEZ TECHERA A., JUBANY S., CARRAU F.M., GAGGERO C. (2001), Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers, *Letters in applied microbiology*, 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.

GULDENER U., HECK S., FIEDLER T., BEINHAUER J., HEGEMANN J.H. (1996), A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Research* 24:2519-2524.

GUYMON J.F., INGRAHAM J.L. e CROWELL E.A. (1961), The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 163-168.

HADFIELD C., JORDAN B.E., MOUNT R.C., PRETORIUS G.H., BURAK E. (1990), G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, 18:303-313.

HERNÁNDEZ L.F., ESPINOSA J.C., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M., BRIONES A. (2003), β -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171-176.

HERNÁN-GÓMEZ S., ESPINOSA J.C., 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., GUILLAMÓN J.M. (2004) New PCR-based methods for yeast identification, *J. Appl. Microbiol.*, 97: 792-801.

HUEY B. And HALL J. (1989), Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13, *Journal of bacteriology*, 171:2528-2532.

ISHIGURO J., KOBAYASHI W. (1995) A practical method for fission yeast transformation by electroporation, *Jpn.J.Genet*, 70: 1-6.

ITO H., FUKUDA Y., MURATA K., KIMURA A. (1982) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *Journal of bacteriology*, 163-168.

JAMES S.A., COLLINS M.D., ROBERTS I.N. (1996), Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*, *Int. J. Syst. Bacteriol*, 46: 189-194.

JOHNSTON M., HILLIER L., RILES L. *et al.* (1997), The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII, *Nature*, 387: 87-90

JOSEPA S., GUILLAMON J.M., CANO J. (2000), PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/ *Saccharomyces pastorianus* using specific primers, *FEMS Microbiol. Lett.*, 193: 255-259.

KOCH K. (2008), Il mercato della grappa in Italia e in Germania, Tesi di dottorato.

KREGER-VAN RIJ N.J.W. (1984), *The yeast: a taxonomy study*, Elsevier.

KURTZMAN C.P. (1993), Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence, *Antonie van Leeuwenhoek*, 63: 165-174.

KURTZMAN C.P., ROBNETT C.J. (1998), Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:331-371.

KURTZMAN C.P., FELL J.W. (1998), *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.

KURTZMAN C.P. (2003), Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma*, and *Zygorulasporea*, *FEMS Yeast Research*, 4: 233-245.

LARRIBA G., ANDALUZ E., CUEVA R., BASCO R. (1995), Molecular biology of yeast exoglucanases, *FEMS Microbiol. Lett.*, 125:121-126.

LANTE A., D'INCECCO N., CRAPISI A., BASAGLIA M., CURIONI A., SPETTOLI P. (2002), Localizzazione dell'attività beta-glucosidasi in un ceppo enologico di *Saccharomyces cerevisiae* su gel di poliacrilamide, *Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare*, vol. IV: 1201.

LAS HERAS-VAZQUEZ F.J., MINGORANCE-CAZORLA L., CLEMENTE-JIMENEZ J.M., 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.

LAVALLEE F., SALVAS Y., LAMY S., THOMAS D.Y., 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.

LIECKFELDT E., MEYER W., BÖRNER T. (1993), Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting, *J. Basic Microbiol.* 33, 6: 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.

LÓPEZ V., FERNÁNDEZ-ESPINAR M.T., BARRIO E., RAMÓN D., QUEROL A. (2003), A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations, *Int. J. Food Microbiol.*, 81: 63-71.

MANZANARES P., ROJAS V., GENOVÉS S., VALLÉS S. (2000), A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeast, *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 95-103.

MASNEUF I., AIGLE M., 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.

MENDES FERREIRA A., CLÍMACO M.C., MENDES FAIA A. (2001), The Role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – a preliminary study, *Journal of Applied Microbiology*, 91: 67-71.

MEYER S.A., SMITH M.T., SIMIONE F.P. (1978), Systematics of *Hanseniaspora* Zikes and *Kloeckera* Janke, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 44(1):79-96.

MEWES H.W., ALBERMANN K., BÄHR 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.

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* from other yeast species in an enological environment, *FEMS Microbiol. Lett.*, 264: 168-173.

NAUMOV G.I., MASNEUF I., NAUMOVA E.S., AIGLE M., DUBOURDIEU D. (2000), Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.* 151: 683-691.

NAUMOV G.I., JAMES S.A., NAUMOVA E.S., LOUIS E.J., ROBERTS I.N. (2000), 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., NGUYEN H.V., NAUMOVA E.S., MICHEL A., AIGLE M., GAILLARDIN C. (2001), Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast, *Int. J. Food Microbiol.*, 65: 163-171.

- NEBREDA A.R., VAZQUEZ C.R., VILLA T.G., VILLANUEVA J.R., DEL REY F. (1987) Heterogenous glycosilation of the *EXG1* product accounts for the two extracellular exo- β -glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEB*,220:27-30.
- 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.
- NISIOTOU A., NYCHAS G.J.E. (2007), Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2765-2768.
- ODA Y., YABUKI M., TONOMURA K., 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.
- ODELLO L., GIOMO A., VERSINI G., ZIRONI R. (1997) Grappa analisi sensoriale & Tecnologia, Ed. Centro studi e formazione assaggiatori, Brescia.
- ODELLO L. (1999), Grappa, solo italiana per tradizione e per legge, Supplemento a L'Assaggio n.5, Editore: Centro studi e formazione Assaggiatori s.c.a. r.l.
- ODELLO L. (2007), Grappa, tra assaggi e alambicchi, Editore: Centro studi e formazione Assaggiatori s.c.a. r.l.
- OPPENORTH W. (1960), Modification of the hereditary character of yeast by ingestion of cell-free extracts, *Antonie Van Leeuwenhoek* , 26:129–147.
- PRAMATEFTAKI P.V., LANARIDIS P., 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.
- PRONK J. (2002), Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research, *Applied and environmental microbiology*, 68:2095-2100.
- QUEROL A., RAMÓN D. (1996), The application of molecular techniques in wine microbiology, *Trends in Food Science & Technology*, 7: 73-78.
- RANKINE B.C. (1967), Formation of higher alcohols by wine yeast, and relation to taste and thresholds, *J. Sci. Food Agric.*, 18, 585.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E. (1971), Trattato di enologia Volume 1 Maturazione dell'uva, fermentazione alcolica, vinificazione, Ed agricole.

RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B., LONVAUD A. (2000), Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinification, John Wiley & Sons Ltd.

RIDRUEJO J.C., MUNOZ M.D., ANDALUZ E. and LARRIBA G. (1989) Inhibition of yeast exoglucanases by glucosidase inhibitors, Biochim. Biophys. Acta 993, :179–185.

ROSINI G. (1982), Influenza della microflora saccaromicetica della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva, Vigne Vini, 9: 43-46.

ROUSSEAU S., DONÈCHE B. (2001), Effects of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry, Vitis, 40: 75-78.

RUBERTO G., RENDA A., AMICO V., TRINGALI C. (2008), Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L., Bioresource Technology, 99:260-268.

SAMBROOK J., RUSSELL D.W., (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, New York.

SCHWARTZ D.C., CANTOR C.R. (1984), Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, Cell, 37, 67-75.

SHULLER D., CASAL M. (2005), The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 292-304.

SLAUGHTER J.C., (2003), The biochemistry and physiology of yeast growth, Brewing microbiology, Third Edition, pp. 19-42 Ed. I Campbell, F.G. PRIEST.

SONNI F., NATALI N., RIPONI C., CHINNICI F. (2006) Impiego della CO₂ solida nel corso della raccolta meccanica di uva cv. Trebbiano, Industrie delle bevande, 25:245-250.

SPAGNA G., BARBAGALLO R.N., PALMERI R., RESTUCCIA C., GIUDICI P. (2002) Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines, Enzyme and Microbial Technology 31: 1030-1035.

SUZUKI M., NAKASE T. (2002). A phylogenetic study of ubiquinone-7 species of the genus *Candida* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. Journal of General and Applied Microbiology 48, 55–65.

UGLIANO M., BARTOWSKI E.J., MCCARTHY J., MOIO L., HENSCHKE P.A. (2006) Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains, Journal of agricultural and food chemistry 54(17):6322-31.

USSEGLIO-TOMASSET L., (1978), "Gli alcoli superiori: un problema per la grappa", Vini d'Italia, 116: 291-294.

VALENTE P., GOUVEIA F.C., DE LEMOS G.A., PIMENTEL D., VAN ELSAS J.D., MENDONÇA-HAGLER L.C., HAGLER A.N. (1996), PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures, FEMS Microbiol. Lett., 137: 253-256.

VEZINHET F., DULAU L., HALLET J.N. (1994), Comparaison de différentes méthodes d'identification moléculaire de levures d'intérêt œnologues. Rev Fr Oenol. 115: 7-11.

VOLSCHENK H., VILJOEN M., GROBLER J., PETZOLD B., BAUER F., SUBDEN R.E., YOUNG R.A., LONVAUD A., DENAYROLLES M., VAN VUUREN H.J. (1997), Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Biotech 15: 253-257.

WACH A., BRACHAT A., ALBERTI-SEGUI C., REBISCHUNG C., PHILPENN P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 10: 1793-1808.

WANG S.S., BAIL F.Y. (2008) *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 58: 510-514.

WHITE T. J., BRUNS T., LEE S, 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. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego: Academic Press.

WICKERHAM L.J. (1951), U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. No. 1029, 1-19.

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1990), DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research, 18 (22): 6531.

YANISH-PERRON C., VIEIRA L. & MESSING J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors, Gene, 33:103-119.

VILLENA AREVALO M., IRANZO UBEDA J.F., OTERO CORDERO R. R., PEREZ BRIONES A. I. (2005), Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts, Journal of Applied Microbiology, 558-564.

VICENZINI M., ROMANO P., FARRIS G.A.(2005), Microbiologia del vino. Edizioni Ambrosiana.

ZAMBONELLI C., TINI V., CASTELLARI L. (2000), Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia (a cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali) Edagricole.

ZAMBONELLI C. (2003), Microbiologia e Biotecnologia dei Vini, Edagricole.

ZILIO F., LOMBARDI A., GALEOTTO A., 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.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare i miei supervisori Prof. Giacomini Alessio e la Prof.ssa Corich Viviana per essermi stati di supporto durante lo svolgimento del lavoro di Dottorato.

Un grazie particolare ai ragazzi dei laboratori di Legnaro e di Conegliano per l'aiuto, la disponibilità e la condivisione di momenti vissuti assieme.

Ringrazio la Prof.ssa Emilia Matallana, dell'Istituto di Agrochimica e Tecnologia degli Alimenti di Valencia, per avermi ospitato presso il suo laboratorio a svolgere una parte del mio lavoro di Dottorato. Un grazie speciale anche ai suoi collaboratori, che mi hanno accolto tra di loro fin dal primo giorno.

Grazie ai miei genitori per essermi sempre stati vicino, con pazienza e discrezione.

Grazie a familiari, amici, colleghi, animatori, ragazzi, e a tutti quelli che ho incontrato finora nel mio cammino. Ognuno di loro è un pezzetto speciale della mia vita.