

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI  
ALIMENTI**

**Dottorato di Ricerca**

**SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI  
AGRO-ALIMENTARI**

**XIX CICLO**

**IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI LIEVITI RICORRENTI  
NELLA FERMENTAZIONE SPONTANEA DI ALCUNI VINI  
DELL'ITALIA MERIDIONALE**

**Relatore**

**Prof. Salvatore Coppola**

**Dottoranda**

**Dott. ssa Elena Di Maro**

**Coordinatore**

**Prof. Salvatore Spagna Musso**

## INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	Pag. 6
1.1	Fermentazioni vinarie	Pag. 6
1.2	Ecologia dei lieviti	Pag. 8
1.3	Fermentazioni spontanee di mosti d'uva	Pag. 13
1.4	Evoluzione dei lieviti nella fermentazione spontanea	Pag. 17
1.5	Biodiversità intraspecifica dei lieviti nella vinificazione spontanea	Pag. 21
1.6	I lieviti selezionati e il loro impiego enologico	Pag. 23
1.7	Lieviti "autoctoni" e valorizzazione dei vini tipici di qualità	Pag. 27
1.8	Fermentazioni in associazione o scalari	Pag. 31
1.9	La selezione dei lieviti vinari	Pag. 32
1.10	Miglioramento genetico e DNA ricombinante applicato ai lieviti vinari	Pag. 43
1.11	Composti prodotti durante la fermentazione	Pag. 45
1.12	Influenza dei lieviti sulla composizione chimica e sul flavour del vino	Pag. 50
1.13	Influenza di ceppi di <i>S. cerevisiae</i> sul flavour del vino	Pag. 52
1.14	Influenza dei lieviti apiculati sulle caratteristiche organolettiche del vino	Pag. 54
1.15	Limiti delle metodologie tradizionali e avvento delle tecniche innovative per	Pag. 57

	l'identificazione dei lieviti vinari	
1.16	La reazione a catena della polimerasi (PCR)	Pag. 59
1.17	Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)	Pag. 60
1.18	Analisi della sequenza dei domini D1/D2 del 26S rDNA	Pag. 62
1.19	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)	Pag. 63
<b>2.</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	Pag. 68
<b>3.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	Pag. 71
3.1	Protocolli di vinificazione	Pag. 71
3.2	Raccolta dei campioni	Pag. 76
3.3	Isolamento, purificazione ed esame morfologico dei lieviti	Pag. 77
3.4	Estrazione del DNA dai ceppi isolati	Pag. 82
3.5	Reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)	Pag. 83
3.6	Analisi RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	Pag. 87
3.7	Amplificazione del 26S rDNA	Pag. 89
3.8	Elettroforesi su gel di agarosio	Pag. 91
3.9	Purificazione e sequenziamento del DNA	Pag. 93
3.10	Applicazione della tecnica PCR-DGGE	Pag. 95
3.11	Estrazione del DNA dalle sospensioni “Bulk”	Pag. 95
3.12	Estrazione del DNA dai campioni di mosto “Tal quali”	Pag. 96
3.13	Amplificazioni PCR del DNA dei campioni	Pag. 99

	tal quali e delle sospensioni bulk per l'analisi DGGE	
3.14	DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	Pag. 103
3.15	Protocollo DGGE	Pag. 105
3.16	Analisi DGGE	Pag. 109
3.17	Caratterizzazione tecnologica dei ceppi	Pag. 109
3.18	Determinazione dei parametri chimico-fisici del vino	Pag. 112
3.19	Determinazione dell'anidride solforosa	Pag. 112
3.20	Determinazione dell'acidità totale	Pag. 114
3.21	Determinazione dell'acidità volatile	Pag. 115
3.22	Determinazione del grado alcolico	Pag. 116
3.23	Determinazione del pH	Pag. 118
3.24	Determinazione dei Polifenoli totali e dell'indice F-C	Pag. 119
3.25	Determinazione degli zuccheri riduttori	Pag. 120
<b>4.</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	Pag. 124
4.1	Monitoraggio dei lieviti ricorrenti nella vinificazione spontanea del Primitivo di Manduria	Pag. 124
4.1.1	Il Primitivo di Manduria	Pag. 124
4.1.2	Il riconoscimento DOC	Pag. 127
4.1.3	Conteggio microbico	Pag. 130
4.1.4	Identificazione delle colonie di lieviti mediante sequenziamento dei domini D1/D2 del 26S rDNA	Pag. 135

4.2	Monitoraggio dei lieviti ricorrenti nella vinificazione spontanea dell’uva Catalanesca	Pag. 165
4.2.1	Catalanesca	Pag. 165
4.2.2	Conteggio delle popolazioni di lievito	Pag. 171
4.2.3	Identificazione delle colonie di lieviti mediante sequenziamento dei domini D1/D2 del 26S rDNA	Pag. 176
4.2.4	Analisi PCR-DGGE	Pag. 204
4.2.5	Potere e vigore fermentativo	Pag. 212
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	Pag. 216
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 223

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Fermentazioni vinarie

Il semplice processo biochimico di conversione del mosto d'uva in vino, descritto da Louis Pasteur, secondo il quale i lieviti fermentano spontaneamente gli zuccheri dell'uva a etanolo, CO<sub>2</sub> ed altri metaboliti, è attualmente conosciuto come molto più complesso e sofisticato. Fleet (1993) sostiene che “la fermentazione del mosto d'uva e la produzione di vini di qualità costituiscono un complesso interdipendente e unitario di processi biochimici ed ecologici giustificati dalla complessa costituzione chimica dei mosti e dall'intervento simultaneo di microrganismi fisiologicamente, biochimicamente e zimotecnicamente differenti. Tali microrganismi sono rappresentati dai lieviti, dai funghi a micelio, dai batteri lattici, dai batteri acetici e perfino dai batteriofagi”. Di tutti questi microrganismi, i lieviti sono al centro dell'interazione biochimica con il mosto, sono i principali responsabili della fermentazione; pertanto, il decorso fermentativo e il risultato del processo sono dipendenti dalla composizione del mosto, dall'equipaggiamento enzimatico dei lieviti e dalle condizioni nelle quali i lieviti operano. E' necessario tuttavia precisare che la fermentazione alcolica, sicuramente, rappresenta l'evento fondamentale del processo di trasformazione del mosto in vino, ma non si deve

dimenticare che essa è accompagnata da molte altre reazioni biochimiche, che nel loro insieme vanno a costituire la cosiddetta fermentazione vinaria e il cui contributo alla definizione delle caratteristiche organolettiche del vino non è certamente trascurabile. (Garoglio, 1981).

Come riportato da Zambonelli (1998), il mosto d'uva, considerato come mezzo nutritivo, ha una composizione tale da soddisfare le esigenze di diversi microrganismi. Esso infatti contiene:

- ❖ zuccheri monosaccaridi facilmente fermentescibili quali il glucosio e il fruttosio in quantità piuttosto elevata;
- ❖ fosfati, solfati, composti del potassio, del magnesio, del calcio e di numerosi altri elementi;
- ❖ fattori di accrescimento, cioè vitamine idrosolubili, quali la biotina, acido pantotenico, piridossina, tiamina, ecc.

Il fattore limitante che impedisce alla maggior parte dei microrganismi di moltiplicarsi in mosto è rappresentato dal pH, i cui valori sono in genere compresi tra 3 e 3,5 tali da svolgere un'azione selettiva a vantaggio di pochi gruppi microbici capaci di tollerarlo. Tali microrganismi sono rappresentati:

- dai lieviti che hanno ottimo di pH a valori compresi fra 4 e 4,5 ma che a pH 3 ancora si sviluppano senza difficoltà; è da rilevare che la composizione dei mosti è ideale per i lieviti;
- dai batteri acetici che, pur avendo ottimo a valori superiori, possono tuttavia ben tollerare pH a livello di 3;

- da alcuni batteri lattici quali *Oenococcus oeni* in prima linea, ma anche alcune specie del genere *Lactobacillus*.
- dalle muffe che poco sono influenzate da valori di pH compresi in un arco molto ampio (Henschke , 1997).

E' chiaro tuttavia che, dopo l'ammostatura e il caricamento in vasche o tini, i lieviti, che possono essere sia aerobi che anaerobi facoltativi, consumano l'O<sub>2</sub> disciolto nel mezzo e in breve tempo si vengono a creare condizioni di anaerobiosi tali da impedire ogni attività dei microrganismi dotati soltanto di metabolismo ossidativo quali i batteri acetici e le muffe. Sono quindi i lieviti a trovare le condizioni più adatte alle loro esigenze e a prendere nettamente il sopravvento.

Di fatto, dopo un certo tempo dal riempimento delle vasche, di solito dopo meno di un giorno, comincia la fermentazione alcolica che trasforma il prodotto in vino. Questo accade normalmente senza bisogno di alcun intervento esterno e, dunque, risulta evidente che i lieviti, agenti della fermentazione alcolica, già sono presenti sui grappoli dell'uva come rappresentanti di quella che viene chiamata “ microflora epifitica ”.

## **1.2 Ecologia dei lieviti**

Sull'origine e sui tipi di lieviti che provocano la fermentazione spontanea dei mosti d'uva e, più in generale, sugli habitat dei lieviti, sono state eseguite numerose ricerche, le prime delle quali risalgono all'800. E' ormai

noto da tempo che, nella fermentazione spontanea, la conversione dello zucchero dell'uva ad etanolo, CO<sub>2</sub> ed altri metaboliti è affidata ai lieviti selvaggi, cioè a quelli presenti sull'uva e a quelli provenienti dall'ambiente tecnologico (impiantistica e cantina, a cominciare dalla pigiadiraspatrice fino ai vasi vinari). Le diverse specie di lieviti che si sviluppano durante la fermentazione, il loro numero e le dimensioni di crescita che queste specie raggiungono dipendono dall'area di produzione (Amerine e Kunkee, 1968), dalla tecnologia di produzione (Cuinier, 1978) e dal tipo di vino prodotto (Poulard, 1984).

Relativamente al vigneto e agli habitat di cantina, alcuni lieviti sono considerati membri "autoctoni" (tipicamente ricorrenti nello specifico ecosistema), altri "alloctoni" (di passaggio o fortuiti) delle comunità trovate in questi ambienti. Il successo della loro coesistenza dipende dalla somma di una serie di fattori: fisici, chimici e biotici che riguardano sia il vigneto che la cantina (Lachance e Stramer, 1998). I lieviti cosiddetti "generalisti" sono dotati di un'ampia nicchia ed occupano molti habitat, mentre i lieviti cosiddetti "specialisti" ricorrono in habitat specifici e singoli (Walker, 1998).

La microflora delle uve varia con la varietà dell'uva, con la temperatura, la piovosità e altri fattori climatici; con il suolo, la fertilizzazione, l'irrigazione e le pratiche viticole; con la fase di sviluppo in cui le uve sono

esaminate; con i danni fisici causati dalle muffe, dagli insetti e dagli uccelli e con i fungicidi utilizzati nel vigneto (Pretorius *et al.*, 1999). E' inoltre importante notare che anche le attrezzature di raccolta, che comprendono raccoglitori meccanici, cesti di raccolta ed altri contenitori di distribuzione non frequentemente puliti possono rappresentare siti per l'accumulo dei lieviti e per attività microbiche prima che le uve raggiungano la cantina (Fugelsang, 1997). Tutto ciò diviene molto più significativo con l'aumentare del tempo di trasporto dal vigneto alla cantina.

*Kloeckera* (es. *Kloeckera apiculata*) ed *Hanseniaspora* (es. *Hanseniaspora uvarum*) sono le specie predominanti sulla superficie dei grappoli d'uva, rappresentando il 50-75% circa della popolazione blastomicetica totale (Fleet, 1993). Numericamente meno prevalenti di questi lieviti apiculati sono specie di *Candida* (es. *C. stellata* e *C. pulcherrima*), *Brettanomyces* (es. *B. intermedius*, *B. lambicus* e *B. custeri*), *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* (es. la forma sessuata di *C. pulcherrima*), *Pichia* (es. il cosiddetto lievito filmogeno, *P. membranaefaciens*) così come quelle specie che un tempo erano considerate appartenere al genere *Hansenula* (es. *H. anomala*) e il lievito rosa *Rhodotorula* (es. *R. minuta*) (Fleet, 1998).

Contrariamente a credenze popolari, le specie fermentative di *Saccharomyces* (es. *S. cerevisiae*) ricorrono in numero estremamente basso

sugli acini sani, non danneggiati e sono raramente isolati dagli acini intatti e dal suolo del vigneto (Martini, 1993). Infatti l'origine di *S. cerevisiae* è abbastanza controversa: una scuola di pensiero sostiene che la fonte primaria di questo lievito industrialmente importante sia il vigneto e la presenza o l'assenza di *S. cerevisiae* differisca con ogni pianta e con il tipo d'uva (Török *et al.*, 1996); l'altra scuola crede ad una diretta associazione con ambienti artificiali, fatti dall'uomo, come le cantine, gli impianti di fermentazione e che un'origine naturale di *S. cerevisiae* sarebbe da escludere (Vaughan-Martini e Martini, 1995). Contrariamente alla sua bassa ricorrenza negli habitat naturali come il vigneto, *S. cerevisiae* è abbondante nel succo d'uva e nel mosto che ricopre le superfici delle attrezzature di cantina, formando un'importante componente della cosiddetta flora blastomicetica "residenziale" o "di cantina" (Fleet e Heard, 1993). Usseglio-Tomasset e Ciolfi (1981) e Martini (1984) arrivarono alla conclusione che le poche cellule portate dall'uva avessero scarsa importanza agli effetti pratici e che una rilevanza ben superiore avessero invece i lieviti presenti in cantina. Secondo Rosini (1982), questi lieviti, contaminando le vasche di fermentazione e, in generale, tutto l'ambiente di cantina, si tramandano da un anno all'altro e sono i veri agenti della fermentazione spontanea dei mosti.

Come logico corollario di questa impostazione si potrebbe concludere che ogni cantina è caratterizzata dalla presenza di particolari ceppi di *S. cerevisiae* i quali contribuiscono al conferimento della qualità del prodotto e concorrono alla sua tipicizzazione. Un'ampia serie di ricerche eseguite da Soli *et al.* (1976), Tini *et al.* (1979), Romano *et al.* (1979; 1980), da Suzzi e Romano (1980) sugli agenti della fermentazione spontanea dei mosti solfitati dell'Emilia Romagna, ha messo in evidenza che nelle cantine dello stesso territorio e nelle vasche delle varie cantine è riscontrabile la presenza di un grandissimo numero di ceppi differenti di *S. cerevisiae*; nelle stesse singole vasche sono presenti molti ceppi, riferibili alle diverse razze fisiologiche di *S. cerevisiae*, con differenti caratteristiche colturali, di resistenza all'anidride solforosa ecc., i quali si succedono e si alternano durante il processo fermentativo. In definitiva si può concludere che certamente *S. cerevisiae* è un lievito con diffusione ambientale poco rilevante; sulle uve è largamente superato da altre specie, ma è presente, sia pure con poche cellule provenienti dal terreno. In cantina, a causa di condizioni che lo favoriscono, nel corso della fermentazione dei mosti prende il sopravvento su ogni altro lievito, fino a rimanere pressoché solo nei vini, guadagnandosi in tal modo il titolo di "lievito del vino". Al termine delle lavorazioni, molte cellule rimangono sugli attrezzi e nei vasi vinari fino all'annata successiva: ciò non accade se vengono eseguite, come di norma si fa, accurate pulizie, lavaggi e disinfezioni. Tutto questo

certamente favorisce l'ipotesi secondo la quale i *S. cerevisiae* rinvenibili nelle fermentazioni spontanee provengono dall'uva piuttosto che dagli ambienti di cantina. Recentemente, Le Jeune *et al.*, (2006) hanno dimostrato che i *S. cerevisiae* coinvolti nelle fermentazioni spontanee originano sia dal vigneto che dagli ambienti di cantina.

### **1.3 Fermentazioni spontanee di mosti d'uva**

Un tempo il vino derivava esclusivamente dalla fermentazione spontanea della microflora naturale. Diverse specie di lieviti trovate sulla superficie dei grappoli d'uva e microrganismi indigeni associati con le superfici di cantina partecipavano a questa naturale fermentazione del vino. E' certo che gli apiculati, asporigeni e sporgen, non mancavano mai e l'inizio della fermentazione alcolica era assicurato; ciò che poteva avere un andamento poco regolare era invece la seconda fase della fermentazione, quella provocata dagli ellittici o, più precisamente, da tutti quei lieviti che oggi sono compresi nella grande specie *Saccharomyces cerevisiae*. Al termine della fermentazione tumultuosa provocata dagli apiculati e col sopraggiungere dell'inverno, si potevano dunque avere diverse situazioni (Zambonelli 1998):

- per la presenza di ceppi enologicamente validi, la fermentazione si completava con l'esaurimento degli zuccheri;

- a causa della bassa temperatura e nonostante la presenza di ottimi ceppi o, più semplicemente, per la mancanza di ceppi dotati di elevato potere fermentativo, la fermentazione non giungeva a termine lasciando un residuo di zuccheri più o meno abbondante;
- in un qualunque momento, si sviluppavano intensamente anche altri lieviti, quali gli *Schizosaccharomyces* e i *Brettanomyces* con risultati sconcertanti, determinati da sapori ed odori anomali.

Il caso più frequente era il secondo e cioè la produzione di un vino contenente ancora zuccheri fermentescibili con una situazione microbiologica capace di dare origine alle più diverse soluzioni.

Ci si rende pertanto conto che affidando la fermentazione del mosto alla microflora naturale non sempre si raggiungono risultati tecnologicamente soddisfacenti. Indipendentemente dalla presenza di muffe o di parassiti (quale si può avere in certe annate), lo stesso abito microbiologico del mosto può non corrispondere alle esigenze di una buona fermentazione. Pertanto l'opportunità di non abbandonare i mosti al loro destino, lasciando liberamente sviluppare i lieviti selvaggi non buoni, ma di guidare la fermentazione, cercando di favorire in generale gli ellittici della specie *Saccharomyces cerevisiae*, è riconosciuta da molto tempo.

La vinificazione spontanea, malgrado l'evidente imprevedibilità del suo esito finale e il rischio dell'insorgenza di problemi di natura

microbiologica, è oggi ancora assai diffusa, specialmente in Italia e in particolare nella produzione di alcuni vini di pregio. I sostenitori della vinificazione spontanea attribuiscono ai prodotti ottenuti per tale via una forte distinzione stilistica, frutto di una maggiore complessità di aroma, gusto e struttura, rispetto ai prodotti ottenuti mediante inoculo di ceppi selezionati, che, viceversa, sarebbero responsabili di un “effetto appiattimento” delle differenze (Pretorius, 2000). La maggiore complessità dei vini ottenuti attraverso la vinificazione spontanea sarebbe direttamente correlata con la natura stessa del processo, avviato e portato a termine grazie all’azione combinata e/o in successione dei lieviti indigeni, tra loro diversi a livello di specie e, all’interno della stessa specie, a livello di ceppo, ciascuno, comunque dotato di una propria impronta qualitativa trasferibile al prodotto finale in proporzione al peso dell’azione svolta nel processo fermentativo (Lambrechts e Pretorius, 2000).

Numerosi studi sono stati effettuati comparando le fermentazioni spontanee e le fermentazioni guidate, e hanno messo in evidenza che vi sono differenze significative circa la composizione chimica del vino risultante (Mora *et al.* 1990; Longo *et al.* 1992; Gafner *et al.* 1993; Lema *et al.* 1996).

Diversi autori hanno dimostrato che l'uso dei lieviti commerciali nel vino può ridurre la produzione di alcuni componenti metabolici desiderati come gli alcoli superiori, l'isoamilacetato e l'etilacetato che si ritroverebbero,

invece, in adeguata quantità nei vini fermentati spontaneamente (Wucherpennig e Bretthauer, 1970; Sponholz e Dittrich, 1974; Mateo *et al.* 1991). Pertanto, sebbene l'inoculo sia raccomandato nei moderni ed industriali stabilimenti di produzione del vino, vi è ancora qualche perplessità circa la mancanza di alcuni caratteri desiderabili delle naturali o spontanee fermentazioni (Fleet e Heard, 1993). Inoltre non bisogna dimenticare che la dinamica dei vari ceppi di *S. cerevisiae*, durante la fermentazione alcolica spontanea, contribuisce in modo significativo alla composizione chimica e alle caratteristiche sensoriali del vino prodotto (Lurton, 1995). Differenze a livello di ceppo di *S. cerevisiae* hanno fornito delle indicazioni circa la ragione di un sapore più ricco, di un carattere e di un'individualità dei mosti fermentati spontaneamente rispetto ai mosti fermentati con singoli ceppi di lieviti secchi attivi (Dittrich, 1976; Schütz e Gafner, 1992). Sulla base di questi studi, ancora oggi molti produttori di vino, per conferire alle cantine "boutique" il loro prodotto, sono disposti ad accettare i "rischi" legati alle fermentazioni spontanee allo scopo di raggiungere una distinzione stilistica ed una variabilità del loro prodotto. Comunque la realizzazione di caratteri stilistici e il contributo, individuale e collettivo, dei lieviti al vino è abbastanza variabile. Il risultato della fermentazione spontanea dipende non solo dal numero e dalla diversità dei lieviti presenti nel mosto, ma anche dalla composizione chimica dell'uva e dalla tecnologia di produzione; l'effetto combinato di tali fattori introduce

un certo livello di variabilità nell'ecologia della vinificazione, che può tradursi in variabilità biochimica del processo con variabilità di effetti sulle proprietà sensoriali di un vino e, quindi, sulla sua qualità (Romano, 2002; Romano *et al.*, 2003b; Fleet, 2003).

#### **1.4 Evoluzione dei lieviti nella fermentazione spontanea**

La complessità delle caratteristiche sensoriali di un vino può essere considerata una misura della sua qualità, ma queste sono molto influenzate anche da minime variazioni nella tecnologia di lavorazione. La presenza e, conseguentemente, l'attività di diversi microrganismi nei successivi momenti della vinificazione si traduce nella modificazione delle caratteristiche sensoriali del vino finito (Mafart, 1989). Chi si pone come obiettivo la costanza qualitativa e la stabilità microbiologica del vino, innanzitutto, deve conoscere e poi controllare la composizione e l'evoluzione delle popolazioni microbiche che si susseguono nel corso della fermentazione (Querol *et al.* 1992a). Nell'ambito dei microrganismi che prendono parte alla trasformazione del mosto d'uva in vino, i lieviti sicuramente occupano un ruolo di primaria importanza nel determinare l'andamento della fermentazione, tanto che qualcuno ha sostenuto che "i lieviti fanno il vino e i batteri lo affinano", per cui la conoscenza dell'evoluzione dei lieviti nel corso della fermentazione alcolica è

importante per il controllo della fermentazione stessa e per garantire un prodotto finito di qualità (Torija *et al.*, 2001).

E' noto ormai da molto tempo che la fermentazione comincia con l'azione di lieviti di forma apiculata e che in un secondo tempo appaiono delle cellule di forma ovale, ellittiche o allungate le quali prendono il sopravvento sulle prime portando a termine il processo fermentativo; e già Müller–Thurgau nel 1894/95 aveva accertato che i lieviti di forma apiculata producono una minima quantità di alcool e abbondanti prodotti secondari, mentre gli ellittici producono grandi quantità di alcool e pochi prodotti secondari. Ricerche molto più approfondite sono state condotte su questo argomento e hanno dimostrato che numerose specie di lieviti possono essere presenti nelle varie fasi di fermentazione dei mosti. I lieviti dei generi *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* predominano nelle prime fasi, seguiti da diverse specie di *Metschnikowia* e *Pichia* e, a volte, di *Issatchenkia* e *Kluyveromyces* nelle fasi centrali, quando la concentrazione dell'etanolo arriva al 3–4 %, (Fleet e Heard, 1993). In questa fase, queste specie di lievito hanno utilizzato parte degli zuccheri ed amminoacidi del mosto, in quantità sufficienti per produrre una serie di composti secondari, che influenzano fortemente la qualità finale del vino. I lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono in maniera significativa alla fermentazione, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a  $10^6$ - $10^7$  cellule  $\text{ml}^{-1}$  (Fleet *et al.* 1984; Heard e Fleet, 1986). Si pensa che queste alte

popolazioni influenzino la composizione del vino così come lo sviluppo di *Saccharomyces*, dal momento che i cambiamenti chimici del vino prodotti dai non-*Saccharomyces* influenzano sia la cinetica di crescita che il metabolismo dei *Saccharomyces* (Lema *et al.* 1996). Con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consentendo in tal modo ai lieviti *Saccharomyces*, generalmente dotati di un maggiore potere alcoligeno di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo (Amerine *et al.* 1982; Lafon-Lafourcade, 1983; Querol *et al.* 1990). Tuttavia, gli stessi lieviti apiculati hanno dimostrato, in alcuni casi, di sostenere da soli e in modo soddisfacente la vinificazione (Garoglio, 1981). Inoltre, basse temperature di fermentazione (10-15°C) sono considerate favorevoli ad uno sviluppo preferenziale dei lieviti apiculati, in particolare, incrementano la tolleranza all'etanolo delle specie *Hanseniaspora* e *Candida*, al punto che questi lieviti non scompaiono e diventano specie dominanti accanto a *S. cerevisiae* per un tempo più lungo (Heard e Fleet, 1988; Erten, 2002). Oltre a *S. cerevisiae*, poche altre specie hanno la possibilità di intervenire nelle ultime fasi della fermentazione e in quelle centrali, in quanto dotate di un discreto potere alcoligeno; si tratta di *Torulaspota delbrueckii* (già *Torulaspota rosei* o *Saccharomyces rosei*) e *Zygosaccharomyces bailii* (già *Saccharomyces bailii*) che occasionalmente

possono anche sostituire lo stesso *S. cerevisiae* e di varie specie del genere *Schizosaccharomyces* (*Schiz. pombe*, *Schiz. japonicus*). Altri lieviti non rari, ma il cui intervento è del tutto marginale, sono rappresentati da *Saccharomyces ludwigii*, *Metschnikowia pulcherrima* e alcune specie del genere *Brettanomyces*. Al termine della fermentazione poi, se non viene impedito in qualche modo il contatto con l'aria atmosferica, è inevitabile lo sviluppo dei lieviti della fioretta, rappresentati principalmente da *Pichia membranaefaciens*, *Candida vini* e *Hansenula anomala*; questi, come è ben noto, sono privi di attività fermentativa, formano veli superficiali spessi e fragili, si moltiplicano respirando l'alcool etilico e provocano una netta diminuzione del grado alcolico. Tuttavia, le possibili varianti, soprattutto in termini quantitativi, al quadro microbiologico sopra delineato sono innumerevoli in quanto lo sviluppo e l'attività di ogni specie dipendono da numerosi fattori di natura chimica, fisica e biologica, tra loro interattivi. Tra di essi, un ruolo di primaria importanza è svolto dall'ossigeno. Durante la fermentazione vinaria, i lieviti si sviluppano in presenza di bassissime concentrazioni di ossigeno e Visser *et al.* (1990) hanno dimostrato che *S. cerevisiae* è in grado di svilupparsi rapidamente anche in condizioni strettamente anaerobiche, mentre altre specie, incluse le specie vinarie di *Hanseniaspora* e *Torulasporea* crescono molto lentamente nelle stesse condizioni, per cui la successione dei lieviti durante la fermentazione, oltre ad essere correlata alla bassa tolleranza all'etanolo da parte dei lieviti non-

*Saccharomyces*, potrebbe in parte essere anche legata al fatto che questi lieviti sono meno tolleranti alla bassa concentrazione di ossigeno nel mezzo, se confrontati con *S. cerevisiae* (Holm Hansen *et al.*, 2001). Questa ipotesi è supportata da recenti risultati che hanno dimostrato che l'ossigeno incrementa il periodo di tempo durante il quale, ad esempio, *Hanseniaspora valbyensis* coesiste *S. cerevisiae*, e decresce la velocità di morte di *H. valbyensis* nel caso di fermentazioni condotte in coltura mista con *S. cerevisiae* (Panon, 1997). E' dunque facile intuire che la tipologia delle specie presenti e la loro abbondanza relativa all'inizio del processo fermentativo, la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna popolazione, grazie alle peculiarità metaboliche che in prima istanza possono essere considerate specie-specifiche, siano tutti elementi in grado di incidere anche fortemente sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finale, nel bene e anche nel male (Lambrechts e Pretorius, 2000).

## **1.5 Biodiversità intraspecifica dei lieviti nella vinificazione spontanea**

La significativa partecipazione di più specie di lieviti nel processo fermentativo spontaneo rispetto a quello guidato introduce sicuramente un elemento di maggiore biodiversità interspecifica nell'ecologia della fermentazione vinaria (Vincenzini *et al.*, 2005). Tuttavia, in questi ultimi

anni, grazie soprattutto alla messa a punto e all'applicazione di metodiche molecolari di analisi delle popolazioni di lieviti, è anche emerso che le vinificazioni spontanee sono caratterizzate da una significativa biodiversità intraspecifica (Querol e Ramón, 1996; Cocolin *et al.*, 2002). In effetti, dai dati disponibili in letteratura risulta chiaramente che la popolazione di *S. cerevisiae* che si sviluppa in una vinificazione spontanea è caratterizzata da un elevato polimorfismo genetico. In altre parole, la popolazione di lieviti *S. cerevisiae* in una vinificazione spontanea è costituita da ceppi tra loro genotipicamente diversi, possibilmente dotati di proprietà fenotipiche diverse e, quindi, potenzialmente capaci di influenzare, in proporzione alla loro abbondanza relativa, le caratteristiche aromatiche del prodotto finale (Romano *et al.*, 2003b).

Secondo Vincenzini *et al.*, (2005), sulla scorta dei risultati pubblicati in questi ultimi anni relativamente a ricerche inerenti alla struttura genetica delle popolazioni di *S. cerevisiae* sviluppatesi in vinificazioni spontanee, realizzate presso una stessa azienda vitivinicola in anni consecutivi, o presso aziende della stessa area enologica ma con uve di diversa varietà, o presso aziende di aree enologiche diverse ma con uve della stessa varietà, è possibile tracciare il seguente quadro:

- in ogni vinificazione spontanea il polimorfismo genetico della popolazione di lieviti *S. cerevisiae* è elevato;

- generalmente, pur in presenza di un elevato polimorfismo genetico, i ceppi dominanti di *S. cerevisiae* sono pochi, da due a tre;
- alcuni ceppi dominanti di *S. cerevisiae*, isolati da vinificazioni spontanee realizzate presso una stessa azienda vitivinicola, possono risultare ricorrenti negli anni, lasciando supporre che possa esistere una certa correlazione tra ceppo/i e cantina;
- alcuni ceppi dominanti di *S. cerevisiae*, isolati da vinificazioni spontanee realizzate presso aziende vitivinicole diverse ma della stessa area enologica, possono risultare molto simili, lasciando supporre che possa anche esistere una certa correlazione tra ceppo/i e area enologica o territorio d'origine.

Le implicazioni pratiche di tali evidenze sperimentali sono di ampia portata, interessando sia aspetti relativi alla tipicità di un vino, sia aspetti riguardanti l'influenza della biodiversità intraspecifica sulla composizione e sulle caratteristiche qualitative del vino ottenuto da fermentazioni spontanee con una miscela naturalmente assortita di ceppi geneticamente diversi.

## **1.6 I lieviti selezionati e il loro impiego enologico**

L'impiego di colture microbiche selezionate nell'industria alimentare è una pratica che di certo non può essere definita di avanguardia e neppure recente, dal momento che già Christian Hansen, basandosi sugli studi di

Pasteur, nel 1882 e negli anni successivi, isolò una coltura pura derivata da una singola cellula di lievito e nel 1890 Müller–Thurgan introdusse il concetto di inoculare le fermentazioni del vino con colture pure starter (Pretorius e Van der Westhuizen, 1991). Nel 1965, i primi due ceppi commerciali di lievito del vino secchi attivi (ADWY) furono prodotti per una grande cantina californiana (Degré, 1993). Questi due ceppi, denominati Montrachet e Pasteur Champagne, furono diffusi dovunque come lieviti per tutti gli scopi, con successo limitato. Attualmente diverse compagnie che si occupano di lieviti selezionati, producono un'ampia varietà di colture disidratate di ceppi di *S. cerevisiae*. La pratica di sopprimere la microflora naturale e di procedere all'innesto di lieviti a parte selezionati e coltivati in coltura pura può realizzarsi in modo più o meno rigoroso e quindi aversi una *fermentazione pura assoluta* ed una *fermentazione pura relativa*. E' *assoluta* quando nel mosto di partenza si eliminano nel modo più completo tutti i microrganismi presenti sì che la fermentazione viene affidata ai soli lieviti aggiunti. E' *relativa* quando, usandosi mezzi sterilizzanti più blandi, non si consegua la devitalizzazione di tutti i microbi presenti ond'è che, un loro eventuale intervento, può rendersi possibile; o anche allorquando si aggiungono lieviti in predominanza numerica così grande rispetto alla flora naturale da potersi considerare la fermentazione come dovuta, praticamente, ai soli lieviti innestati. Generalmente, il ceppo deliberatamente addizionato prende il

sopravvento sulla microflora autoctona e porta a termine il processo fermentativo impartendo al vino la sua “impronta aromatica”. La differenza tra questo processo fermentativo e quello realizzato con lieviti indigeni, almeno sotto il profilo ecologico, è evidente, anche se va ricordato che non sempre il lievito aggiunto risulta poi effettivamente dominante: può capitare, infatti, che i lieviti indigeni permangano a lungo a livelli numericamente significativi (Zambonelli, 1998). L'impiego dei lieviti selezionati si basa sul principio di affidare la fermentazione più che ad un *solo lievito*, ad un'associazione di lieviti puri, opportunamente scelti, in ordine alla natura dei mosti da fermentare e delle condizioni di ambiente in cui si opera, e in conformità ai caratteri chimici ed organolettici che si desidera imprimere al prodotto (Garoglio, 1981). Tale pratica esige, ovviamente, che il mosto da fermentare sia previamente reso sterile o sufficientemente sterile e porta a risultati che, nella generalità dei casi, si possono ben dire soddisfacenti. Infatti tra i vantaggi che conseguono alla fermentazione in purezza sono sicuramente da ricordare i seguenti:

- un avvio rapido del processo fermentativo
- eliminazione dei lieviti apiculati ritenuti responsabili di fermentazioni poco pulite e incomplete
- riduzione o eliminazione di caratteri merceologici e organolettici anomali

- un andamento regolare della fermentazione, senza il rischio di fermentazioni alternative che possono dar luogo a prodotti secondari negativi
- fermentazioni con risultati prevedibili e programmabili
- ottenimento di un prodotto riproducibile
- maggior rapporto alcool/zucchero, quindi maggior rendimento
- alcuni ceppi di lievito resistenti ad alte quantità di alcool possono permettere la ripresa di una fermentazione bloccata dall'alcool stesso
- alcuni ceppi di lievito conferiscono al prodotto determinate caratteristiche, producendo ad esempio glicerina, che conferisce morbidezza al vino, oppure sviluppando basse quantità di acidità volatile
- più rapida chiarificazione
- maggiore serbevolezza del vino (Kunkee e Amerine, 1970).

A questi vantaggi universalmente riconosciuti se ne aggiungono altri ancora non perfettamente definiti. Per i lieviti selezionati cosiddetti “di ultima generazione”, infatti, si stanno ricercando alcune proprietà specifiche in grado di caratterizzare i vini e di migliorarne la qualità attraverso la produzione di composti secondari, la liberazione di molecole e/o la piena espressione di precursori presenti nei mosti.

Il ricorso ai lieviti selezionati, secondo alcuni, non solo è raccomandabile, ma è addirittura necessario nell'ambito delle fermentazioni di massa, nel

caso di annate cattive, nel caso di arresti di fermentazione e di vini–mosti e vini da correggere, nelle rifermentazioni e nelle vinificazioni speciali per la produzione sia di vini da dessert che di vini spumanti; si rende inoltre necessario nei mosti provenienti da località dove la vite, di recente introdotta, non presenta una microflora naturale affermata, né nel vigneto né in cantina.

Ciò nonostante non vi è consenso tra i produttori di vino ad utilizzare i lieviti selezionati. Ad un estremo vi sono quelli che continuano ad usare esclusivamente lieviti indigeni, credendo che solo il contributo delle diverse specie di lievito sia capace di conferire una complessità e una qualità superiore al vino, non ritrovabili invece nel vino ottenuto attraverso fermentazioni guidate ed inoculate. Altri preferiscono cominciare con i lieviti naturali (nativi) e inoculare successivamente i lieviti commerciali. Altri ancora iniziano la fermentazione del vino con gli starter ma a livelli di inoculo più bassi rispetto a quelli raccomandati (Pretorius, 2000).

## **1.7 Lieviti “autoctoni” e valorizzazione dei vini tipici di qualità**

Sebbene l’impiego dei lieviti selezionati in enologia abbia portato un decisivo miglioramento della qualità dei vini, specialmente di quelli definiti comuni e abbia determinato il pieno recupero di territori un tempo

considerati del tutto privi di vocazione enologica e l'espansione dell'enologia in zone nuove, questa pratica è stata oggetto di numerosi critiche riguardanti la sua applicazione ai vini di pregio prodotti in zone di grande tradizione vitivinicola. L'obiezione principale mossa ai lieviti selezionati riguarda il rischio di un appiattimento della qualità, forse utile nel caso di vini comuni ma del tutto inammissibile nel caso di vini pregiati. La critica non è priva di fondamento perché, nonostante *Saccharomyces cerevisiae* sia una specie con altissima variabilità di caratteri, la selezione porta necessariamente all'ottenimento di ceppi piuttosto uniformi, che possono differenziarsi soltanto per alcuni particolari quali il tipo di sviluppo, l'azione disacidificante e pochi altri (Zambonelli *et al.*, 2004). Vengono a mancare tutte quelle attività che sono estranee alla specie *S. cerevisiae* ma che possono essere possedute da altri lieviti che intervengono nella fermentazione naturale in maniera marginale (Rainieri e Pretorius, 2000).

L'uso di poche colture selezionate potrebbe pertanto condurre ad una standardizzazione dell'agente microbico con il risultato di ottenere la riduzione della biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina e la conseguente minore variabilità dei vini dovuta alla loro attività, con il rischio di produrre lo stesso vino da tutte le uve e in tutte le parti d'Italia o addirittura del mondo. Secondo alcuni autori la diffidenza nei

confronti dei lieviti starter da parte di taluni potrebbe essere dovuta al fatto che gli starter reperibili in commercio pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, non sono sempre capaci di sviluppare completamente i sapori e gli aromi tipici di vini provenienti da diverse cultivar di vite (Pretorius, 2000). Inoltre, come già riferito, l'uso generalizzato di pochi starter selezionati esercita un effetto erosivo sulla biodiversità dei lieviti autoctoni, selezionati in ambienti legati alla vinificazione attraverso anni di pratiche tradizionali. Questa perdita progressiva di biodiversità potrebbe portare ad una potenziale uniformità di caratteristiche aromatiche nei prodotti finali. Sulla base di questi dati, è stata formulata l'ipotesi secondo la quale il pregio di alcuni vini sarebbe dovuto all'intervento di lieviti originari di un territorio vitivinicolo ben delimitato, la cui presenza è costante nel tempo e la cui attività contribuisce al conferimento della tipicità e delle caratteristiche qualitative dei vini prodotti in quel territorio. Si tratta dei cosiddetti lieviti "autoctoni" intendendo per tali quelli che sono tipici del biotopo del vitigno e che non sono stati sottoposti ad alcuna tecnica microbiologica di selezione e/o miglioramento. Questi lieviti, da tempo adattati al substrato e al territorio, provenienti da specifiche regioni vitivinicole, possono essere capaci allo stesso tempo di controllare il processo fermentativo e di esaltare le proprietà sensoriali del vitigno al quale sono associate (Ciani *et al.*, 1997). I lieviti autoctoni sarebbero dunque uno dei principali costituenti del

cosiddetto "*Genius loci*" (Zambonelli, 1998), per quest'ultimo si deve intendere quell'insieme di fattori legati all'ambiente, alla tradizione, alle pratiche di campo e di cantina che nel loro insieme danno origine ad un prodotto le cui caratteristiche sono esclusive e si mantengono costanti nel tempo. Essi rappresentano il frutto di una selezione naturale svolta da diversi fattori e pertanto sono i più idonei per la guida della fermentazione di quei mosti. I lieviti autoctoni sono costituiti, oltre che da ottimi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* anche da ceppi di altre specie il cui intervento, per quanto marginale, potrebbe essere sufficiente per dare un'impronta qualitativa particolare ai vini. Su tale concetto si basa l'intera struttura della normativa europea sulle denominazioni di origine controllata per la determinazione delle aree viticole, l'adattabilità di specifiche cultivar a particolari regioni e l'adeguatezza delle pratiche enologiche. Nell'ottica del crescente interesse di valorizzare la qualità e la tipicità dei prodotti, gli sforzi degli operatori del settore e dei ricercatori si vanno indirizzando verso l'ottenimento e l'impiego di colture starter specificatamente selezionate in funzione delle caratteristiche compositive di ciascun mosto, delle tecnologie di vinificazioni usate e dello stile del vino che si vuole ottenere; nascono quindi due filoni di ricerca:

1. l'isolamento e lo studio dei lieviti autoctoni rappresentati sia da *Saccharomyces cerevisiae* che da altre specie;

2. l'impiego per la fermentazione dei mosti di lieviti di varie specie in successione (fermentazione scalare) o in associazione con *S. cerevisiae*.

### **1.8 Fermentazioni in associazione o scalari**

La proliferazione di alcune specie di lieviti non-*Saccharomyces*, anche se indigeni delle uve, non sempre è desiderata durante la fermentazione dei mosti d'uva. I lieviti non-*Saccharomyces* non sono alcol-tolleranti, sono sensibili all'anidride solforosa e producono indesiderabili alte concentrazioni di acido acetico ed etil-acetato (Fleet e Heard, 1993). Per queste ragioni sono ritenuti non idonei alla vinificazione e non sono stati considerati in studi sulla selezione dei lieviti vinari. Soltanto recentemente è stata presa in considerazione la potenziale applicazione dei lieviti non-*Saccharomyces* nei processi di vinificazione (Herraiz *et al.*, 1990; Lema *et al.*, 1996; Ciani e Maccarelli, 1998; Granchi *et al.*, 2002; Romano, 2002; Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003; Plata *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003b; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). Diversi studi hanno messo in evidenza che alcune specie di lieviti appartenenti al genere *Candida*, *Kloeckera* e *Hanseniaspora* possono influenzare positivamente l'intero carattere del vino, migliorando le proprietà aromatiche e impartendo profili di flavour complessi e nuovi (Fleet e Heard, 1993; Fleet, 1998; Romano, 1997). Per tale motivo, un loro impiego come colture starter nelle fermentazioni, in

associazione o in successione con i ceppi più alcol-tolleranti di *S. cerevisiae*, potrebbe essere auspicabile. Con il metodo delle fermentazioni scalari o in associazione, ai ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* verrebbe affidato il compito di conferire la struttura di base del vino, relativamente al grado alcolico, alla concentrazione di glicerolo, all'acidità totale, all'acidità volatile; ai lieviti non-*Saccharomyces*, invece, il compito di affinare la qualità o di conferire la tipicità al vino.

## **1.9 La selezione dei lieviti vinari**

Nonostante la selezione e l'utilizzazione di colture starter miste rappresenti un'importante innovazione nei processi di vinificazione, allo stato attuale, la selezione dei lieviti vinari si attua essenzialmente all'interno del genere *Saccharomyces*. Ciò è dovuto principalmente a due fattori: il primo è legato al ruolo chiave svolto da *S. cerevisiae* nella determinazione della fermentazione, il secondo è rappresentato dal fatto che la selezione dei lieviti non-*Saccharomyces* è piuttosto complicata, dal momento che bisognerebbe studiare le interazioni metaboliche e fisiologiche ricorrenti tra i vari componenti della coltura starter mista (Mannazzu *et al.*, 2002).

La selezione dei lieviti vinari ha lo scopo di ottenere colture di lievito capaci di condurre il processo fermentativo verso risultati predeterminati, essi devono pertanto possedere alcune caratteristiche di base, la cui assenza

o carenza ne vanifica l'impiego. I caratteri desiderabili per una coltura starter sono diversi anche in funzione delle diverse tecnologie di vinificazione da adottare e delle differenti tipologie di prodotto che si vogliono ottenere (Zambonelli *et al.*, 2000). Come riportato da (Giudici e Zambonelli, 1992), le operazioni di selezione possono essere così riassunte:

1. isolamento di un gran numero di colture e loro classificazione;
2. individuazione dei caratteri enologici sui quali condurre il processo di selezione per ottenere la coltura starter desiderata;
3. selezione delle colture isolate per i caratteri individuati e scelti in funzione degli obiettivi che si vogliono perseguire;
4. individuazione di ceppi che possiedono valori ottimi per i caratteri principali e presentano le attitudini enologiche desiderate;
5. costruzione, mediante miglioramento genetico classico o mediante tecniche che prevedono l'utilizzo del DNA ricombinante, di colture con la combinazione di caratteri non reperibili in natura;
6. valutazione dell'attitudine enologica dei ceppi selezionati o modificati in microvinificazioni pilota e analisi e confronto delle caratteristiche sensoriali dei vini ottenuti.

Tutte le selezioni sono eseguite in funzione di caratteri di cui devono essere note la frequenza o l'entità con cui si presentano all'interno della specie

scelta. *S. cerevisiae* è un organismo con un alto grado di variabilità i cui caratteri enologici sono in gran parte già individuati e la cui frequenza o entità sono state determinate per mezzo di studi biometrici. I caratteri enologici possono essere suddivisi in due categorie:

- caratteri tecnologici
- caratteri di qualità

**I caratteri tecnologici** influiscono sull'andamento della fermentazione.

**I caratteri di qualità** influiscono positivamente o negativamente sulla qualità dei vini (Giudici e Zambonelli, 1992).

Di seguito sono riportati i criteri di selezione di lieviti tecnologici con i relativi riflessi tecnologici.

<b>CARATTERE DI SELEZIONE</b>	<b>RIFLESSO TECNOLOGICO</b>
Potere fermentativo	Completamento della fermentazione
Vigore fermentativo	Purezza della fermentazione
Resistenza all'anidride solforosa	Resistenza alle pratiche di cantina
Modalità di sviluppo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• polverulento</li> <li>• flocculento</li> <li>• ad aggregati cellulari</li> <li>• con potere schiumogeno</li> <li>• con potere filmogeno</li> </ul>	Possibilità di essere impiegato in specifiche linee produttive: <ul style="list-style-type: none"> <li>• rifermentazione</li> <li>• fermentazione in bottiglia</li> <li>• produzione di passiti</li> </ul>

Sviluppo a basse temperature	Impiego in fermentazioni a temperature controllate o in specifiche linee produttive (fermentazioni lente)
Sviluppo ad alte temperature	Impiego in specifiche linee produttive
Carattere killer	Purezza delle fermentazioni
Produzione di composti secondari <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicerina</li> <li>• Acido succinico</li> <li>• Acido acetico</li> <li>• Aldeide acetica</li> <li>• Alcoli superiori</li> <li>• Beta-feniletanolo</li> </ul>	Apporto di caratteristiche positive a livello gustativo e/o aromatico
Produzione di composti solforati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• idrogeno solforato</li> </ul>	Apporto di sentori di “ridotto”
Azione sull'acido malico	Azione disacidificante
Attività enzimatiche	Rilascio di aromi Rilascio di proteine Diminuzione della viscosità Rilascio di sostanze cellulari

Una prima selezione riguarda appunto i **caratteri tecnologici**, che possono essere così elencati:

- potere fermentativo o alcoolotolleranza
- vigore fermentativo
- resistenza alla SO<sub>2</sub>

- comportamento verso la temperatura
- modalità di sviluppo
- potere schiumogeno
- potere filmogeno
- carattere killer

**Potere fermentativo.** Esprime la quantità massima di etanolo che un ceppo può formare durante la fermentazione in presenza di un eccesso di zuccheri. Tale carattere è in diretto rapporto con l'alcoltolleranza, in quanto, l'inibizione dello sviluppo e l'arresto della fermentazione sono una conseguenza dell'accumulo di etanolo all'interno delle cellule. L'intensità con cui il carattere si manifesta è quindi strettamente legato alla composizione della membrana citoplasmatica che regola i rapporti della cellula con il mezzo nutritivo. Quando il trasporto dell'etanolo verso l'esterno subisce un rallentamento, esso si accumula all'interno e blocca l'attività cellulare. La specie *S. cerevisiae* è sicuramente tra quelle più alcoligene, anche se all'interno della specie si registra un'ampia variabilità entro cui è possibile operare la selezione dei ceppi.

**Vigore fermentativo.** Esprime la prontezza con cui un ceppo dà inizio alla fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine. Questo carattere viene valutato in condizioni standardizzate di temperatura e caratteristiche dei mosti (sostanze nutritive adeguate). Per la espressione numerica della

sua intensità sono stati proposti diversi metodi. Uno dei più seguiti consiste nell'esprimere il carattere in termini di grammi di CO<sub>2</sub> svolta in 48 ore da 100 ml di mosto. Studi biometrici hanno dimostrato che, in *S. cerevisiae*, questo carattere ha un alto grado di variabilità e che non necessariamente è in rapporto con il potere fermentativo.

**Resistenza alla SO<sub>2</sub>.** E' la capacità di mantenere inalterata o sufficientemente elevata la velocità di fermentazione in presenza delle dosi selettive di SO<sub>2</sub> di norma aggiunte ai mosti d'uva. In *S. cerevisiae* i ceppi sufficientemente resistenti all'anidride solforosa sono abbastanza frequenti; tuttavia, è importante selezionare i ceppi maggiormente resistenti a questo antisettico per evitare problematici avvii del processo fermentativo soprattutto in annate dove vengono somministrati al mosto quantitativi consistenti di SO<sub>2</sub> a causa dello scadente stato sanitario delle uve.

**Fermentazione a differenti temperature.** I *Saccharomyces* della vinificazione sono tipicamente microrganismi mesofili con un ottimo di temperatura che varia tra 25 e 28 °C e perciò capaci di fermentare nelle condizioni di temperatura normalmente utilizzate in cantina. Tuttavia, la tendenza per alcune tipologie di vino è quella di fermentare a temperature estremamente basse (12-16 °C). In tali condizioni i ceppi criotolleranti, cioè capaci di fermentare a basse temperature, sono certamente da preferire, tra di essi, i più diffusi sono ritrovati nella specie *S. bayanus* (*S. uvarum*). Al

contrario, nelle zone a clima caldo e nel caso di mancanza di sistemi di refrigerazione, la temperatura di processo può innalzarsi e provocare dei veri e propri arresti di fermentazione. In questo caso l'impiego di ceppi termotolleranti, capaci cioè di fermentare a temperature elevate (anche di 40 °C), è certamente più indicato.

**Modalità di sviluppo.** In *S. cerevisiae* di norma lo sviluppo avviene a cellule disperse, perché, dopo il processo di divisione, le cellule figlie si distaccano dalla cellula madre: ne consegue che la torbidità provocata è uniforme, di tipo polverulento. Nel caso di sviluppo flocculante le cellule possono separarsi dopo gemmazione ma, venendo poi a contatto tra di loro, si aggregano dando origine a fiocchi anche di notevoli dimensioni. Il possesso di tale caratteristica negli starter vinari è sicuramente interessante nei processi di spumantizzazione per rifermentazione in bottiglia. Per l'impiego in fermentazioni primarie lo starter selezionato dovrebbe svilupparsi in forma dispersa.

**Potere schiumogeno.** È un carattere che si può manifestare nei ceppi polverulenti o flocculenti ed è legato alla idrofobicità delle cellule e alla loro tendenza al galleggiamento. In molti ceppi (20-30%) le cellule aderiscono alle bollicine di CO<sub>2</sub> che si svolgono. Queste, arrivate alla superficie, anziché rompersi si fondono tra loro e aumentano di volume dando origine alla schiume che assumono colore grigio-bruno appunto per la

presenza delle cellule. L'assenza o la scarsa produzione di schiuma è carattere sicuramente positivo in tutte le fermentazioni primarie dei mosti perché riducono in maniera significativa i volumi occupati dai mosti in fermentazione. Ciò consente un risparmio nell'acquisto delle vasche di fermentazione a parità di mosto da vinificare.

**Potere filmogeno.** Alcuni ceppi di *S. cerevisiae* hanno cellule di tipo polverulento che, al termine della fermentazione, manifestano tendenza al galleggiamento e si portano in superficie. Qui, a contatto con l'aria, ricominciano a sviluppare con metabolismo ossidativo utilizzando l'etanolo da loro stesse formato in precedenza. Per effetto della loro attività, la composizione del vino si modifica profondamente ed il prodotto assume caratteristiche sensoriali del tutto particolari e gradevoli. Il possesso di questo carattere da parte delle colture selezionate è indispensabile solo per quei vini che prevedono nelle loro fasi produttive un processo di fluorizzazione (per esempio Sherry, Vernaccia di Oristano), mentre non lo è per la fabbricazione di vini tradizionali.

**Carattere killer.** È la capacità di alcuni lieviti di produrre proteine o glicoproteine in grado di uccidere ceppi sensibili a tali tossine. Questo carattere scoperto per la prima volta in *S. cerevisiae* è ampiamente diffuso anche in altri generi di lievito. Il possesso del carattere killer senza dubbio aumenta la competitività, favorendo i ceppi killer su quelli sensibili. Tale

vantaggio tuttavia è limitato all'azione nei confronti dei *Saccharomyces* selvaggi sensibili, senza peraltro incidere sulla competitività degli starter nei confronti dei non-*Saccharomyces* selvaggi.

I ceppi che mostrano una buona attitudine tecnologica vengono ulteriormente selezionati sulla base dei **caratteri di qualità** come di seguito riportato:

- produzione di glicerolo
- produzione di acido acetico
- produzione di aldeide acetica
- produzione di alcoli superiori
- produzione di composti solforati (anidride solforosa e idrogeno solforato)

**Produzione di glicerolo.** Il glicerolo, dopo l'etanolo e l'anidride carbonica, è il composto prodotto in maggiore quantità durante la fermentazione alcolica. Esso è uno dei principali componenti dell'estratto secco di un vino e quindi influenza notevolmente il cosiddetto "corpo del vino". Questo prodotto secondario della fermentazione alcolica contribuisce significativamente a impartire ai vini i caratteri di "dolcezza" (soglia di percezione 5,2 g/L), di "corposità" e di "pienezza". I *Saccharomyces* della

vinificazione possono produrre dai 2 ai 10 g/L in funzione della specie e del ceppo di lievito.

**Produzione di acido acetico.** *S. cerevisiae* è una delle specie che forma le minori quantità del composto, superata, in questo, soltanto da altre specie dello stesso genere. In *S. cerevisiae* la capacità di produrre determinate quantità di acido acetico è carattere di ceppo, stabile ed ereditario. L'entità di produzione varia entro un intervallo piuttosto ampio, da 0.1 a 1.0 g/100 ml di etanolo con una media di 0.35g/100 ml.

**Produzione di aldeide acetica.** La capacità di formare tale composto è comune a tutti i lieviti; in *S. cerevisiae* la sua entità di produzione è carattere di ceppo ed è compresa fra 15 e 100 mg per 100 ml di etanolo. L'acetaldeide si lega all'anidride solforosa limitandone il potere antisettico. Una coltura selezionata da impiegare nella fermentazione primaria, quindi, dovrebbe produrre in fermentazione limitate quantità di acetaldeide, anche per evitare a fine processo rilevanti concentrazioni di anidride solforosa in forma combinata.

**Produzione di alcoli superiori.** La produzione di tali composti è in funzione sia del ceppo sia delle caratteristiche del mosto iniziale. Gli alcoli superiori rappresentati prevalentemente sono: l'n-propanolo, l'isobutanolo, l'alcol amilico, l'alcol isoamilico e l'alcol 2-fenil etilico. La concentrazione di alcoli superiori sino ad una certa soglia influenza positivamente il profilo

aromatico dei vini. Tuttavia elevate concentrazioni di alcoli superiori totali (>350 mg/l) e in particolare di alcol isoamilico influenzano negativamente il bouquet del vino.

**Produzione di composti solforati.** I composti solforati, dal punto di vista quantitativo, sono costituiti principalmente da idrogeno solforato e anidride solforosa, che derivano direttamente dalla riduzione dei solfati presenti nei mosti; sono sempre prodotti da *S. cerevisiae*, anche se in quantità differenti e variabili in funzione del ceppo. Un'eccessiva concentrazione di idrogeno solforato nei vini causa odori sgradevoli di uova marce e quindi la sua produzione da parte delle colture selezionate deve essere sempre ai più bassi livelli. Per quanto riguarda invece la produzione di anidride solforosa da parte del lievito, numerosi studi hanno evidenziato un'ampia variabilità. La capacità di stabilizzare i vini da parte dei ceppi di lievito è legata alla produzione di anidride solforosa. Tuttavia, alcuni ceppi che producono quantità rilevanti di anidride solforosa (anche 100-120 mg/L), hanno anche la tendenza a produrre notevoli quantità di acetaldeide (per difendersi da tale antisettico). Il risultato, a fine fermentazione, è un'alta concentrazione di anidride solforosa combinata, che può compromettere la qualità del vino. Durante le operazioni di selezione di uno starter vinario, quindi, la preferenza dovrebbe andare ai ceppi che producono bassi livelli di anidride solforosa (massimo 10-20 mg/L).

Su alcuni stipiti, particolarmente promettenti, vengono poi effettuate indagini più approfondite che riguardano:

- produzione di esteri
- attività pectinasica, gluconasica e xilanasica (per lieviti da impiegare in vinificazioni con macerazione)
- attività beta-glicosidasica
- produzione di ammine biogene
- attività malo-alcolica

infine per gli stipiti con caratteristiche adeguate ad un potenziale impiego in vinificazione, vengono verificate le capacità di resistere ai processi di essiccazione e quindi di riprendere l'attività fermentativa dopo opportuno inoculo in mosto.

## **1.10 Miglioramento genetico e DNA ricombinante applicato ai lieviti vinari**

I lieviti idonei alla guida della fermentazione dei mosti d'uva devono possedere i caratteri di competitività a livelli elevati perché sono quelli che conferiscono alla coltura la capacità di prendere possesso del mezzo a scapito dei lieviti naturali, di produrre un'ottima fermentazione e di portarla a termine. Al contrario un carattere negativo come la produzione di acido

acetico deve essere sempre a basso livello perché questo composto compromette la qualità dei vini. L'importanza di altri caratteri, invece, è variabile e la loro presenza e l'intensità con cui si manifestano hanno valenza positiva o negativa a seconda dei risultati che si vogliono conseguire (Vincenzini *et al.*, 2005). Ecco perché non si parla di un tipo di lievito selezionato per l'enologia, ma di tante tipologie di lievito, ciascuna per ogni condizione tecnologica e di prodotto. I ceppi attualmente disponibili in commercio sono il frutto di selezioni clonali più o meno accurate; sono sicuramente idonei alla vinificazione ma possono essere poco caratterizzati e/o carenti di alcune particolari attitudini richieste. Poiché però è molto difficile trovare tra i ceppi naturali quello in possesso della combinazione ideale di tutti i caratteri desiderati (Rainieri & Pretorius, 2000), si può tentare di ottenerlo mediante un lavoro di miglioramento. Ciò può avvenire secondo i metodi di genetica classica (mutagenesi e selezione, ibridazione, citoinduzione, fusione di protoplasti) o con la tecnica del DNA ricombinante (Schuller e Casal, 2005).

Le tecniche di genetica classica hanno trovato finora limitata applicazione nella pratica a causa della mancanza di specificità, poiché spesso provocano una diminuzione del potere fermentativo. Ciò significa che i ceppi costruiti sono in possesso di nuovi e importanti caratteri ma mancano di competitività e quindi di idoneità enologica (Pretorius, 2000).

Più specifica sicuramente è la tecnica del DNA ricombinante, che si avvale del clonaggio genico e della trasformazione, poiché permette di modificare caratteri esistenti o introdurre nuovi caratteri senza andare a modificarne altri desiderati. Numerosi sono i ceppi vinari modificati geneticamente apparsi in letteratura nei quali sono stati introdotti vari caratteri: alta produzione di glicerolo, attività maloalcolica ai massimi livelli, attività malolattica. Tuttavia, la diffusione di lieviti vinari ricombinanti (organismi geneticamente modificati, OGM) è molto condizionata dalle peculiari caratteristiche dell'industria enologica, che risulta molto legata alla tradizione e alla "naturalità" del processo. Inoltre esistono barriere in campo alimentare sull'accettazione di alimenti in cui sono coinvolti gli OGM nel processo produttivo (Vincenzini *et al.*, 2005).

### **1.11 Composti prodotti durante la fermentazione**

Il prodotto principale della fermentazione alcolica è l'**alcol etilico** o etanolo: esso è, dopo l'acqua che rappresenta l'85-90% del volume del vino, il costituente più abbondante con il 10-15%. Il tenore di alcol è in relazione diretta con il grado zuccherino del mosto di provenienza e con il potere fermentativo dei lieviti. Dal punto di vista organolettico l'odore dell'alcol etilico costituisce il supporto delle sostanze odorose e contribuisce ad esaltare l'aroma e il bouquet del vino, mentre il suo sapore

caratteristico, leggermente dolce, attenua il gusto acido del vino. Dal punto di vista tecnologico, insieme agli acidi organici, l'alcol contribuisce a preservare il vino da alterazioni microbiologiche, con un'azione antisettica e sterilizzante. Inoltre, la gradazione alcolica, espressione pratica del contenuto in alcol etilico, rappresenta ancora oggi il parametro con il quale si valuta il valore commerciale dei vini.

Dalla fermentazione provengono anche gli **alcoli superiori**, i quali pur presenti in piccole quantità (0.2-0.5 g/l) concorrono con il loro profumo alla formazione dell'aroma e del bouquet del vino ed esplicano un'azione di solvente nei confronti di altre sostanze odorose, esaltandone la volatilità (Nykänen, L. 1986).

La produzione degli alcoli superiori è dovuta all'azione dei lieviti durante la fermentazione alcolica, dal momento che le quantità riscontrate nell'uva sono completamente differenti da quelle ritrovate nel vino. Si tratta principalmente di alcol amilico attivo, alcol iso-amilico, iso-butanolo e *n*-propanolo che sono prodotti dal catabolismo degli aminoacidi rispettivamente leucina, isoleucina, valina e treonina, e dall'anabolismo del glucosio (Giudici *et al.*, 1990). Se presenti in quantità elevate, conferiscono al prodotto qualità negative. La quantità prodotta dipende anche dalla composizione del mezzo, dalla disponibilità di ossigeno, fonte azotata, e dalla concentrazione iniziale dello zucchero, ma anche e

soprattutto dalla temperatura. La capacità di produrre alcoli superiori è una caratteristica generale di tutti i lieviti e le quantità variano, oltre che in funzione del genere e della specie anche del ceppo (Romano *et al.*, 2003a-b). Altro costituente originato dalla fermentazione è il **glicerolo**, uno dei composti ponderalmente più rappresentato dopo l'alcol etilico. Questo polialcol può raggiungere nei vini un tenore di 5-10 g/l in funzione del contenuto iniziale in zuccheri, della specie di lievito e delle condizioni di fermentazione (temperatura, aerazione, acidità, solfitazione, etc.). per il suo sapore dolce, la glicerina contribuisce a conferire morbidezza al vino e dona una nota vellutata al gusto.

Tra gli acidi organici di neoformazione che concorrono alla struttura acida di un vino figura l'**acido succinico**, in ragione di 0.5-1.5 g/l, il cui tenore rimane invariato durante la conservazione e l'invecchiamento, poichè è molto resistente agli attacchi batterici. Il suo sapore è un misto di gusto acido, salato e amaro, ed ha un'influenza notevole sul gusto del vino. Figura inoltre anche l'**acido lattico**, proveniente fondamentalmente dalla fermentazione malolattica per degradazione dell'acido malico ad opera dei batteri malolattici. Complessivamente può raggiungere un tenore di 2-2.5 g/l e costituisce un elemento costante della componente acida di un vino rosso.

La principale porzione di acidità volatile è rappresentata dall'**acido acetico**. Una produzione di acidità volatile 0.2-0.4 g/l accompagna sempre la fermentazione malolattica e si producono valori ben maggiori nel caso di alterazioni ad opera di batteri acetici, i quali attaccano l'alcol etilico ossidandolo ad acido acetico, rendendo il vino spunto o addirittura acescente. Generalmente fino a valori di 0.7-0.8 g/l il gusto del vino non è deprezzato, mentre a valori maggiori si avverte un'alterazione del sapore, percepita come una durezza ed un'asprezza in gola. L'acido acetico è sempre presente, seppure in misura differente nei vini perchè, prodotto dai lieviti durante la fermentazione. Poichè il contenuto di acido acetico nei vini deve essere compreso generalmente tra 0.3-0.6 g/l, quantità superiori sono sfavorevoli alla qualità del prodotto finito e denotano, per lo più, vinificazioni non sufficientemente curate o prodotte con lieviti inadatti.

Tra le aldeidi, l'**acetaldeide** è il composto principale, rappresentando il 90% del totale. È un precursore dell'acetato di etile, acetoino ed etanolo. La sua produzione dipende principalmente dalla microflora coinvolta nella fermentazione, ma anche da altri fattori come la fase di fermentazione (il picco di maggiore produzione è raggiunto quando la fermentazione del lievito è nello stato più vigoroso), la composizione del mezzo, la natura dei materiali insolubili usati per la chiarificazione dei mosti, le condizioni di anaerobiosi, la presenza di anidride solforosa, la temperatura di

fermentazione, e lo stato di invecchiamento del vino. Nei vini bianchi è presente una quantità maggiore rispetto ai vini rossi ed il tenore di acetaldeide viene usato come indicatore dell'ossidazione.

L'**acetoino** è un composto che deve la sua importanza principalmente alle sue potenzialità organolettiche (Romano e Suzzi 1996). Dall'acetoino derivano composti, come il diacetile e il 2,3 butilenglicole, che in quantità elevate influenzano fortemente l'aroma delle bevande alcoliche. È stato accertato da tempo che l'acetoino viene prodotto da *S. cerevisiae* all'inizio della fermentazione, raggiunge il massimo della concentrazione in piena fermentazione, per declinare poi rapidamente nello stadio finale (Herraiz *et al.*, 1990).

L'**acetato di etile** rappresenta il principale estere del vino. Concentrazioni variabili da 50 a 80 mg/l sono favorevoli alla qualità del vino, mentre quantità maggiori fino a 120-150 mg/l sono sfavorevoli per la qualità. L'acetato di etile può essere sintetizzato dall'alcol mediante l'acetil-transferasi (condensazione dell'acetil-CoA con etanolo) o dell'etanolo e dell'acetato per mezzo di una esterasi isolata in alcuni lieviti. L'acetato di etile è un prodotto della fermentazione dei lieviti e sulla base della sua produzione si evidenziano differenti comportamenti da parte di questi microrganismi.

## **1.12 Influenza dei lieviti sulla composizione chimica e sul flavour del vino**

Numerosi studi condotti da vari gruppi di ricercatori hanno dimostrato che i composti del flavour sono responsabili dell'individualità dell'aroma e delle caratteristiche organolettiche del vino (Schreier, 1979) e la maggior parte di questi composti deriva dal metabolismo dei lieviti (Suomalainen e Lehtonen, 1979; Nykänen e Suomalainen, 1983). Le varie specie e ceppi di lievito che si sviluppano durante l'intero processo fermentativo metabolizzano i costituenti del mosto, principalmente gli zuccheri, in un elevato numero di prodotti finali volatili e non volatili, che influenzano e determinano i tipi e le concentrazioni di molti prodotti che contribuiscono alle caratteristiche aromatiche del vino. Tuttavia, i maggiori prodotti volatili del metabolismo dei lieviti, l'etanolo e l'anidride carbonica, contribuiscono poco a determinare il flavour del vino, al contrario gli acidi organici, gli alcoli superiori, gli esteri, e, in minor misura, l'acetaldeide, costituiscono il gruppo principale di composti che formano il "bouquet di fermentazione" (Rapp e Versini, 1991). Quando, però, tali composti sono presenti in elevate concentrazioni possono anche risultare indesiderabili (Romano *et al.*, 2003b). Per diversi anni, molti lavori hanno riguardato lo studio dei meccanismi biochimici coinvolti nelle fermentazioni alcoliche ed attualmente sono note le vie attraverso le quali si formano i composti del

flavour. Inoltre l'utilizzo di metodi strumentali sofisticati ha permesso di dimostrare che il flavour delle bevande alcoliche è costituito da un gran numero di composti. Più di 1000 composti volatili sono stati identificati e di questi, più di 400 sono prodotti dai lieviti nel corso della fermentazione (Nykänen, 1986). L'aroma del vino è costituito da un'ampia varietà di composti con differenti proprietà aromatiche, vi sono quelli che derivano dall'uva (aroma varietale), quelli che si originano durante il processo di estrazione e condizionamento del mosto (aroma pre-fermentativo), quelli che sono prodotti da lieviti e batteri durante la fermentazione alcolica e malolattica (aroma di fermentazione) ed infine quelli che compaiono durante il processo di invecchiamento (aroma post-fermentativo), (Schreier, 1979; Boulton *et al.*, 1995; Rapp, 1998). La natura e le concentrazioni di questi prodotti nel vino sono fortemente influenzate da vari fattori che includono la posizione geografica, le condizioni del vitigno, il trasporto e le condizioni di fermentazione, (Cordonnier e Bayonove, 1981) ma sono principalmente determinate dalle specie di lieviti coinvolti nella fermentazione (Benda, 1981; Herraiz *et al.*, 1990). I prodotti di fermentazione, essendo presenti a concentrazioni più elevate, dominano rispetto agli altri composti. Tuttavia, la conversione degli zuccheri ad alcol ed altri prodotti finali da parte di specifiche popolazioni di lievito può produrre vini con distinte caratteristiche organolettiche. Le differenze nella composizione chimica dei vini prodotti dalle diverse specie di lieviti sono

più evidenti a livello quantitativo che a livello qualitativo (Romano, 1997). In altre parole, i prodotti della fermentazione sono generalmente gli stessi, ma le quantità relative dei vari composti sono diverse.

### **1.13 Influenza di ceppi di *S. cerevisiae* sul flavour del vino**

Recenti studi, sulla caratterizzazione delle differenti specie di lieviti vinari per la produzione di diversi composti, hanno evidenziato il fattore importante specie/ceppo di lievito nel determinare la composizione del vino (Brandolini *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2003a). In particolare, ceppi diversi di *S. cerevisiae* isolati da fermentazioni naturali hanno esibito un elevato grado di polimorfismo (Henschke, 1997; Romano, 1997; Pretorius, 2000) e ogni fermentazione è caratterizzata da differenti ceppi di questa specie (Frezier e Dubourdieu, 1992; Querol *et al.*, 1992b; Polsinelli *et al.*, 1996), inoltre, è ormai ampiamente accettato che i diversi ceppi di *S. cerevisiae* producono differenti quantità di composti secondari e così possono influenzare positivamente o negativamente il flavour e l'aroma del vino. Romano *et al.* (2003a) esaminando 115 ceppi autoctoni di *S. cerevisiae*, isolati dall'Aglianico del Vulture, un vino tipico della Basilicata, rilevarono l'importante ruolo svolto da questi ceppi nel determinare la composizione finale del vino. Importanti variabili per la differenziazione dei ceppi furono i differenti livelli di produzione di isobutanolo, alcol isoamilico, acetaldeide e acido acetico. In particolare, i ceppi esibivano una bassa variabilità nella

produzione di acetaldeide ed etilacetato, mentre gli altri composti erano prodotti con una significativa variabilità di ceppo. Le principali variabili per la differenziazione dei ceppi furono l'isobutanolo e l'alcolisoamilico. In definitiva, questi risultati misero in evidenza che i livelli di produzione di questi composti erano una caratteristica individuale di ceppo. Differenze statisticamente rilevanti sono state ritrovate anche da Antonelli *et al.*, 1999, sull'analisi dei composti aromatici di vini prodotti da nove ceppi di *S. cerevisiae* e quattro di *S. bayanus*. Vilanova *et al.*, (2005) inoculando il mosto Albariño con 12 differenti ceppi di *S. cerevisiae* isolati da una sola cantina in Spagna, studiarono l'influenza di questi ceppi sulla composizione e sulle proprietà sensoriali del vino finale, con l'obiettivo di identificare quelli in grado di migliorare ed esaltare le caratteristiche e le peculiarità del vino e che potessero essere usati come starter nella fermentazione. Le analisi chimiche e sensoriali condotte sui vini finali, rivelarono notevoli differenze in funzione ceppo utilizzato. L'ERSA, centro pilota per la viticoltura, partendo da diverse centinaia di ceppi di *S. cerevisiae* isolati da mosti di uve Sauvignon ha selezionato e, successivamente utilizzato, un ceppo autoctono di *S. cerevisiae* capace di incrementare i profumi tipici del Sauvignon blanc, in quanto, rispetto agli altri ceppi, aveva dimostrato fin dalle prime fasi un'altissima capacità di svolgimento degli aromi in fermentazione (Baruzzini, 2001). Il complesso patrimonio genetico della specie *S. cerevisiae* corredata i diversi ceppi naturali delle stesse

caratteristiche (stessi geni che codificano per i caratteri), ma a livello notevolmente diverso e tale da determinare, dal punto di vista del sapore e del flavour, vini con caratteristiche molto differenti pur provenendo dalla trasformazione dello stesso mosto di partenza. Due vini sperimentali ottenuti con lo stesso vitigno, Aglianico del Vulture, ma con due diversi ceppi autoctoni, mostrarono caratteristiche peculiari sia in base ai parametri analitici che in base al panel test (Romano *et al.*, 2005). Ciò mette in evidenza che la produzione di vini con differenti caratteristiche sensoriali, a partire dalla stessa varietà di uva, potrebbe essere di grande interesse commerciale perché capace di soddisfare una fascia più ampia di consumatori.

#### **1.14 Influenza dei lieviti apiculati sulle caratteristiche organolettiche del vino**

Negli ultimi anni, numerosi studi (Fleet *et al.*, 1984; Schütz e Gafner, 1993; Lema *et al.*, 1996; Egli *et al.*, 1998; Romano, 1997; 2002; Romano *et al.*, 1997b, 1998, 2000; Brandolini *et al.*, 2002) hanno messo in evidenza l'importante ruolo svolto dalle specie non-*Saccharomyces* nell'influenzare favorevolmente il flavour del vino.

Rispetto a *S. cerevisiae*, essi hanno rivelato la capacità di produrre e secernere diversi enzimi (esterasi,  $\beta$ -glucosidasi, proteasi, etc) nel mezzo,

interagendo in tal modo con i precursori presenti nell'uva per produrre composti attivi dell'aroma a di conseguenza svolgere un importante ruolo nella definizione dell'aroma varietale (Charoenchai *et al.*, 1997). Per tale motivo, il ruolo effettivamente svolto dal tipo e dal ceppo di lievito sulle caratteristiche chimiche e sensoriali dei vini, è strettamente legato alla capacità da parte dei lieviti di produrre enzimi idrolitici extracellulari, in grado di modificare composti presenti nelle uve e nei mosti (Rosi *et al.*, 1987; Rosi e Bertuccioli, 1990; Fernandez *et al.*, 2000; Cordero Otero *et al.*, 2003; Fia *et al.*, 2005). Le pectinasi, le  $\beta$ -glucosidasi e le proteasi sono alcuni, degli enzimi, secreti dai lieviti, di interesse nei processi di vinificazione a causa dei loro effetti tecnologici e del loro contributo alla formazione dell'aroma. Le pectinasi ad es. aumentano l'estrazione del succo d'uva, migliorano la chiarificazione e facilitano la filtrazione del vino; le  $\beta$ -glucosidasi idrolizzano i precursori aromatici dell'uva; le proteasi migliorano il processo di chiarificazione e le esterasi contribuiscono alla formazione dei composti dell'aroma.

Tra i composti di indubbia importanza nell'aroma dei vini, derivanti dalla fermentazione ("fermentation bouquet"), ci sono gli alcoli superiori, gli esteri etilici degli acidi grassi, e loro acetati e in misura più bassa l'acetaldeide (Rapp e Versini, 1991; Calleja e Falqué, 2004). I lieviti apiculati producono alcoli superiori in quantità più basse rispetto a *S. cerevisiae* sia nei mezzi sintetici (Romano *et al.*, 1992, 1997b); che nei

mosti naturali (Ciani, 1997; Ciani e Picciotti, 1995; Comi *et al.*, 2001), essi mostrano inoltre una grande variabilità a livello di ceppo, anche in funzione della composizione del mezzo, producendo tuttavia tali composti sempre a livelli accettabili (< 300 mg/l) e rappresentando pertanto una caratteristica positiva per questi lieviti. Gli alcoli superiori, se presenti in piccole quantità, contribuiscono positivamente alla qualità del vino. Relativamente alla produzione di acetaldeide, nonostante vi sia una considerevole variabilità ritrovata tra i ceppi di *K. apiculata* (Romano *et al.*, 2000), il comportamento generale più comunemente riconosciuto nei lieviti apiculati è la produzione di acetaldeide in quantità comparabili a quelle di *S. cerevisiae*, con l'eccezione di ceppi che ne producono circa 90 mg/l ed altri 200 mg/l. Vini di qualità superiore presentano livelli piuttosto alti di acetaldeide. Il 2,3-butandiolo e l'acetoino, sono prodotti dai lieviti apiculati, rispettivamente, in basse quantità ed alte quantità, sia nei mezzi sintetici che nel vino. Riguardo all'etil-acetato, invece, il comportamento comune di questi lieviti è rappresentato da una bassa produzione, anche se è stata evidenziata una considerevole variabilità nei livelli di produzione. Infine, rispetto ai ceppi di *S. cerevisiae*, i lieviti apiculati producono generalmente quantità più basse di glicerolo (2-3.5 g/l), mentre gli altri lieviti non-*Saccharomyces*, come i ceppi di *Candida stellata* sono caratterizzati da una più alta produzione (Ciani e Picciotti, 1995). Ci si rende pertanto conto che la maggior parte dei composti dell'aroma sono

prodotti in concentrazioni differenti dai vari ceppi dei lieviti apiculati e tale variabilità può essere di grande interesse tecnologico, dal momento che questi lieviti rappresentano dei potenziali produttori di flavour.

### **1.15 Limiti delle metodologie tradizionali e avvento delle tecniche innovative per l'identificazione dei lieviti vinari**

Come precedentemente ricordato, il numero e la diversità dei lieviti presenti nel mosto determinano, con la composizione chimica dell'uva e la tecnologia di produzione, il risultato della vinificazione. E' importante, quindi, nei processi di fermentazione spontanea, disporre di strumenti che consentano di conoscere le specie ed i biotipi di lieviti presenti e la loro evoluzione per essere sicuri della stabilità e della qualità del vino (Querol *et al.*, 1992b). Inoltre, identificare i lieviti significa anche rilevare la presenza di specie contaminanti nel corso della fermentazione, dell'invecchiamento o della conservazione dei vini.

L'identificazione tassonomica dei lieviti del vino, così come la biotipizzazione a livello di ceppo, è stata oggetto di numerose ricerche. I metodi tradizionali sono basati sull'analisi delle caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche, sulla modalità di riproduzione vegetativa e, nel caso di lieviti che si riproducono sessualmente, sulla valutazione della presenza e persistenza degli aschi, del numero delle spore

e della loro forma (Barnett *et al.*, 1983; Kreger van Rij, 1984). Tuttavia, questi metodi, che richiedono tempo ed esperienza sia in fase di realizzazione che di valutazione dei risultati, non sempre conducono ad un'identificazione certa dei lieviti. Infatti alcuni dei caratteri considerati sono sotto controllo unigenico e possono quindi venire modificati in seguito a singoli eventi mutazionali (Scheda e Yarrow, 1966; 1968). Questo è il caso di *Saccharomyces cerevisiae*, e delle specie ad esso simili, distinte, in passato, solo sulla base della loro capacità di utilizzare differenti risorse di carbonio. Altri caratteri, invece, variano in funzione dello stato fisiologico degli isolati e delle condizioni colturali (Kurtzman, 1987). Inoltre si tratta di metodi molto laboriosi e dispendiosi in termini economici. Queste difficoltà dei metodi tradizionali microbiologici hanno promosso lo sviluppo di un gran numero di differenti approcci tassonomici. Un notevole contributo per una corretta caratterizzazione dei microrganismi si è avuto con l'introduzione di metodi molecolari avanzati. E' sempre più comune, infatti, l'idea che è difficile ottenere una completa e definita identificazione di microrganismi senza ricorrere all'uso di tecniche molecolari (Amann *et al.*, 1995; Martinez-Murcia *et al.*, 1995). Conseguentemente, si parla di Tassonomia Molecolare come approccio che permette una identificazione certa, eliminando molte delle incertezze troppo spesso provocate dall'uso della tassonomia convenzionale (Martini, 1996). I metodi molecolari consentono l'identificazione dei microrganismi sulla base della

comparazione del DNA (nucleare e/o mitocondriale) degli organismi da identificare con quello di microrganismi già classificati, garantendo così l'ottenimento di risultati affidabili. Essi rappresentano pertanto strumenti di analisi molto rapidi e precisi che ovviano all'inconveniente delle tecniche classiche di essere "time-consuming". Infatti un'analisi molecolare è in grado di fornire dei risultati sicuri e ripetibili nel giro di poche ore, non dipendenti dalle condizioni di coltura.

### **1.16 La reazione a catena della polimerasi (PCR)**

Negli ultimi dieci anni, la tecnica che ha rivoluzionato le metodologie adottate nei laboratori di microbiologia e che ha aperto la strada ad un'ampia possibilità di applicazioni, è sicuramente la metodologia PCR (Polymerase Chain Reaction). Messa a punto nel 1983 da Kary Mullis, si basa sulla reazione a catena di una polimerasi, nota come *Taq* DNA polimerasi, ottenuta da un microrganismo termofilo (*Thermus aquaticus*), che consente di sintetizzare in vitro molteplici copie di DNA o RNA, partendo anche da una sola copia dell'acido nucleico. E' una tecnica di facile e rapida esecuzione, che non richiede attrezzature sofisticate e che in poche ore permette di amplificare, in modo casuale o specifico, frammenti di materiale genetico (Maffezzoli *et al.*, 1996). Questa tecnica può risultare utile per ottenere più copie di sequenze di DNA tassonomicamente significative, in modo da poterne determinare la struttura e risalire, quindi,

sulla base di banche-dati genetiche, alla specie di appartenenza, così come può essere d'ausilio per discriminare, su basi genotipiche, ceppi o biotipi nell'ambito di una stessa specie.

### **1.17 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)**

Un'importante applicazione della PCR risultata adatta a discriminare ceppi o biotipi nell'ambito della stessa specie è la RAPD-PCR (Williams *et al.*, 1990).

Questa tecnica è basata sull'impiego di piccoli primers, di sequenza arbitraria e di lunghezza in genere di dieci mer, utilizzati per amplificare porzioni random di DNA attraverso la PCR. Poiché ogni primer è costituito da un basso numero di nucleotidi, esso potrà riconoscere molti siti sull'intero DNA target. Un frammento è amplificato ogni qualvolta due di questi primers riconoscono, nel genoma, due sequenze omologhe su due filamenti, posti alla distanza massima utile per il funzionamento della Taq DNA polimerasi, e posti nella giusta direzione l'uno rispetto all'altro. Differenti sequenze geniche saranno riconosciute da primers in diversi siti e quindi, amplificati, produrranno un differente “fingerprinting” genetico, altamente specifico per un dato microrganismo. I risultati possono poi essere comparati tra i campioni per calcolare la percentuale di similarità. L'uso di un insieme di primers ci aiuta anche ad essere certi che una regione

sufficientemente ampia di DNA target sia stata esaminata (Ogram e Feng, 1997).

La tecnica RAPD consente di identificare e tipizzare i microrganismi a livello di ceppo, nonché di analizzare dinamiche di popolazione e la dominanza di ceppi all'interno di un ecosistema (Williams *et al.*, 1990). La RAPD presenta molti vantaggi rispetto ad altre metodiche di amplificazione, incluso il fatto che è *culture-independent*, è molto rapida, facile da applicare e non richiede una conoscenza specifica del genoma che deve essere amplificato. I primers utilizzati non sono selettivi per microrganismi specifici, gruppi di microrganismi o geni, e può quindi contribuire ad una migliore rappresentazione della comunità microbica rispetto ai più tradizionali approcci basati sull'amplificazione PCR. Come per altre tecniche PCR, la RAPD richiede piccole quantità di DNA, riducendo il tempo per il campionamento (Franklin *et al.*, 1999). In combinazione con gli approcci più tradizionali, le tecniche basate sul DNA-fingerprinting possono permettere al mondo scientifico di muoversi oltre la loro poca abilità di classificare completamente i costituenti di una comunità, attraverso lo sviluppo di una più completa comprensione delle globali informazioni tra le popolazioni microbiche e tra popolazioni e condizioni ambientali (Franklin *et al.*, 1999).

### **1.18 Analisi della sequenza dei domini D1/D2 del 26S rDNA**

La tipizzazione molecolare basata sul polimorfismo del DNA che codifica per l'rRNA si è rivelata molto utile come tecnica tassonomica, dal momento che gli rDNA, oltre a essere ovviamente presenti in tutti gli organismi, sono soggetti ad un processo evolutivo relativamente lento che consente la presenza sia di sequenze altamente conservate anche in specie molto diverse, che permettono la comparazione di specie non strettamente correlate, sia di sequenze variabili, dette regioni ipervariabili, utili per confrontare specie più strettamente correlate (Grimont e Grimont, 1986). In sintesi, l'rDNA è dotato di elevato polimorfismo interspecifico (in specie diverse) e limitato polimorfismo intraspecifico (all'interno della specie). Il che significa che individui della stessa specie si caratterizzano per una sostanziale identità di sequenza dell'rDNA, mentre individui appartenenti a specie diverse presentano un'identità di sequenza tanto minore quanto maggiore è la loro distanza evolutiva e quindi la loro diversità.

Negli ultimi anni, studi compiuti sugli operoni dell'rRNA, ovvero sui geni codificanti per gli RNA ribosomiali organizzati in unità trascrizionali (Jensen *et al.*, 1993), hanno consentito lo sviluppo di tecnologie rapide, efficaci e convenienti, che permettono di evidenziare l'eterogeneità inter- e intra-specifica (Moschetti *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001).

L'rDNA è quindi considerato una sorta di orologio molecolare dell'evoluzione, che consente una valutazione accurata dei livelli di similarità e delle relazioni evolutive tra i vari gruppi di microrganismi, e

cioè delle distanze filogenetiche tra loro esistenti (Stainer *et al.*, 1988; Dellaglio *et al.*, 1998).

Un'ampia varietà di specie di lieviti sono state differenziate attraverso l'analisi di parziali sequenze della larga subunità dell'rDNA, grazie al fatto che, nonostante costituisca una regione genomica altamente conservata, il 26S rDNA contiene dei domini variabili D1/D2 che consentono una differenziazione a livello di specie (Kurtzman e Robnett, 1998). Il sequenziamento di questa regione, che misura circa 600 bp, e la comparazione della sequenza ottenuta con quelle disponibili in banche dati consentono l'identificazione dei lieviti.

Secondo un'opinione correntemente accettata, differenze di più di sei basi su 600 indicano che i lieviti confrontati non appartengono alla stessa specie.

### **1.19 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)**

L'acronimo PCR-DGGE indica una tecnica che prevede l'amplificazione del DNA bersaglio (PCR) seguita da elettroforesi degli ampliconi su gel di poliacrilammide in gradiente denaturante. Questa tecnica introdotta da Muyzer *et al.* (1993) è correntemente impiegata in molti laboratori per studiare la biodiversità di comunità microbiche in campioni ambientali e alimentari e ha interessanti applicazioni anche in campo enologico. Infatti, consente di valutare la biodiversità dei lieviti che intervengono nel corso di fermentazioni spontanee o inoculate (Cocolin *et al.*, 2000; 2001). Inoltre

permette di verificare la non rara presenza di lieviti non coltivabili, cioè metabolicamente attivi ma non in grado di moltiplicarsi nei terreni colturali impiegati in laboratorio (Head *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 2002; Rappe e Giovannini, 2003) e di rilevare microrganismi contaminanti. Poiché si tratta di una tecnica culture-independent, che cioè prescinde dall'isolamento e dalla coltivazione dei microrganismi su opportuni substrati, si è rivelata in grado di fornire un quadro più realistico della diversità microbica (Ampe *et al.*, 1999). La ricerca della biodiversità ricorrente in ecosistemi naturali e tecnologici è stata realizzata, per decenni, mediante coltivazione selettiva e isolamento dei microrganismi dai campioni naturali, solo di recente si è capito che tale microflora non è sempre rappresentativa dei sistemi complessi. E' stato visto che solo una piccola frazione di microrganismi viene analizzata con i metodi convenzionali, e spesso i ceppi isolati non sembrano rappresentare il reale spettro dei microrganismi dell'habitat analizzato (Ampe *et al.*, 1999; Engelen *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1990); da qui la principale ragione dello sviluppo e dell'uso delle tecniche culture-independent.

La DGGE consente di separare frammenti di DNA dello stesso peso molecolare, ma caratterizzati da una differente sequenza di basi nucleiche (Muyzer *et al.*, 1993), anche quando questa differenza è rappresentata da una sola coppia di basi. Essa si basa sul principio secondo cui molecole di DNA, sottoposte durante la corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide a

un gradiente di agenti denaturanti chimici (urea e formamide), vanno incontro alla denaturazione (apertura della doppia elica) e quindi ad un cambiamento nella conformazione che rallenta la velocità di migrazione sul gel. La concentrazione di agenti denaturanti per l'apertura della doppia elica varia in molecole caratterizzate da sequenze diverse, infatti è inversamente proporzionale all'energia di legame tra i due filamenti. Poiché le condizioni richieste per la denaturazione delle molecole di DNA sono strettamente correlate con la loro sequenza, e dato che la denaturazione influisce sulla velocità di migrazione elettroforetica degli ampliconi, molecole con sequenza diversa migreranno diversamente in questo tipo di gel. Il grande vantaggio della DGGE è rappresentato dal fatto che, oltre a superare i problemi legati all'isolamento dei lieviti dal substrato di interesse, consente un notevole risparmio di tempo. Se nel campione da analizzare sono presenti più specie di lieviti, sarà possibile visualizzare e distinguere gli ampliconi relativi a ciascuna specie, sulla base della differente migrazione elettroforetica di ciascuno di essi. Quindi, il DNA viene estratto direttamente dai campioni da analizzare, poiché la PCR-DGGE consente di visualizzare i prodotti di amplificazione dovuti alla coesistenza nella matrice di lieviti appartenenti a specie diverse. L'identificazione delle specie che possono coesistere nella matrice analizzata avviene attraverso il confronto dei prodotti di amplificazione ottenuti con quelli generati da specie note di riferimento. Tuttavia, per

l'identificazione certa, gli ampliconi devono essere escissi dal gel, riamplicati e sequenziati. Si procede quindi al confronto delle sequenze ottenute con quelle depositate in banca dati al fine di giungere alla loro identificazione.

Tale tecnica può essere utilizzata con successo anche nella determinazione della comunità microbica dopo coltivazione su mezzi solidi o liquidi, mediante la formazione dei cosiddetti "bulks" cellulari, ossia una raccolta di tutte le colonie presenti sulle ultime piastre contabili, dai quali si estrae il DNA e si effettua l'analisi PCR-DGGE (Ercolini *et al.*, 2001). Tale metodo si è rivelato una valida alternativa ai metodi tradizionali di identificazione delle specie dominanti, che viene realizzata attraverso il sequenziamento delle bande DGGE derivanti dai patterns corrispondenti alle più alte diluizioni, invece dell'isolamento delle colonie singole seguito dalla purificazione e dall'identificazione biochimica. I bulks provenienti dalle piastre contabili possono così essere usati per identificare le specie microbiche dominanti nelle matrici alimentari (Ercolini *et al.*, 2003).

L'analisi PCR-DGGE dei bulks cellulari dopo coltivazione può anche supportare l'analisi della diversità microbica negli alimenti dopo estrazione diretta del DNA. Può essere utile per capire quali specie ritrovate nei profili DGGE sono coltivabili e se c'è rispondenza o meno tra i risultati ottenuti

dalla PCR-DGGE dell'estrazione diretta del DNA e le specie rilevate in seguito a coltivazione (Ercolini, 2004).

## 2. SCOPO DEL LAVORO

E' ben noto che nella fermentazione dei mosti d'uva, la rapidità con cui il processo fermentativo viene avviato, la regolarità del suo andamento e il suo completamento sono fortemente influenzati dal tipo di lievito presente (Castelli, 1954; Zambonelli, 1998; Delfini, 1995). Inoltre, è altrettanto ben noto che le attività metaboliche del lievito, come la produzione di alcuni composti o la trasformazione di specifiche componenti del mosto o del vino, possono contribuire in maniera significativa alla definizione dell'aroma e delle caratteristiche di flavour del prodotto finito (Pretorius, 2000).

La diffusione crescente dell'uso dei lieviti selezionati, se da un lato presenta il vantaggio di un corretto avvio e prosieguo della fermentazione, ma anche una minore produzione di aromi indesiderati, dall'altro pone il problema del rischio di standardizzazione o di deriva della tipicità dei prodotti, legato all'uso di un numero limitato di ceppi, alcuni dei quali possono presentare problemi di adattamento alle diverse materie prime, inoltre, dal momento che per l'inoculo vengono impiegati ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae*, vengono a mancare tutte quelle attività che sono estranee a tale specie ma che possono essere possedute da altri lieviti che intervengono nella fermentazione naturale.

È opinione abbastanza diffusa tra gli operatori e i tecnici del settore enologico che la presenza e l'attività dei lieviti indigeni possono influenzare le caratteristiche di qualità e tipicità del vino prodotto, al punto che molti di essi non intendono rinunciare alla fermentazione spontanea ed al concorso di detti lieviti indigeni nell'intento di conseguire il risultato di un prodotto con caratteristiche distintive. Tuttavia, una tecnologia che prevede l'impiego corretto e mirato di lieviti autoctoni consente di ridurre od eliminare ogni intervento che prevede l'utilizzo di coadiuvanti ed additivi chimici, nel rispetto delle caratteristiche del mosto di partenza. In tale ambito, la possibilità di accertare inequivocabilmente ed agevolmente la ricorrenza di specie e biotipi di lieviti nei vari momenti del processo produttivo è di grande interesse.

L'obiettivo della presente tesi di dottorato è stato quello di verificare la praticabilità di un approccio molecolare per identificare e tipizzare i lieviti ricorrenti nelle diverse fasi di fermentazioni spontanee di alcuni vini rossi e bianchi dell'Italia Meridionale: il *Primitivo di Manduria*, vino rosso tipico della Puglia e il vino ottenuto dalle uve bianche di *Catalanesca*, proveniente dalla Campania, quale alternativa alle procedure microbiologiche convenzionali e come primo step in un programma di selezione di lieviti autoctoni, eventualmente capaci di esaltare le potenzialità di tipicità dei rispettivi vitigni considerati.

Sulla Catalanesca è doveroso soffermarsi, in quanto, quest'uva da mensa si produce da secoli sul versante nord del Vesuvio (nell'area compresa tra i comuni di Massa di Somma, Pollena Trocchia, Somma Vesuviana e S. Sebastiano al Vesuvio) e la sua trasformazione in vino è vietata proprio perché classificata da tavola, per cui le produzioni vinicole relative non sono commerciabili e sono destinate quasi esclusivamente all'autoconsumo. Nonostante la diversità delle lavorazioni artigianali, e quindi del prodotto finito, i contadini della zona riescono ad ottenere profumatissimi vini bianchi, con tutti i pregi ed i difetti che caratterizzano le produzioni artigianali. Da qui il crescente interesse nei confronti di questo vitigno con la richiesta di transizione di categoria e conseguente istanza di denominazione di origine controllata.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Protocolli di vinificazione**

Nel corso del presente lavoro, relativamente al Primitivo di Manduria, si è fatto riferimento ad una vinificazione industriale effettuata in occasione della vendemmia 2002 da un'azienda vinicola di Mugnano di Napoli (Napoli) con uve di Primitivo di Manduria selezionate in campo e rilevate, a cura della stessa azienda, nella zona d'origine; relativamente alla vinificazione della Catalanesca, invece, si è fatto riferimento ad una microvinificazione effettuata in occasione della vendemmia 2004 e condotta presso la Stazione di Microbiologia Industriale del Dipartimento di Scienza degli Alimenti della Facoltà di Agraria dell'Università di Napoli, facendo riferimento al tradizionale protocollo di vinificazione adoperato dai produttori locali.

Per entrambe le vinificazioni, il trasporto dell'uva è avvenuto in cassette, in maniera tale da evitare lo schiacciamento degli acini e la fuoriuscita del succo, e quindi prefermentazioni indesiderate. Le fasi successive di vinificazioni si sono poi diversificate.

Le uve di Primitivo di Manduria, arrivate in azienda, sono state sottoposte alla pigiadiraspatura, con la quale si consegue lo schiacciamento del frutto con fuoriuscita del succo dagli acini, e la contemporanea eliminazione dei

raspi. Il pigiato (mosto + bucce e vinaccioli) è stato poi trasferito con una pompa a pistoncini in un serbatoio verticale in cemento vetrificato, della capacità di 10 m<sup>3</sup> (adatti perciò a circa 100 quintali di materia prima). In detto serbatoio si è svolta la macerazione e la fermentazione alcolica, indotta dai lieviti indigeni. Allo scopo di garantire un andamento regolare di quest'ultima, si è effettuata la solfitazione, aggiungendo all'uva ammostata, subito dopo la pigiatura, anidride solforosa in forma di metabisolfito (6-7 grammi per quintale di uva impiegata). Come è noto, l'anidride solforosa assolve ad importanti funzioni:

- *Azione antisettica e disinfettante:* rivolta soprattutto verso i batteri lattici, i batteri acetici, le muffe e i lieviti apiculati che producono poco alcool, favorendo e stimolando invece lo sviluppo dei *Saccharomyces*.
- *Azione antiossidante:* svolta sulle sostanze coloranti del mosto che sono facilmente ossidabili; la loro ossidazione provoca, anche nei vini giovani, alterazioni del colore del vino.
- *Azione solubilizzante:* consente la dissoluzione delle sostanze coloranti, portando ad un vino più colorato e brillante.
- *Azione antiossidasica:* l'anidride solforosa distrugge gli enzimi responsabili della casse ossidasica.
- *Azione coagulante:* consiste nella capacità di coagulare e di far depositare numerose sostanze che si trovano nel mosto e che lo

intorbidiscono; queste potranno essere separate successivamente con i travasi, e il vino che si otterrà risulterà più limpido.

Nel corso della fermentazione alcolica, avvenuta ad una temperatura di circa 22-24 °C, per evitare fenomeni di ossidazione e favorire la dispersione di calore, si è proceduto con la rottura del cappello tramite il "rimontaggio". Tale operazione consiste nel prelevare, con l'ausilio di una pompa, la fase liquida del mosto presente nella parte bassa della vasca di fermentazione, e farla successivamente cadere sulla vinaccia in superficie, in modo che si abbia un'omogeneizzazione dell'intero sistema. Il rimontaggio è stato effettuato due volte al giorno.

Il mosto, ormai diventato vino, è stato sottoposto alla svinatura, durante la quale si ha la separazione della frazione solida, cioè delle vinacce, dal mosto o vino fiore. Quest'ultimo, uscito dalla bocca inferiore della vasca, è stato raccolto in una tinozza e da questa travasato, con una pompa, in un altro contenitore.

Le vinacce, invece, hanno subito una leggera torchiatura in presse pneumatiche, per estrarre la parte liquida che trattenevano. Dalla torchiatura si è ottenuto il mosto-vino che è stato addizionato al vino fiore, mentre le vinacce esaurite sono state inviate alla distilleria.

E' noto che con la svinatura termina, tecnologicamente, la fermentazione tumultuosa che lascia il posto alla fermentazione lenta, grazie alla quale si ha la trasformazione degli zuccheri residui in alcool e anidride carbonica.

Durante la fermentazione lenta, si inserisce un'altra fermentazione, di importanza non secondaria: la fermentazione malolattica ad opera di *Oenococcus oeni* o di altre poche specie di batteri lattici, responsabili della trasformazione dell'acido malico in acido lattico, che conferisce al vino un sapore meno aspro e più morbido.

Terminata la fermentazione lenta e con il diminuire della temperatura, si è effettuato un travaso, che consiste nel trasferimento del vino in un altro recipiente, seguito dall'eliminazione della parte fecciosa. Un primo travaso è stato eseguito all'inizio dell'inverno (verso metà o fine novembre); il secondo, al termine dell'inverno (gennaio, febbraio, marzo). Dopo il travaso, il vino è stato trasferito in serbatoi di acciaio inox, dove ha riposato per un certo periodo di tempo prima di essere imbottigliato.

Le uve di Catalanesca, invece, dopo la raccolta e la selezione delle uve migliori, sono state trasportate alla Stazione di Microbiologia Industriale del Dipartimento di Scienza degli Alimenti della Facoltà di Agraria dell'Università di Napoli, dove sono state sottoposte ad un processo di microvinificazione. In particolare si è proceduto con la diraspatura e la pigiatura e conseguente trasferimento del pigiato in contenitori sterilizzati per fermentazione. La lavorazione è stata condotta su 50 litri di mosto misto a vinacce. La fermentazione alcolica è stata affidata esclusivamente ai lieviti indigeni, senza alcun inoculo di starter commerciali ed è stata controllata e mantenuta ad una temperatura intorno ai 16-18 °C.

Allo scopo di garantire un andamento regolare della fermentazione e migliorare la qualità finale del vino si è effettuata una solfitazione, aggiungendo al pigiato anidride solforosa in forma di metabisolfito di potassio ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Dopo circa 5 giorni dall'inizio del processo si è proceduto alla separazione del mosto fiore dalle vinacce e per recuperare la parte liquida che ancora trattenevano, le vinacce sono state sottoposte ad una leggera pressatura. Il mosto-vino così ottenuto è stato separato dal vino fiore.

Al fine di evitare il contatto prolungato del vino con il suo deposito feccioso, che può portare alla formazione di sapori ed odori sgradevoli, è stato effettuato un primo travaso verso il 25° giorno dall'inizio della vinificazione, in occasione del quale è stata operata una solfitazione mediante l'aggiunta di  $3 \text{ g/hl}$  di metabisolfito di potassio al vino e un secondo travaso verso la metà di gennaio, quando, per azione del freddo, molte sostanze si erano depositate sul fondo del contenitore.

### 3.2 Raccolta dei campioni

Durante le varie fasi dei due processi di vinificazione descritti, sono stati prelevati dei campioni di mosto e vino, elencati nella tabelle che seguono.

**Tabella 1:** Campioni prelevati durante la vinificazione del Primitivo di Manduria

<b>N° Campione</b>	<b>Natura del Campione</b>
1	Mosto appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva.
2	Dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio
3	Dopo 48 ore (2 giorni), in seguito a rimontaggio
4	Dopo 72 ore (3 giorni), in seguito a rimontaggio
5	Dopo 96 ore (4 giorni), in seguito a rimontaggio
6	Vino fiore, dopo 5 giorni, in seguito a svinatura
7	Torchiato, allo stesso tempo del campione n. 6
8	Vino fiore + torchiato, dopo 6 giorni dall'inizio del processo
9	Vino al momento del secondo travaso, dopo 4 mesi

**Tabella 2:** Campioni prelevati durante la vinificazione dell'uva Catalanesca

<b>N° Campione</b>	<b>Natura del Campione</b>
1	Mosto appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva

2	Mosto dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio
3	Mosto fiore, dopo 5 giorni, in seguito a svinatura
4	Vino fiore al momento del primo travaso, dopo circa 25 giorni
5	Vino dopo 5 mesi dall'inizio della vinificazione.

Per le analisi microbiologiche i campioni sono stati raccolti asetticamente e disposti in due distinti contenitori sterili monouso da 250 ml. Considerando gli specifici scopi delle indagini, successivamente al prelievo, i campioni sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

Per le analisi chimiche, invece, condotte solo sui campioni di Catalanesca, essi sono stati raccolti in contenitori sterili da 1 l e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle analisi.

### **3.3 Isolamento, purificazione ed esame morfologico dei lieviti**

Per isolare i lieviti ricorrenti nelle diverse fasi della vinificazione del Primitivo di Manduria e della Catalanesca, sono state allestite diluizioni-sospensioni decimali (fino a  $10^{-6}$ ) dei diversi campioni, con le quali sono poi state inoculate, per inclusione e per spatolamento superficiale piastre di due diversi substrati nutritivi agarizzati: YPD (Yeast Peptone Destrose), che è un substrato di uso molto comune per l'isolamento dei lieviti, e Lysine medium (Morris e Eddy, 1957), che è stato utilizzato come mezzo selettivo

per il conteggio dei lieviti non-*Saccharomyces*; è infatti un mezzo sintetico che contiene glucosio, vitamine, sali inorganici e la lisina come unica fonte di azoto, che non è assimilata dai *Saccharomyces*. Questi ultimi sono incapaci di crescere su questo substrato, a differenza di tutte le altre specie associate alla vinificazione (Morris e Eddy, 1957).

La composizione e le modalità di preparazione e d'impiego dei substrati sono le seguenti:

<b>Yeast Peptone Dextrose Agar</b>	
<b>Componenti</b>	<b>g l<sup>-1</sup> di acqua distillata</b>
Glucosio	20
Peptone	10
Estratto di lievito	10
Agar	18

Di seguito è riportata la composizione del Lysine Medium della Sigma.

<b>Lysine Medium</b>	
<b>Componenti</b>	<b>g l<sup>-1</sup> di acqua distillata</b>
Destrosio	44.50
Potassio Fosfato monobasico	1.78
Magnesio Solfato	0.89

Calcio Cloruro	0.178
Sodio Cloruro	0.089
Adenina	0.00178
DL-Metionina	0.000891
L-Istidina	0.000891
DL-Triptofano	0.000891
Acido Borico	0.0000089
Zinco Solfato	0.0000356
Ammonio Molibdato	0.0000178
Manganese Solfato	0.0000356
Ferro Solfato oso	0.0002225
L-Lisina	1.00
Inositolo	0.02
Calcio Pantotenato	0.002
Aneurina	0.0004
Piridoxina	0.0004
Acido p-Amino Benzoico	0.0002
Acido Nicotinico	0.0004
Riboflavina	0.0002
Biotina	0.000002
Acido Folico	0.000001
Agar	17.80
pH	5.0 ± 0.2

Tale substrato viene preparato nel seguente modo:

- Sospendere 6.6 grammi di Lysine Medium (Sigma) in 100 ml di acqua distillata contenente 1 ml di una soluzione al 50% di lattato di potassio.

- Bollire fino a dissolvere completamente il mezzo.
- Raffreddare a 50°C
- Aggiustare il pH a 5.0 con una soluzione al 10% di acido lattico e porre in piastre Petri sterili.

Le piastre di YPD e di Lysine Agar sono state poi incubate a 28°C per cinque giorni.

Per l'ottenimento di colture pure (colonia singola e ben distinta dalle altre), dopo incubazione, da ciascuna piastra sono state prelevate colonie perfettamente isolate strisciandone piccole aliquote su piastre di DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol agar) per purificarle da eventuali schizomiceti associati (sensibili al cloramfenicolo). Il DRBC ha la seguente composizione:

<b>Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar</b>	
<b>Componenti</b>	<b>g l<sup>-1</sup> di acqua distillata</b>
Peptone	5
Destrosio	10
Potassio fosfato biacido	1,0
Magnesio solfato	0,5
Dichloran	0,002
Rose-Bengal	0,025
Agar	15
pH	5,6 ± 0,2

Il DRBC (Oxoid, CM 727 B) è basato sulla formulazione di King *et al.* (1979) ed è raccomandato come terreno selettivo per la ricerca ed il conteggio dei lieviti e delle muffe responsabili del deterioramento degli alimenti.

La purificazione è stata, generalmente, ripetuta più volte, e controllata con l'ausilio di osservazioni microscopiche.

Le colture purificate sono state conservate su Agar-Malto solidificato a becco di clarino.

Di seguito è riportata la composizione dell'Agar Malto.

<b>Agar Malto</b>	
<b>Componenti</b>	<b>g l<sup>-1</sup> di acqua distillata</b>
Estratto di malto	3
Estratto di lievito	5
Peptone batteriologico	5
Glucosio	10
Agar	18

Ai fini di una maggiore selettività del substrato, prima della sterilizzazione dello stesso a 121°C per 15 minuti, si è proceduto ad una sua acidificazione, con HCl, fino ad arrivare ad un valore di pH di 5.5.

Le colture di lievito cresciute su Agar-Malto sono state conservate a temperatura ambiente e ritrapiantate ogni due mesi circa.

Per determinare la morfologia cellulare dalle colture in Agar Malto sono stati effettuati trapianti su Yeast Morphology Agar Difco. Queste ultime colture, dopo almeno quattro settimane di conservazione a temperatura ambiente, sono state utilizzate per l'allestimento di preparati a fresco e l'osservazione in contrasto di fase con obiettivo ad immersione. I preparati sono stati fotografati e, con la stessa combinazione occhio-obiettivo, è stata ripresa la scala del micrometro obiettivo, al fine di poter effettuare agevoli determinazioni delle dimensioni delle cellule.

### **3.4 Estrazione del DNA dai ceppi isolati**

L'estrazione del DNA dai ceppi isolati di entrambe le vinificazioni, è stata condotta seguendo il protocollo suggerito dai laboratori Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories S.r.l., via Cellini, 18/A, 20090 Segrate – Milano ) e richiedente l'utilizzo di una particolare matrice, chiamata InstaGene<sup>TM</sup> Bio-Rad Matrix.

Il metodo consente di ottenere, in maniera semplice e veloce, del DNA utilizzabile in esperimenti di Polymerase Chain Reaction (PCR), eliminando tutti quei laboriosi step che prevedono purificazione mediante fenolo / cloroformio.

Il protocollo prevede le seguenti fasi:

1. Prelevare una colonia isolata e risospenderla in 1 ml di acqua distillata sterile, utilizzando una provetta Eppendorf da 1,5 ml;

2. Centrifugare per 1 minuto a 12.000 rpm e rimuovere il surnatante;
3. aggiungere al pellet 200  $\mu$ l di InstaGene<sup>TM</sup> Bio-Rad Matrix ed incubare a 56 °C per 20 minuti in bagnomaria;
4. Agitare per 10 secondi su vortex;
5. Incubare a 100 °C per 8 minuti in bagnomaria;
6. Agitare per 10 secondi su vortex;
7. Centrifugare nuovamente per 2-3 minuti a 12.000 rpm.

Seguendo tale procedura, il surnatante ottenuto contiene il DNA dei ceppi microbici da sottoporre a PCR e può essere conservato per ulteriori amplificazioni a -20 °C.

Quindi, per ottenere il DNA genomico d'interesse, una semplice lisi cellulare mediante boiling in presenza della InstaGene<sup>TM</sup> Bio-Rad Matrix è sufficiente, in quanto la matrice adsorbe efficientemente i prodotti della lisi cellulare che possono interferire con il processo di amplificazione mediante PCR.

### **3.5 Reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)**

Negli ultimi anni si è assistito ad un fiorire continuo di metodologie molecolari che hanno affiancato ed in parte soppiantato le tecniche "classiche". In particolare, le tecniche basate sulla PCR si sono rivelate un

mezzo estremamente veloce ed efficace per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei microrganismi.

Sfruttando la reazione a catena della DNA-polimerasi, la PCR permette l'amplificazione selettiva di una piccola regione genomica delimitata da due brevi sequenze specifiche.

Dopo aver denaturato il DNA, si fanno riassociare i filamenti singoli in presenza di un eccesso di due oligonucleotidi sintetici, detti “primers”, che rappresentano le sequenze delimitanti la regione che si vuole amplificare.

Dato l'eccesso molare degli oligonucleotidi, i filamenti di DNA si riassociano, in idonee condizioni di temperatura, quasi esclusivamente con i due oligonucleotidi, piuttosto che tra di loro. Gli oligonucleotidi devono essere tali che i loro estremi 5' restino esterni, cioè che i loro estremi 3' fungano da innesco a partire dal quale la DNA-polimerasi può sintetizzare un filamento di DNA complementare su ognuno dei due filamenti originali.

La DNA-polimerasi comunemente utilizzata è la *Taq*-polimerasi, un enzima estratto da un microrganismo termofilo: *Thermus aquaticus*. L'enzima è caratterizzato da un'elevata termostabilità, proprietà che gli permette di esplicare la sua azione nonostante le alte temperature (90-95 °C) che si raggiungono al momento della denaturazione della doppia elica e che, normalmente, denaturano gli enzimi stessi. La resistenza dell'enzima alla degradazione termica evita l'aggiunta di una nuova polimerasi dopo ogni

ciclo di denaturazione, consentendo di automatizzare il processo di amplificazione in cicli ripetitivi. Gli step che si susseguono sono:

- Denaturazione ad elevate temperature;
- Riconoscimento e ibridazione dei primers con le rispettive sequenze complementari;
- Polimerizzazione ad opera della *Taq*-polimerasi.

La temperatura di annealing, ovvero di ibridazione, è di importanza fondamentale per la stringenza della reazione. Maggiore è tale temperatura, più elevata sarà la specificità del riconoscimento tra primer e sequenza, riducendo al minimo gli appaiamenti aspecifici degli oligonucleotidi e la formazione casuale di strutture secondarie.

Come tutte le DNA-polimerasi, anche la *Taq*-polimerasi:

- riconosce come substrato solo 5' -desossiribonucleotidi trifosfato;
- sintetizza solo un filamento complementare ad uno "stampo" a singola elica ;
- non inizia la sintesi del nuovo filamento se non è presente un primer, ossia un oligonucleotide che funga da innesco e che, legato al filamento stampo, presenti un gruppo 3'-OH libero sul nucleotide terminale;
- esegue la sintesi di nuovo DNA solo nella direzione 5'- 3'.

Il numero di copie ottenute dall'amplificazione è:

$$N=2^n$$

dove n = numero di cicli. Questa formula è valida solo in condizioni ideali, cioè imponendo una resa del 100%, ma ciò è ottenibile solo nei primi cicli della reazione, mentre, successivamente per la formazione di sottoprodotti, tale resa diminuisce, fino a divenire non accettabile per  $n > 35$ . la resa di un'amplificazione generalmente si aggira intorno a valori di 80-85%, e il numero di copie è quindi calcolabile attraverso una nuova espressione matematica:

$$N = (1+R)^n$$

dove n = numero di cicli; R = resa.

I cicli di denaturazione, ibridazione e polimerizzazione possono essere reiterati in una macchina programmata per compiere queste operazioni, detta termocicizzatore, che consiste in una celletta termostata che viene ritmicamente riscaldata per denaturare il DNA e raffreddata per permettere l'appaiamento di questo con i primer e la copia del filamento.

Nel presente lavoro la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata applicata ad entrambe le vinificazioni in studio ed è stata eseguita nell'ambito di due diversi metodi molecolari:

- ✓ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
- ✓ Amplificazione del 26S rDNA.

### **3.6 Analisi RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

La tecnica RAPD può essere considerata come una modificazione della PCR classica, dal momento che offre la possibilità di amplificare delle sequenze anonime, random, di DNA, utilizzando un solo oligonucleotide come innesco per la *Taq*-polimerasi, al posto di primers targhettanti specifiche regioni del DNA. L'amplificazione è resa possibile dal fatto che la reazione viene effettuata in condizioni di bassa stringenza, cioè ad una temperatura di appaiamento del primer molto bassa. In tal modo, le molecole del primer possono appaiarsi anche a sequenze di DNA non esattamente complementari alla propria e potranno perciò innescare la reazione di polimerizzazione da parte della *Taq*-polimerasi in più punti del genoma bersaglio. In questo modo, alla fine della reazione di amplificazione si otterrà non un singolo frammento amplificato, ma una serie di frammenti, il cui numero e la cui lunghezza potrà variare da ceppo a ceppo. Il sistema, che non prevede alcuna conoscenza della sequenza bersaglio, si è rivelato di una semplicità operativa, di una sensibilità e specificità tali che queste metodologie sono state utilizzate per tipizzare una quantità imponente di ceppi di lieviti.

Il primer utilizzato per l'amplificazione random è l' XD 5, la cui sequenza è:

**XD 5: 5'-CTGGCGGCTG-3'**

La miscela di reazione, del volume finale di 25  $\mu\text{l}$ , è stata preparata in una provetta da 200  $\mu\text{l}$  e mostra la composizione riportata nella tabella seguente.

<b>Componenti</b>	<b>Sol. Stock</b>	<b>Conc. in reazione</b>	<b>Quantità in reazione</b>
DNA templatato			2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile			17.6 $\mu\text{l}$
Buffer <i>Taq</i> -Polimerasi	10 X	1 X	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM	1.25 $\mu\text{l}$
Mix dNTP	10 mM (ciascuno)	0.4 mM(ciascuno)	1 $\mu\text{l}$
<i>Taq</i> Polimerasi	5 U/ $\mu\text{l}$	2.5 U/25 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$
Primer XD 5	0.180 mM	0.00108 mM	0.15 $\mu\text{l}$

I cicli di amplificazione sono stati effettuati con l'ausilio di un termocicizzatore (PTC-100 MJ-Research Inc., Watertown, MA; USA) dotato di controllo rapido della temperatura.

Il programma di amplificazione, nominato COC 2, prevede un iniziale ciclo di denaturazione a 94 °C per 1 minuto, seguito da complessivi 40 cicli di amplificazione, ciascuno comprendente i seguenti step:

- 94 °C per 1 minuto
- 31 °C per 1 minuto

➤ 72 °C per 7 minuti

I cicli vengono quindi conclusi con un trattamento termico a 72 °C per 7 minuti per ottenere l'estensione finale. La comparazione dei patterns ottenuti dall'amplificazione RAPD è stata possibile grazie ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

### **3.7 Amplificazione del 26S rDNA**

La tipizzazione molecolare basata sul polimorfismo del DNA che codifica per l'rRNA si è rivelata molto utile come tecnica tassonomica, dal momento che gli rDNA hanno sequenze altamente conservate in tutti gli organismi, ed altre sequenze, dette regioni ipervariabili, che sono uniche e presentano una certa variabilità in particolari organismi o in gruppi di organismi comunque correlati (Grimont e Grimont, 1986).

Negli ultimi anni, studi compiuti sugli operoni dell'rRNA, ovvero sui geni codificanti per gli RNA ribosomiali organizzati in unità trascrizionali (Jensen *et al.*, 1993), hanno consentito lo sviluppo di tecnologie rapide, efficaci e convenienti, che permettono di evidenziare l'eterogeneità inter- e intra-specifica (Moschetti *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001).

L'rDNA è quindi considerato una sorta di orologio molecolare dell'evoluzione, che consente una valutazione accurata dei livelli di similarità e delle relazioni evolutive tra i vari gruppi di microrganismi, e

cioè delle distanze filogenetiche tra loro esistenti (Stainer *et al.*, 1988; Dellaglio *et al.*, 1998).

Un'ampia varietà di specie di lieviti sono state differenziate attraverso l'analisi di parziali sequenze della larga subunità dell'rDNA, grazie al fatto che, nonostante costituisca una regione genomica altamente conservata, il 26S rDNA contiene dei domini variabili che consentono una differenziazione a livello di specie (Kurtzman e Robnett, 1998). In questo studio è stata utilizzata la regione comprendente i domini variabili D1 e D2. La porzione che è stata amplificata e quindi sottoposta a sequenziamento diretto, è di circa 580 bp e il set di primer utilizzato è di seguito riportato:

**Forward primer NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'**

**Reverse primer NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'**

La miscela di reazione, del volume finale di 50  $\mu$ l, è stata preparata in una provetta da 200  $\mu$ l e mostra la composizione riportata in tabella:

<b>Componenti</b>	<b>Sol. Stock</b>	<b>Conc. in reazione</b>	<b>Quantità in reazione</b>
DNA template			2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidistillata sterile			39.3 $\mu$ l

Buffer <i>Taq</i> - Polimerasi	10 X	1 X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM	2.5 $\mu$ l
Mix dNTP	25 mM (ciascuno)	250 $\mu$ M (ciascuno)	0.5 $\mu$ l
<i>Taq</i> Polimerasi	5 U/ $\mu$ l	2.5 U/50 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Primer NL1	0.1 mM	0.2 $\mu$ M	0.1 $\mu$ l
Primer NL4	0.1 mM	0.2 $\mu$ M	0.1 $\mu$ l

Anche in questo caso i cicli di amplificazione sono stati effettuati impiegando il termocicizzatore PTC-100 della MJ-Research Inc., Watertown, MA, USA, dotato di controllo rapido della temperatura.

Il programma di amplificazione, nominato LIEV 1, ha previsto un iniziale ciclo di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguito da complessivi 30 cicli di amplificazione, ciascuno comprendente i seguenti step:

95°C per 1 minuto

52°C per 45 secondi

72°C per 1 minuto

I cicli sono stati quindi conclusi con un trattamento a 72°C per 7 minuti per favorire l'estensione finale.

### **3.8 Elettroforesi su gel di agarosio**

Per la rilevazione del DNA amplificato è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio, in cui avviene una migrazione dei

frammenti di DNA per effetto di un campo elettrico e quindi una loro separazione in base al peso molecolare. Il gel, infatti, può essere paragonato ad una rete molecolare attraverso le cui maglie migrano le macromolecole. Il DNA, carico negativamente per la presenza di gruppi fosfato, migrerà, per effetto del campo elettrico applicato, verso il polo positivo con una velocità che è funzione del peso molecolare. La relazione tra velocità di migrazione e peso molecolare non è però lineare; la velocità è inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare (cioè alla lunghezza) dei frammenti. Più grossa è la molecola, maggiore sarà la resistenza opposta dalle maglie del gel e, quindi, più lenta sarà la migrazione.

La corsa elettroforetica e il gel di agarosio sono stati preparati con tampone TBE 1X (Tris-borato), preparato a partire dal 10X contenente Tris-HCl 1,0 M (potente tampone tra pH 7 e 9), acido borico 0,9 M (per la forza ionica) ed EDTA 0,01 M (agente che complessa gli ioni bivalenti, importanti cofattori delle DNasi).

Il gel per la corsa elettroforetica è stato preparato a 1,5% di agarosio (peso/volume) sia per gli amplificati RAPD che per quelli del 26S; ad esso è stato aggiunto il bromuro di etidio come tracciante. Questa sostanza ha la capacità di legarsi al DNA, intercalandosi nella doppia elica, e di emettere luce arancione se colpita dai raggi UV di un trans-illuminatore. In questo modo gli amplificati possono essere facilmente visibilizzati e le immagini

possono essere acquisite tramite un apposito analizzatore d'immagini collegato al transilluminatore.

Nei pozzetti, formati nel gel a mezzo di un pettine, sono stati caricati il marker dei pesi molecolari 1-Kb Ladder Plus (Invitrogen) ed i campioni amplificati. Questi ultimi, prima di essere caricati nel gel, sono stati addizionati di una soluzione colorante (quantità pari a 1 $\mu$ l ogni 6 $\mu$ l di campione) contenente il 40% di saccarosio, con funzione di aumentare il peso specifico dei campioni e quindi facilitarne il caricamento, e di 0,25% di blu di bromofenolo che, in qualità di colorante permette, invece, la visualizzazione dei campioni durante la corsa. La corsa stessa è avvenuta con l'applicazione di un voltaggio, dal polo negativo al positivo, pari a 100 V, ed è stata condotta per circa 4 ore per gli amplificati RAPD, per circa 45 minuti per quelli del 26S. Le bande migrate sui gel sono state visualizzate con un transilluminatore UV e successivamente fotografate.

### **3.9 Purificazione e sequenziamento del DNA**

Dopo rivelazione, l'rDNA 26S amplificato è stato purificato. Allo scopo è stato utilizzato il kit QIA quick PCR PURIFICATION KIT (50) della QUIAGEN.

Il protocollo indicato dal produttore del kit prevede i seguenti step:

1. aggiungere 5 volumi di buffer PB a 1 volume di campione PCR e miscelare.
2. Riporre il campione con il buffer nelle colonnine QIAquick.
3. Centrifugare per 60 secondi a 14000 rpm e rimuovere accuratamente il surnatante.
4. Lavare aggiungendo 750 µl di buffer PE, centrifugare e rimuovere il surnatante come al punto 3.
5. Centrifugare e rimuovere nuovamente il surnatante come al punto 3.
6. Trasferire le colonnine in nuovi eppendorf da 1,5 ml.
7. Per eluire il DNA, aggiungere 50 µl H<sub>2</sub>O al centro della membrana della colonnina e centrifugare per 1 minuto a 14000 rpm.
8. Allontanare la colonnina e conservare il DNA purificato contenuto negli eppendorf.

La quantificazione del DNA eluito è stata ottenuta per co-elettroforesi con il marker Lambda Hind III (Promega) comparando l'intensità delle bande purificate con l'intensità delle bande del marker a concentrazione nota. Una quantità pari a circa 35 ng di purificato (6 ng/100 bp) è stata inviata al Laboratorio Genoma Vegetale dell'ENEA di Roma, che ha provveduto al sequenziamento del frammento di interesse mediante il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988). In questo modo è stata ottenuta una sequenza nucleotidica di circa 580 paia di basi che è stata comparata con quelle riportate in letteratura e depositate alla GeneBank del National Center of

Biotechnology Information, avvalendosi del programma BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

### **3.10 Applicazione della tecnica PCR-DGGE**

Il monitoraggio delle popolazioni di lievito ricorrenti nella vinificazione della Catalanesca, oltre al sequenziamento del 26S rDNA, ha anche previsto l'applicazione della tecnica PCR-DGGE, effettuata sia sulle sospensioni "bulk" che direttamente sui campioni di mosto, previa estrazione del DNA.

### **3.11 Estrazione del DNA dalle sospensioni "Bulk"**

La preparazione delle sospensioni "bulk" è stata realizzata partendo dalle ultime piastre contabili (cioè le piastre contabili alle diluizioni più spinte): tutte le colonie, presenti sulla superficie di ciascuna piastra, sono state sospese in un opportuno volume di acqua sterile, raccolte con una pipetta sterile e conservate in provetta a -20 °C.

Al momento dell'estrazione si è proceduto a scongelare le sospensioni e a vortexarle, quindi si è trasferito un volume pari a 100  $\mu$ l di esse in un'altra provetta sterile. Il protocollo eseguito è stato lo stesso di quello utilizzato per l'estrazione del DNA dai ceppi isolati.

### **3.12 Estrazione del DNA dai campioni di mosto “Tal quali”**

Prima di utilizzare l'analisi PCR-DGGE, è stato necessario applicare un metodo di estrazione e purificazione di DNA che eliminasse polifenoli e polisaccaridi presenti nell'uva, che, legandosi al DNA, interdicano la PCR (Wilson, 1997). L'analisi molecolare del DNA dai campioni “Tal quali” richiede, per le metodiche molecolari adoperate, che il metodo di estrazione produca del DNA libero da inibitori, e che possa essere quanto più rappresentativo dei microrganismi presenti nel campione (Yeates & Gillings, 1998). Per raggiungere tale scopo è stato utilizzato il protocollo di estrazione del DNA descritto da Cocolin *et al.* (2001), che prevede le seguenti fasi:

- 1) Prelevare 2 ml di campione, dopo averlo vortexato
- 2) Centrifugare a 15,000 x g per 10 min a 4 °C. Eliminare il surnatante
- 3) Risospendere il pellet in 1 ml di una soluzione 8 g/l NaCl e agitare
- 4) Centrifugare a 15,000 x g per 10 min. Eliminare il surnatante
- 5) Aggiungere 0.3 g di biglie di vetro di 0.5 mm di diametro e trasferire il tutto in vials
- 6) Aggiungere alla miscela cellule/biglie 300  $\mu$ l di breaking buffer [2% Triton X-100, 1% SDS; 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8; 1mM EDTA pH 8] e 300  $\mu$ l di cloroformio/alcool isoamilico (24:1)

- 7) Omogeneizzare in bead beater (Fast Prep<sup>TM</sup>, Bio 101, USA) per tre volte, ciascuna di 45 secondi alla velocità di 4,5, intervallate da una sosta di 30 sec.
- 8) Centrifugare a 15,000 x g per 10 min a 4°C
- 9) Trasferire la fase acquosa in un eppendorf sterile

Dopo centrifugazione, 250 µl del surnatante (fase acquosa) sono stati prelevati e impiegati per la successiva fase di purificazione del DNA usando il Dneasy Plant System (Qiagen, Qiagen Italia, Milan, Italy), seguendo le istruzioni riportate sul manuale.

***Protocollo purificazione del DNA con DNeasy Plant Mini Kit:***

1. Aggiungere ai 250 µl di fase acquosa 400 µl di Buffer AP1 e 4 µl di RnaseA dalle soluzioni stock (100 mg/ml)
2. Incubare la miscela per 10 min a 65°C. Miscelare durante l'incubazione 2-3 volte capovolgendo l'eppendorf
3. Aggiungere al lisato 130 µl di Buffer AP2, miscelare, e incubare per 5 min nel congelatore
4. Trasferire il campione con il buffer nelle colonnine QIAshredder posta su un tubo fornito dal kit e centrifugare per 2 min a 14000 rpm
5. Trasferire il filtrato in un nuovo eppendorf senza i frammenti di cellule precipitati

6. Aggiungere 1.5 volumi di Buffer AP3/E per chiarificare il lisato e miscelare pipettando
7. Trasferire 650  $\mu$ l della miscela dello step 6, compreso il precipitato che potrebbe essersi formato, sulla colonnina Dneasy Mini Spin posta su un tubo fornito dal kit. Centrifugare per 1 min a 9000 rpm ed eliminare il filtrato
8. Ripetere lo step 7 con il rimanente campione. Eliminare il filtrato e il tubo
9. Porre la colonnina Dneasy Mini Spin in un nuovo tubo da 2 ml fornito, aggiungere 500  $\mu$ l di Buffer AW sulla colonnina Dneasy Mini Spin e centrifugare per 1 min a 9000 rpm. Eliminare il filtrato e riutilizzare il tubo fornito nello step 10.
10. Aggiungere 500  $\mu$ l di Buffer AW sulla colonnina Dneasy Mini Spin e centrifugare per 2 min a 14000 rpm per asciugare la membrana.
11. Trasferire la colonnina Dneasy Mini Spin su un eppendorf e aggiungere direttamente sulla membrana Dneasy 50  $\mu$ l di Buffer TAE. Incubare per 5 min a temperatura ambiente e poi centrifugare per 1 min a 8000 rpm
12. Ripetere lo step 11

Questo metodo di purificazione permette di ottenere DNA di qualità estratto dai diversi campioni di mosto in fermentazione da essere utilizzato come template nelle reazioni di amplificazione PCR.

### **3.13 Amplificazioni PCR del DNA dei campioni tal quali e delle sospensioni bulk per l'analisi DGGE**

Il DNA estratto direttamente dai campioni di mosto nelle varie fasi della fermentazione e quello proveniente dalle sospensioni bulk è stato sottoposto ad amplificazione PCR mediante l'utilizzo di due set di primer.

E' stata amplificata la regione 26S rDNA comprendente i domini variabili D1/D2, che è di circa 250 bp (Cocolin *et al.* 2000) e la coppia di primer che è stata utilizzata è di seguito riportata:

#### **Forward primer NL1**

5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

#### **Reverse primer LS2**

5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3'

La miscela di reazione, per l'amplificazione del DNA estratto dai bulk cellulari e dai campioni tal quali, del volume finale di 50 µl, mostra la composizione riportata in tabella:

<b>Componenti</b>	<b>Sol. Stock</b>	<b>Concentrazione in reazione</b>	<b>Quantità in reazione</b>
DNA templato	-	-	5 $\mu$ l
Buffer 10X	10 X	1 X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM	2.5 $\mu$ l
Mix dNTP	25 mM (ciascuno)	250 $\mu$ M (ciascuno)	0.5 $\mu$ l
<i>Taq</i> Polimerasi	5 U/ $\mu$ l	2.5 U	0.5 $\mu$ l
Primer NL1	0.1 mM	0.2 $\mu$ M	0.1 $\mu$ l
Primer LS2	0.1 mM	0.2 $\mu$ M	0.1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O sterile	-	-	a 50 $\mu$ l

Anche in questo caso i cicli di amplificazione sono stati effettuati impiegando il termocicizzatore PTC-100 della MJ-Research Inc., Watertown, MA, USA, dotato di controllo rapido della temperatura.

Il programma di amplificazione, nominato LIEV 1, ha previsto un iniziale ciclo di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguito da complessivi 30 cicli di amplificazione, ciascuno comprendente i seguenti step:

- 95°C per 1 minuto
- 52°C per 45 secondi
- 72°C per 1 minuto

I cicli sono stati quindi conclusi con un trattamento a 72°C per 7 minuti per favorire l'estensione finale.

E' stata amplificata anche un'altra porzione del gene ribosomiale 26S e sottoposta a DGGE con il set di primer di seguito riportato:

**Forward primer 403F**

5'-GTGAAATTGTTGAAAGGGAAA -3'

**Reverse primer 662R**

5'-GACTCCTTGGTCCGTGTT -3'

Il primo primer si appaia al 26S di *S. cerevisiae* alle posizioni da 403 a 422 e il secondo da 645 a 662 (Sandhu *et al.*, 1995).

La miscela di reazione, per l'amplificazione del DNA estratto dai bulk cellulari e dai campioni tal quali, del volume finale di 50 µl, è stata preparata in una provetta da 200 µl e mostra la composizione riportata in tabella:

<b>Componenti</b>	<b>Sol. Stock</b>	<b>Concentrazione in reazione</b>	<b>Quantità in reazione</b>
DNA template	-	-	5 µl
Buffer 10X	10 X	1 X	5 µl

MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM	2.5 µl
Mix dNTP	25 mM (ciascuno)	250 µM (ciascuno)	0.5 µl
<i>Taq</i> Polimerasi	5 U/µl	2.5 U	0.5 µl
Primer 403F	0.1 mM	0.2 µM	0.1 µl
Primer 662R	0.1 mM	0.2 µM	0.1 µl
ddH <sub>2</sub> O sterile	-	-	a 50 µl

---

I cicli di amplificazione sono stati effettuati impiegando il termocicizzatore PTC-100 della MJ-Research Inc., Watertown, MA, USA, dotato di controllo rapido della temperatura.

Il programma di amplificazione, nominato 403'662 Touch Fungi, ha previsto un iniziale ciclo di denaturazione a 94°C per 5 min, seguito da:

- 10 cicli di amplificazione ciascuno comprendente i seguenti step:
  - 94°C per 30 sec
  - 60°C per 1 min
  - 72°C per 2 min

Con lo scopo, poi, di incrementare la specificità dell'amplificazione e ridurre la formazione di impurità dai prodotti, è stata realizzata una "touchdown" PCR (Muyzer *et al.*, 1993). La temperatura iniziale di annealing era di 60 °C per 1 min ed è stata diminuita di 1°C ad ogni ciclo per 10 cicli.

- 20 cicli di amplificazione ciascuno comprendente i seguenti step:
  - 94°C per 30 sec
  - 50°C per 1 min
  - 72°C per 2 min

I cicli sono stati quindi conclusi con un trattamento a 72°C per 7 minuti per favorire l'estensione finale.

Aliquote dei prodotti amplificati sono state testate mediante elettroforesi convenzionale su gel d'agarosio al 1.8 % (peso/volume).

### **3.14 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

La DGGE è basata sulla mobilità elettroforetica di molecole di DNA a doppio filamento in un gradiente linearmente crescente di agenti denaturanti chimici, (formammide ed urea) e fisici (temperatura). Durante la corsa elettroforetica il frammento procede attraverso il gradiente del gel raggiungendo la posizione in cui la concentrazione degli agenti denaturanti eguaglia la temperatura di *melting* del suo più basso *dominio di melting*, causando la sua denaturazione e il conseguente ritardo marcato della sua mobilità elettroforetica (Fodde e Losekoot, 1996).

Un *dominio di melting* è una regione all'interno del frammento in cui tutte le paia di basi fondono, approssimativamente, alla stessa temperatura. La *temperatura di melting* ( $T_m$ ) è definita come quella temperatura alla quale ogni paia di basi, di un DNA a doppia elica, è in perfetto equilibrio tra lo

stato singolo e quello di doppia elica. Dal momento che le interazioni tra le basi adiacenti hanno un'influenza significativa sulla stabilità della doppia elica, la  $T_m$  di alcune molecole di DNA è ampiamente dipendente dalla sequenza nucleotidica. Quando frammenti di DNA, differenti per variazioni di un singolo nucleotide nel loro dominio di melting più basso, sono analizzati attraverso DGGE, deviazioni e conseguenti ritardi della loro mobilità elettroforetica si avranno a differenti posizioni lungo il gel, causando la loro separazione (Myers *et al.*, 1987).

Nelle condizioni sperimentali sopra descritte la DGGE può risolvere solo una limitata frazione di tutti i possibili punti di mutazione. La maggior parte dei frammenti di DNA, di approssimativamente 300-500 bp, comprenderà più di un dominio di melting. Variazioni di basi localizzate all'interno del più alto dominio di  $T_m$  non saranno rilevate mediante DGGE, a causa di una perdita di migrazione dipendente dalla sequenza. Il problema può essere risolto introducendo, nel frammento da analizzare, un dominio ricco in GC (*GC-clamp*) tra quelli alti della  $T_m$  che darà una completa dissociazione del doppio filamento di DNA (Myers *et al.*, 1985). Dal momento che un GC-clamp è lungo solo 40 bp esso può, efficientemente, servire come dominio di alta  $T_m$ , per l'analisi della maggior parte dei frammenti di DNA. Uno dei due primer PCR, usato per amplificare la sequenza di DNA target, può essere realizzato con una coda 5'GC clamp, così che essa sarà incorporata ad una delle estremità dei risultanti prodotti PCR (Sheffield *et al.*, 1989).

L'introduzione del GC-clamp aumenta la percentuale, portandola quasi al 100%, delle mutazioni rilevabili mediante DGGE (Myers *et al.* 1985).

### **3.15 Protocollo DGGE**

Da un punto di vista metodologico la DGGE consiste in una elettroforesi verticale, dove le molecole di DNA migrano attraverso una concentrazione crescente in modo lineare di agenti denaturanti (formammide e urea). I gel a gradiente denaturante sono fatti di poliacrilammide e creati con convenzionali generatori di gradiente. Allo scopo di ottenere una riproducibilità delle corse elettroforetiche la DGGE viene effettuata, generalmente, ad una temperatura costante di 60 °C. Quest'ultima è stata scelta per eccedere la  $T_m$  di un frammento di DNA ricco in AT, in assenza di agenti denaturanti. Applicazioni specifiche possono, comunque, richiedere temperature oltre i 60 °C. Per esempio, per sequenze ricche in GC possono essere impiegate temperature superiori a 75°C (Harteveld *et al.*, 1996). Per assicurare il mantenimento uniforme e costante della temperatura scelta durante l'elettroforesi, il gel è messo in una vaschetta, sommerso con buffer per elettroforesi e tenuto alla temperatura desiderata mediante un termostato che combina il riscaldamento all'agitazione.

## Reagenti

La seguente lista include tutte le sostanze chimiche e le soluzioni necessarie per creare i gel e far avvenire la corsa DGGE:

- **Soluzione stock al 40% di acrilamide/bis (37,5:1 acrilamide:bis-acrilamide):**

si sciolgono 38,93 g di acrilamide e 1,07 g di bis-acrilamide in acqua deionizzata, successivamente si porta a volume (100 ml). Il tutto viene filtrato attraverso un filtro da 0,45  $\mu$ m e conservato in bottiglia scura a 4°C.

- **Buffer TAE 50X**

Reagente	Quantità	Concentrazione finale
Tris base	242,0 g	2M
Acido acetico glaciale	57,1 ml	1M
0,5 M EDTA pH 8.0	100.0 ml	50 mM
dH <sub>2</sub> O	fino a 1000,0 ml	

Miscelare, autoclavare e conservare a temperatura ambiente.

Per separare frammenti di lunghezza tra le 200 e le 400 bp, come nel nostro caso, viene suggerito di preparare un gel all'8 % di acrilammide/ bis-acrilamide; le soluzioni sono così composte:

- **Soluzione denaturante allo 0%**

Reagente	Gel all' 8% di poliacrilamide
Acrilamide/Bis 40%	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml
dH <sub>2</sub> O	78 ml
Volume totale	100 ml

Degasare per 10-15 minuti. Filtrare attraverso un filtro di 0,45  $\mu$ m di diametro. Conservare a 4 °C in bottiglia scura al massimo per 1 mese.

- **Soluzione denaturante al 100%**

Reagente	Gel allo 8% di poliacrilammide
Acrilamide/Bis 40%	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml
Formammide (deionizzata)	40 ml
Urea	42 g
dH <sub>2</sub> O	fino a 100 ml

Degasare per 10-15 minuti. Filtrare attraverso un filtro di 0,45  $\mu$ m di diametro. Conservare a 4 °C in bottiglia scura al massimo per 1 mese.

La soluzione al 100 % di denaturante deve essere ridisciolta dopo ogni stoccaggio a 4 °C per la formazione di cristalli di urea.

- **Ammonio persolfato al 10%**

Reagenti	Quantità
Ammonio persolfato	0,1 g
dH <sub>2</sub> O	1,0 ml

Conservare a -20 °C per massimo una settimana.

- **Colorante Gel Loading 2X**

Reagenti	Quantità	Conc. finale
2% blu di bromoenolo	0,25 g	0,5%
100% glicerolo	7 ml	70%
dH <sub>2</sub> O	2,75 ml	

- **Buffer TAE 1X per la corsa elettroforetica**

Reagenti	Quantità
Buffer TAE 50X	140 ml
dH <sub>2</sub> O	6.860 ml
Volume totale	7.000 ml

### **3.16 Analisi DGGE**

I prodotti PCR, ottenuti con i due set di primer e derivanti sia dalle sospensioni bulk che dai campioni di mosto, sono stati analizzati mediante DGGE usando un apparato Dcode Universal Mutation Detection System (Bio – Rad, Hercules CA 94547 USA). I campioni sono stati caricati nel gel di poliacrilammide all'8%, con un gradiente denaturante nella direzione della corsa elettroforetica, ed immersi in tampone TAE 1X. Il gradiente utilizzato variava dal 20 al 50%. La separazione degli ampliconi è proceduta ad una temperatura costante di 60°C per 4 ore a 200 Volts. Dopo la corsa i gel sono stati “colorati” per 5 minuti in bromuro di etidio e successivamente decolorati per 20 minuti in acqua deionizzata, quindi sono stati visualizzati ad un transluminatore a raggi UV e fotografati.

### **3.17 Caratterizzazione tecnologica dei ceppi**

Esperimenti di microvinificazione su alcuni ceppi isolati nel corso della vinificazione dell'uva Catalanesca, sono stati effettuati al fine di valutare il loro differente comportamento sulla base della maggiore o minore attitudine alla fermentazione. I ceppi, riportati nella tabella che segue, sono stati caratterizzati e confrontati per proprietà fisiologiche interessanti ed utili ai fini di un'eventuale selezione di starter per fermentazione vinaria: il potere e il vigore fermentativo.

<b>Isolato</b>	<b>Pattern RAPD</b>	<b>Specie</b>
1Y32a	B	<i>Candida stellata</i>
4Y52b	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3L42a	H	<i>Candida sp.</i>
5Y38a	I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1Y43a	K	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>
3L47b	O	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
3L51b	P	<i>Metchnikowia pulcherrima</i>
5Y41a	S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1L52b	T	<i>Candida sp.</i>
2L44a	V	<i>Candida sp.</i>
5Y31a	X	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2Y59a	Z	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
5Y35a	KA	<i>Dekkera bruxellensis</i>
3L54b	LA	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
4L22a	X	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1Y44a	AA	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
4L12a	CA	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
3Y55b	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4Y41a	X	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4L51a	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5Y32a	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5Y35b	S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5Y37b	I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CP <sup>a</sup>	-	<i>Starter</i>
CN <sup>b</sup>	-	<i>Indigenous</i>

<sup>a</sup> Controllo positivo rappresentato da uno starter commerciale

<sup>b</sup> Controllo negativo rappresentato dai lieviti indigeni

Il comportamento fermentativo dei lieviti è stato saggiato in mosto di Catalanesca (pH 3.27, 21.4° Brix), ottenuto da uve raccolte direttamente in vigneto e pigiate in laboratorio. Al mosto, che è stato portato ad una concentrazione di zucchero del 30% (peso/volume), attraverso l'aggiunta di glucosio, sono stati aggiunti 12g/hl di metabisolfito di potassio e 20g/hl di attivanti di fermentazione.

Le fermentazioni sono state condotte in fialoni di Erlenmeyer da 250 ml, riempiti di mosto per un volume pari a 100 ml e gli esperimenti sono stati condotti in più repliche. Le precolture dei ceppi, sviluppate per 48 ore a 25 °C nello stesso mosto da impiegare per le fermentazioni, sono state aggiunte ai fialoni di mosto in concentrazione di  $10^6$  cellule/ml. Prima e durante la fermentazione alcolica il mosto non è stato trattato né con enzimi né con composti chimici. I fialoni, dopo l'inoculo, tappati con valvola di Mfler, che trattiene l'umidità e permette lo svolgimento dal sistema solo della CO<sub>2</sub>, sono stati incubati a 16 °C. L'andamento del processo fermentativo è stato valutato misurando il calo in peso, determinato dall'evoluzione dell'anidride carbonica ed espresso come grammi di CO<sub>2</sub> svolti in funzione del volume totale di mosto. Il processo fermentativo, inteso come attività del lievito, si è considerato concluso quando non si osservavano più variazioni nel calo in peso (peso costante), che indicavano assenza di evoluzione di anidride carbonica.

Il calo in peso è stato monitorato giornalmente e la quantità di CO<sub>2</sub> prodotta (in grammi) è stata utilizzata per esprimere il vigore fermentativo (al 2-3° giorno dall'avvio della fermentazione) e il potere fermentativo (a completamento del processo fermentativo).

### **3.18 Determinazione dei parametri chimico-fisici del vino**

I parametri chimico-fisici determinati sul vino Catalanesca sono stati: anidride solforosa; acidità totale, acidità volatile; titolo alcolometrico volumico; pH; polifenoli totali e indice di Folin-Ciocalteu; zuccheri riduttori.

### **3.19 Determinazione dell'anidride solforosa**

L'anidride solforosa nel vino esiste in due forme che si trovano in equilibrio tra loro.

Si definisce:

*anidride solforosa libera* quella presente nel vino o nel mosto allo stato di gas o allo stato di combinazioni inorganiche ed è quella che svolge tutte le azioni benefiche e non;

*anidride solforosa combinata in maniera instabile e stabile* quella legata agli zuccheri e a composti di natura aldeidica e chetonica rispettivamente.

È un parametro importante giacché un decreto legge limita la sua quantità a 160 mg/l nei vini rossi e a 200 mg/l nei vini bianchi.

Il metodo ufficiale CEE prevede il dosaggio dell'anidride solforosa libera mediante titolazione iodometrica diretta mentre il dosaggio dell'anidride solforosa combinata avviene dopo idrolisi alcalina.

Modalità di esecuzione per la SO<sub>2</sub> libera:

- si pongono 50 ml di vino in un beker da 500 ml,
- si aggiungono 3 ml di acido solforico al 10% e 5 ml di salda d'amido come indicatore,
- si titola immediatamente con una soluzione di iodio 0.01N fino a colorazione blu persistente per 10 secondi.

Il risultato viene espresso in mg/l e calcolato con una formula:

$(\text{ml di I}_2 \cdot \text{N} \cdot \text{Peq} \cdot 1000) / \text{ml di vino}$

N è il titolo dello iodio

Peq è il peso equivalente della SO<sub>2</sub>

Modalità di esecuzione per la SO<sub>2</sub> combinata instabile e stabile:

- si agisce sulla soluzione titolata precedentemente ripristinando un ambiente basico con 8 ml di NaOH 4N,
- si agita una sola volta,
- si aspettano circa 4 minuti affinché la SO<sub>2</sub> passa da combinata instabile a libera,
- si aggiungono 10 ml di acido solforico al 10%,

- si titola immediatamente con iodio 0.01N prendendo nota del volume utilizzato,
- si aggiungono 20 ml di NaOH 4N,
- si agita una sola volta, si aspettano circa 5 minuti in modo che la SO<sub>2</sub> combinata stabile diventa libera, si aggiungono 200 ml di acqua distillata e 30 ml di acido solforico al 10%, si titola con iodio 0.01N.

I risultati vengono calcolati con la stessa formula precedente.

La somma dei valori ottenuti da queste determinazioni ci dà il valore della SO<sub>2</sub> totale.

### **3.20 Determinazione dell'acidità totale**

L'acidità totale è la somma delle acidità titolabili che si ottiene portando il vino a pH 7 mediante aggiunta di una soluzione alcalina a titolo noto. Ad essa concorrono diversi acidi: tartarico; malico; citrico; lattico; succinico; etc. Viene espressa in g per litro o in meq/l di acido tartarico poiché è il principale costituente.

Il metodo ufficiale CEE, che fa anche testo come metodo ufficiale italiano, prevede la titolazione, con blu di bromotimolo come indicatore, per confronto con un campione standard colorato.

Modalità di esecuzione:

- in un beker da 50 ml si introducono 5 ml di vino mediante pipetta,
- si aggiungono circa 30 ml di acqua distillata,

- si agita con un agitatore magnetico per eliminare l'anidride carbonica,
- si aggiunge 1 ml di blu di bromotimolo,
- si titola con una soluzione di NaOH 0.05N fino a colore verde blu.

#### Piccoli accorgimenti

- monitorare la titolazione con un pHmetro poiché con esso riusciamo a vedere con precisione il pH di viraggio dell'indicatore;
- titolare lentamente e sotto agitazione continua;
- la durata dell'operazione non deve superare i 5 min.

Il risultato viene calcolato con una formula:  $(\text{ml di NaOH} \cdot \text{N} \cdot \text{Peq}) / \text{ml di vino}$ , dove N è il titolo della soluzione alcalina; Peq è il peso equivalente dell'acido tartarico.

### **3.21 Determinazione dell'acidità volatile**

Per acidità volatile si intende l'insieme degli acidi appartenenti alla serie acetica, separabili per estrazione in corrente di vapore. (Regolamento CEE N.2676/90, gazzetta ufficiale delle comunità europee L 272 del 3/10/90). È costituita principalmente dall'acido acetico, ma comprende anche i suoi omologhi superiori come il propionico e il butirrico. Costituisce un parametro molto importante poiché è un indice di "sanità" dei vini. Viene espressa come g / litro o in meq/l di acido acetico.

Il regolamento CEE prevede l'eliminazione dell'anidride carbonica, la separazione degli acidi volatili per trascinamento in corrente di vapore e la titolazione volumetrica dell'acidità.

Modalità di esecuzione:

- si elimina l'anidride carbonica ponendo il campione in un bagno ad ultrasuoni,
- si distillano 10 ml di vino con distillatore in corrente di vapore (CAZENAVE),
- si raccolgono circa 100 ml di distillato,
- si aggiungono 2 gocce di fenoftaleina come indicatore,
- si titola con una soluzione di NaOH 0.1N fino a colore rosa stabile.

Il risultato viene calcolato con una formula:

$(\text{ml di NaOH} \cdot \text{N} \cdot \text{Peq}) / \text{ml di vino}$

N è il titolo della soluzione alcalina; Peq è il peso equivalente dell'acido acetico.

### **3.22 Determinazione del grado alcolico**

Il Titolo alcolometrico volumico è uguale al numero di litri di alcol etilico contenuti in 100 litri di vino o bevanda spiritosa, dove i volumi si intendono misurati alla temperatura di 20°C. Si indica col simbolo % vol/vol. Oltre all'etanolo sono compresi i suoi omologhi e gli esteri etilici che passano nel distillato.

Visto che la densità relativa di un vino o di una bevanda spiritosa è in relazione al suo contenuto in alcol, ma risente dell'influenza delle altre sostanze che vi sono disciolte, occorre preparare una soluzione idroalcolica contenete quindi solo acqua e alcol negli stessi rapporti presenti nella bevanda tal quale.

A tal fine il regolamento CEE N.2676/90 prevede prima la distillazione del vino alcalinizzato con una sospensione di idrossido di calcio e poi la determinazione del titolo alcolometrico del distillato per densimetria mediante bilancia idrostatica.

Modalità di esecuzione:

- si elimina dal campione l'anidride carbonica ,
- si distillano 100 ml di vino con distillatore elettronico enochimico (DEE Gibertini),
- si raccolgono i 3/4 del volume e si porta a volume con acqua distillata,
- si misura la densità del distillato con la bilancia idrostatica tenendo conto della temperatura a cui si effettua la misura.

Calcolo della densità:

$$\rho = (P/V) + L$$

P spinta del liquido sul corpo immerso

V volume del corpo immerso

L spinta dell'aria

si converte il valore della densità in grado alcolico con l'ausilio delle tabelle di Reichard.

### **3.23 Determinazione del pH**

Mentre l'acidità totale è la somma degli acidi presenti nel vino, il pH, o acidità reale, è la misura sia della quantità sia della loro forza. Nel vino varia normalmente da 2,9 a 4, valori che caratterizzano una soluzione abbastanza acida infatti, sotto il profilo organolettico, il pH influenza molto la sensazione acida del vino stesso.

Oltre a questo l'importanza del pH è dovuta al fatto che esso influenza l'andamento della fermentazione; la conservabilità; le precipitazioni di bitartrato di potassio; l'efficacia dell'anidride solforosa etc. Per la determinazione è stato utilizzato un pHmetro a membrana HI 8314. Quando l'elettrodo è immerso nel liquido conduttore (vino) si crea una forza elettromotrice che è in stretta relazione con il pH del liquido. I pHmetri sono forniti di una scala di taratura che dà direttamente il valore del pH. Prima della misurazione è necessario tarare lo strumento con soluzioni tampone a pH noto; di solito a 4,01 e a 7,01.

### **3.24 Determinazione dei Polifenoli totali e dell'indice F-C**

Il vino contiene un grande numero di sostanze fenoliche: antociani; tannini; catechine; flavoni. Il loro tenore è legato al tipo di vitigno e alla tecnica di

vinificazione. Hanno una enorme importanza sia sulle caratteristiche organolettiche (colore e sapore) e sia sulla conservabilità dei vini. La loro determinazione è avvenuta con uno spettrofotometro UV 1601 ad una lunghezza d'onda di 700 nm. Prima di “leggere”, il vino reagisce con una soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e con il reattivo di Folin-Ciocalteu. La reazione porta il vino ad una colorazione blu che possiede il massimo assorbimento intorno ai 700 nm ed è proporzionale al tenore in composti fenolici. Può essere espresso come mg/l di acido gallico poiché questo ha il suo massimo di assorbimento intorno ai 700 nm. È importante tracciare, ai fini della determinazione, una curva di taratura con soluzioni a concentrazione nota di questo acido in modo da risalire immediatamente al tenore in fenoli dal valore dell'assorbanza.

Modalità di esecuzione:

- in un matraccio da 100 ml si fanno reagire 1 ml di vino, 5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu, 10 ml di una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%,
- si agita e si porta a segno con acqua distillata,
- dopo 1.5 h si pone la soluzione in cuvette di vetro di 10 mm di spessore e si legge l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 700 nm rispetto ad un “bianco” costituito da acqua distillata.

Con lo stesso procedimento si risale a valore dei polifenoli nel vino espresso come Indice di Folin-Ciocateu, basta moltiplicare per 20 il valore

dell'assorbanza precedentemente letto. I valori normali per i vini bianchi sono compresi tra 4 e 20.

### **3.25 Determinazione degli zuccheri riduttori**

Il nome riduttori è dovuto al fatto che i due esosi (glucosio e fruttosio) presenti nel vino, avendo rispettivamente una funzione aldeidica e chetonica, possono ridurre, in particolari condizioni, alcune soluzioni rameiche, mercuriche etc. Questa proprietà chimica viene sfruttata per la determinazione degli zuccheri. È un determinazione molto laboriosa ma anche la più esatta e attendibile. Si tratta, infatti, di compiere una serie successiva di operazioni:

#### **Diluizione**

Per avere determinazioni attendibili, è necessario che la quantità di zucchero oscilli tra 0.5 e 1 %;

#### **Neutralizzazione**

Bisogna raggiungere un pH poco inferiore a 7 poiché ciò rende più efficace l'operazione successiva.

#### **Defecazione**

Lo scopo di questa operazione è quello di eliminare le sostanze come anioni, coloranti, tannini e pectine che hanno potere riducente e quindi

possono interferire nell'analisi. Per raggiungere tale scopo si possono impiegare diversi prodotti a base di sali di piombo, di mercurio, di ferro e di zinco.

Modalità di esecuzione:

- aggiungere una quantità di acetato basico di piombo pari a 0.5 ml per ogni 10 ml di vino,
- lasciare a riposo per 10 min dopo agitazione,
- si aggiungono circa 10-15 ml di sodio solfato per eliminare l'eccesso di piombo,
- si porta a volume secondo la diluizione scelta.

### **Filtrazione**

La defecazione rende il vino torbido e fa precipitare le sostanze riducenti non zuccherine. Per questo motivo è necessario una filtrazione con filtri di carta a pieghe. Se il vino è stato chiarificato, le operazioni di defecazione e filtrazione non sono necessarie e sono sostituite dalla centrifugazione.

### **Titolazione**

Questo è l'ultimo step dell'intera operazione di determinazione degli zuccheri riduttori. In realtà la titolazione è di una soluzione che risulta dalla mescolanza in parti uguali dei due reattivi: Fehling A e Fehling B, rispettivamente solfato di rame e sale di seignette. Tali reattivi possono essere preparati a comprati in flaconi. Il titolante è la soluzione zuccherina

preparata in precedenza che, grazie al potere riducente degli zuccheri, riduce il rame, portato ad ebollizione, fino a colorazione rosso mattone.

Modalità di esecuzione:

- in una b etta da 300 ml si aggiungono 5 ml di reattivo A, 5 ml di reattivo B, 40 ml di acqua distillata,
- si aggiungono delle sfere di vetro o scaglie di pietra pomice e si porta ad ebollizione,
- si titola con la soluzione zuccherina fino a colore rosso mattone con riflessi azzurrini,
- si interrompe per 1 min e si aggiungono 2 gocce di Blu di metilene all'1% come indicatore,
- si comincia a titolare di nuovo fino a completa colorazione rosso "ciliegia".

Il risultato si ottiene con una formula:

$$(0,0515*100*D)/A = \% \text{ zuccheri in g}$$

"0,0515"   la quantit  di zuccheri necessaria per ridurre la soluzione di Feeling impiegata (10 ml)

D   il numero di diluizioni

A   la quantit  di titolante impiegato.

Piccoli accorgimenti:

- Per sapere il numero di diluizioni   opportuno fare una prova di titolazione col vino tal quale

- Far rientrare le operazioni di neutralizzazione e defecazione nella diluizione
- L'ultima titolazione non deve superare un tempo di 3 min
- Dalla quantità di soluzione zuccherina impiegata si dovranno togliere 0,2 ml che sono quelli impiegati per decolorare l'indicatore.

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

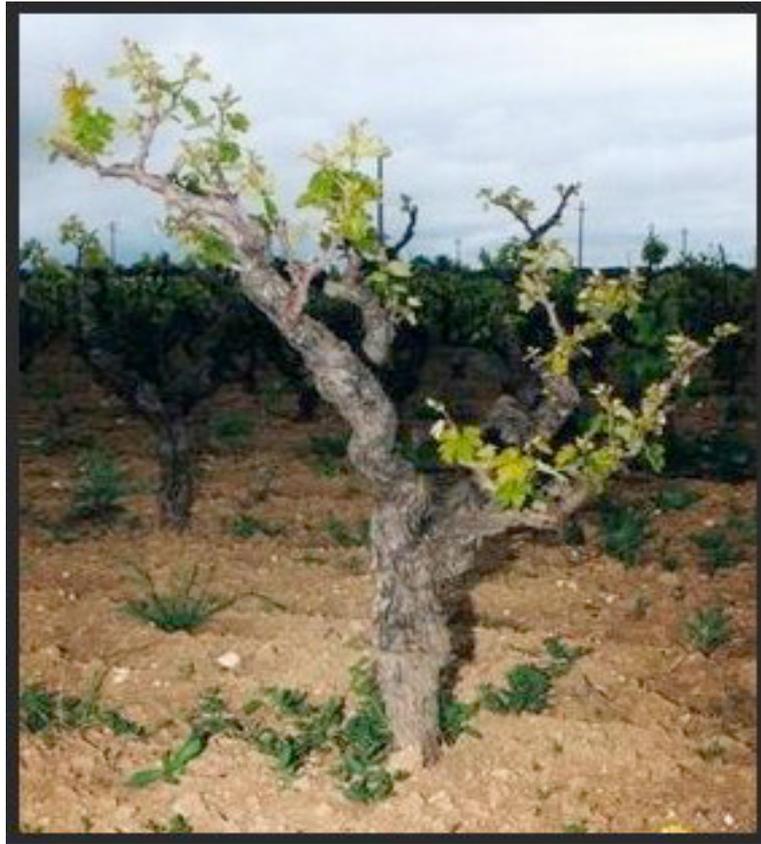
### **4.1 Monitoraggio dei lieviti ricorrenti nella vinificazione spontanea del Primitivo di Manduria**

#### **4.1.1 Il Primitivo di Manduria**

A far da culla e cornice al Primitivo di Manduria (DOC) è una terra ricca di storia e di cultura. Il Primitivo è il vino tipico della provincia di Taranto; le sue uve occupano il 70 % della superficie coltivata ed è in questa zona che trovano le condizioni pedoclimatiche ottimali per maturare. Il "velluto liquido", il vero "maschio" , il sangue della terra di Manduria, un vitigno con il fuoco nelle vene, così come viene definito il Primitivo di Manduria. Il nome gli deriva dal periodo di maturazione della vite (prima metà di settembre), piuttosto in anticipo rispetto alle uve dalle quali si ottengono altri vini; con opportuni trattamenti della pianta è anche possibile ottenere due raccolte: la seconda, tra la fine di settembre ed i primi di ottobre, meno abbondante e dal sapore meno zuccherino. Ha sicuramente radici molto antiche, anche se le prime notizie certe risalgono al XVIII secolo quando, per opera del primicerio don Francesco Indillicati, fu isolato a Gioia del Colle. A lui viene attribuita l'origine della selezione della pianta e successivamente la definizione di Primitivo. Egli notò che tra i vitigni da lui amorevolmente coltivati c'era una pianta che giungeva a maturazione prima di tutte, dava un'uva particolarmente gustosa e dolce e si poteva vendemmiare già sul finire di agosto. Il successo di queste uve fu tale che spinse i coltivatori di Gioia del Colle ad estenderla ai terreni circostanti. Così la pianta si diffuse in tutta la Murgia barese, giungendo a Manduria per merito di "Don Tommaso Schiavoni Tafuri" il quale, sposando la contessina "Sabini di Altamura" , ebbe in dono questa preziosa dote: delle

barbatelle scelte di quella vite così particolare. Un dono che si è poi rivelato preziosissimo per la cittadina manduriana, e che Tommaso Schiavoni Tafuri seppe mettere a frutto con maestria. A causa della sua elevata somiglianza con lo Zinfandel, vitigno da uva rossa molto versatile, rinomato e diffuso in California, ci sono state diverse disquisizioni circa l'origine del Primitivo, comunque è stato provato che entrambi i vitigni provengono dall'Est europeo, con molta probabilità dalla Dalmazia, ma successivamente hanno intrapreso strade differenti, giungendo l'uno in Puglia e l'altro in California.

Il Primitivo di Manduria è un vitigno selvaggio, non ama i legacci, cresce libero ad alberello affondando le radici in terreni caratterizzati da roccia tufacea calcarea spesso fessurata, poggiante su uno strato di argilla e sotto uno strato di terre fertili. E' una pianta forte, resistente alla siccità, allo scirocco, ai terreni aridi e poveri e alle brinate, non necessita di trattamenti chimici antiparassitari, basta solo un pò di verderame per fare in modo che cresca senza sofferenze. La pianta si sviluppa su tre bracci fino ad un'altezza di un metro e mezzo (fig. 1).



**Figura 1**

Il germoglio è ad apice espanso, lanuginoso, verde chiaro con orlo carminato, foglioline apicali spiegate, un pò lanuginose, verde chiaro con sfumature rossastre ai bordi. La foglia è media, pentagonale, quinquelobata, lembo verde cupo, ondulato, lanuginosa sulla pagina inferiore, con denti molto evidenti. Il grappolo è di media grandezza, conico-cilindrico a forma alata e semicompatto, cioè piuttosto rado: ciò evita i rischi di possibili e sgraditi ammuffimenti. L'acino è sferoidale, medio e con buccia di colore blu o grigio-bluastro; buccia relativamente spessa e pruinosa; polpa succosa di colore vinoso e di sapore speciale, dolce; al suo interno pochi vinaccioli da cui si ricavano ottime grappe (figura 2).



**Figura 2**

Il vino che si ottiene da questo vitigno è un classico vino da meditazione, presenta caratteristiche organolettiche molto interessanti: un colore rosso rubino intenso, una consistenza piena, robusta, un pò selvatica, un sapore gradevole, armonico, tendente al vellutato con l'invecchiamento ed un'elevata potenza alcolica.

#### **4.1.2 Il riconoscimento DOC**

Un tempo il Primitivo veniva commercializzato come vino da taglio per migliorare il "tono" di altre produzioni più conosciute, ma esangui, privi di vigoria, deboli. Tuttavia da alcuni anni, c'è attorno a questo vino, un gran fermento che lo ha portato ad ottenere, nel 1974, il riconoscimento della DOC, che ha disciplinato le zone tipiche di coltivazione e tempi e modalità di produzione. La denominazione di origine controllata "Primitivo di

Manduria" è pertanto riservata al vino rosso che risponde alle condizioni e ai requisiti stabiliti dal disciplinare di produzione, il quale prevede che:

- il vino "Primitivo di Manduria" sia ottenuto dalle uve provenienti dai vigneti composti da vitigno Primitivo (Art. 2).
- La zona di produzione comprenda: in provincia di Taranto, i territori dei comuni di Manduria, Carosino, Monteparano, Leporano, Pulsano, Faggiano, Roccaforzata, San Giorgio Jonico, San Marzano di San Giuseppe, Fragagnano, Lizzano, Sava, Torricella, Maruggio, Avetrana e quello della frazione di Talsano e delle isole amministrative del comune di Taranto, intercluse nei territori dei comuni di Fragagnano e Lizzano (Art. 3).
- Le condizioni ambientali e di coltura dei vigneti destinati alla produzione del vino "Primitivo di Manduria" siano quelle tradizionali della zona e comunque atte a conferire alle uve ed al vino le specifiche caratteristiche, pertanto la resa massima delle uve in vino non deve essere superiore al 70 % (Art. 4).
- Le operazioni di vinificazione e preparazione dei vini avvengano all'interno della zona di produzione delimitata nell'art. 3 e solo con sistemi tradizionali, senza alcuna correzione con concentrato (Art. 5).

Il Primitivo di Manduria può esistere in quattro versioni: *secco*, *dolce naturale*, *liquoroso dolce naturale*, *liquoroso secco*.

- *Secco*: si presenta austero, robusto, corposo, asprigno, di colore rosso scuro e con un intenso profumo di frutta rossa, dalla ciliegia, ai frutti di bosco, alle prugne mature; con un gusto morbido, appena un pò amabile; con una gradazione alcolica di 14°. Il disciplinare impone che sia posto in commercio non prima del giugno dell'anno successivo a quello di produzione delle uve.
- *Dolce naturale*: si presenta leggermente abboccato con una gradazione alcolica minima di 16°, profumi di mela, cotogna e di more; al palato è rotondo e vellutato.
- *Liquoroso dolce naturale*: è considerato la punta di diamante dei primitivi. E' invecchiato in barrique per non meno di due anni e può arrivare ad una gradazione di 19°, ciò nonostante il suo sapore resti decisamente dolce, vellutato, gustoso.
- *Liquoroso secco*: ha due anni di invecchiamento ed una gradazione alcolica di 18°. Si presenta amabile e con sentori intensi dei frutti mediterranei.

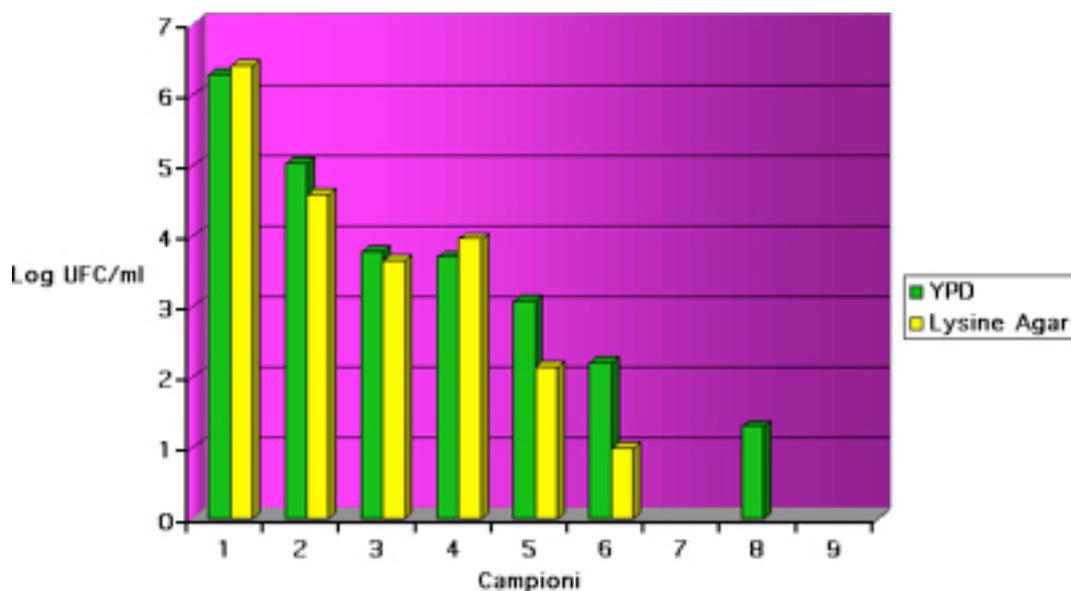
In definitiva, il riconoscimento DOC ha consacrato il pregio e la nobiltà di un vino che è stato per troppi anni mortificato e ingiustamente utilizzato per migliorare altri vini rossi da pasto, famosi, ma deboli.

### **4.1.3 Conteggio microbico**

Le piastre di YPD e di Lysine Agar insemenzate con le diluizioni-sospensioni dei diversi campioni, dopo incubazione e prima degli isolamenti sono state sottoposte a conteggio ed hanno fornito i risultati che, in termini di Unità Formanti Colonie (UFC) per millilitro, sono riportati nella tabella che segue.

<b>Campione</b>		<b>UFC ml<sup>-1</sup></b>	
<b>N.</b>	<b>Natura</b>	<b>YPD Agar</b>	<b>Lysine Agar</b>
1	Mosto appena ottenuto	1,90x10 <sup>6</sup>	2,60x10 <sup>6</sup>
2	Dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio	1,05x10 <sup>5</sup>	3,80x10 <sup>4</sup>
3	Dopo 48 ore (2 giorni)	6,00x10 <sup>3</sup>	4,50x10 <sup>3</sup>
4	Dopo 72 ore (3 giorni)	5,00x10 <sup>3</sup>	9,00x10 <sup>3</sup>
5	Dopo 96 ore (4 giorni)	1,20x10 <sup>3</sup>	1,40x10 <sup>2</sup>
6	Vino fiore, dopo 5 giorni	1,60x10 <sup>2</sup>	10
7	Torchiato, dopo 5 giorni	-	-
8	Vino fiore + torchiato, dopo 6 giorni	2,00x10 <sup>2</sup>	-
9	Vino al momento dell'ultimo travaso	-	-

Gli stessi risultati sono riportati nell'istogramma della figura 4 dove le colonnine verdi sono relative all'agar YPD, quelle gialle al Lysine Medium. Come si può osservare, il mosto ottenuto dalla pigia-diraspatura esibisce una carica iniziale di lieviti di 10<sup>6</sup> UFC/ml, destinata a subire un calo progressivo nei successivi campioni di mosto e di vino. Tale andamento si evidenzia per entrambe i substrati utilizzati, anche se maggiori differenze nei diversi campioni sono state registrate sul Lysine Medium agarizzato.



**Figura 4**

La presenza di una microflora iniziale numericamente elevata, in accordo con i risultati riportati per altre fermentazioni spontanee (Nurgel *et al.*, 2002), rende comprensibile il mancato ricorso a lieviti secchi attivi per questa particolare tipologia di produzione, per la quale la sola flora blastomicetica dell'uva di partenza e dell'ambiente di cantina, permette di avviare, in tempi ragionevolmente brevi, la fermentazione del mosto in vino.

Da un'analisi più dettagliata dei risultati dei conteggi è possibile notare che, con il procedere della fermentazione, per il substrato YPD si assiste al passaggio da una carica iniziale di  $1,9 \times 10^6$  UFC/ml ad una pari a  $1,05 \times 10^5$  UFC/ml dopo 24 ore, e quindi a  $6 \times 10^3$  dopo 48 ore, livello che si mantiene allo stesso ordine di grandezza fino alla svinatura, quando i lieviti vengono rilevati in quantità di poche centinaia per ml. Il campione

prelevato in corrispondenza dell'ultimo travaso non ha dato origine ad alcuna colonia di lievito. Assenza di colonie di lievito è risultata anche nelle piastre inoculate con il campione di torchiato, probabilmente a causa della particolare fase del processo produttivo: è infatti possibile che la già bassa carica ( $1,20 \times 10^3$  UFC/ml) registrata per il campione 5 sia andata persa perché in parte rimasta adesa alle bucce e in parte stressata dalla fase tecnologica.

Come indicato, nessuna colonia è stata evidenziata nel campione 9, cioè nel vino prelevato in seguito all'ultimo travaso, effettuato dopo 4 mesi dalla pigiatura dell'uva. Tale risultato non è certamente sorprendente dal momento che è ben noto che l'alcool etilico esercita un'azione inibitrice nei confronti di tutti i microrganismi e quindi anche dei lieviti, il cui comportamento è variabile in funzione delle specie e perfino dei ceppi appartenenti alla stessa specie, nonché in funzione della zona di provenienza.

Relativamente alle colonie rilevate sul Lysine Medium, nonostante l'andamento generale sia abbastanza simile a quello evidenziato per il substrato YPD, bisogna sottolineare che per esso le differenze tra i vari campioni sono più marcate. Infatti, partendo da una carica iniziale di  $2,6 \times 10^6$  UFC/ml si assiste ad una riduzione di due decadi dopo 24 ore, con un valore pari a  $3,8 \times 10^4$  UFC/ml e ad un'ulteriore diminuzione nei campioni 3, 4 e 5, per raggiungere poi, nel vino fiore, un valore pari a 10 UFC/ml.

Il torchiato e tutti gli altri campioni non hanno fornito colonie di lievito su questo mezzo di coltura.

La riduzione delle colonie di lievito contate su Lysine Medium è in accordo con quanto noto sulla capacità, di questo substrato, di favorire soltanto la crescita dei non-*Saccharomyces*, capaci di utilizzare la lisina come unica fonte di azoto. E', d'altra parte, altrettanto ben noto che questi microrganismi, con l'aumento del grado alcolico, soccombono e lasciano il posto ai *Saccharomyces* che hanno una maggiore resistenza all'alcool.

Dalle piastre di cui si è detto sono state isolate complessivamente 136 colture di lieviti. La tabella che segue riporta informazioni relative al campione, alla diluizione dell'inoculo ed al substrato.

Campione		Substrato	Esponente Diluizione	N° di isolati
N°	Natura			
1	Mosto appena ottenuto	YPD	-4	13
			-5	9
		LM	-3	1
			-4	5
			-5	3
2	Dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio	YPD	-1	2
			-2	1
			-3	9
		LM	-1	8
			-2	3
			-3	3
3	Dopo 48 ore, in seguito a rimontaggio	YPD	-2	7
			-3	11
		LM	-2	12
			-3	3
4	Dopo 72 ore, in seguito a rimontaggio	YPD	-2	8
			-3	1
		LM	-2	6
			-3	4
5	Dopo 96 ore,	YPD	0	3
			-1	8
			-2	7
		LM	-1	5
			-2	5
6	Vino fiore, dopo 5 giorni	YPD	-1	1
		LM	-2	1

8	Vino fiore + torchiato,	YPD	-1	2
---	-------------------------	-----	----	---

#### **4.1.4 Identificazione delle colonie di lieviti mediante sequenziamento dei domini D1/D2 del 26S rDNA**

Lo sviluppo crescente della biologia molecolare e l'introduzione di tecniche sempre più avanzate ha permesso di eliminare parecchie ambiguità tassonomiche e di semplificare notevolmente l'identificazione dei microrganismi (Fernández *et al.*, 1999). Infatti, dei diversi studi effettuati sui lieviti del vino, hanno fornito risultati più precisi e sicuri, perché svincolati dalla variabilità fenotipica, quelli basati su metodiche molecolari (Cocolin *et al.*, 2001; Baleiras Couto *et al.*, 1996; Schütz e Gafner, 1994; Pramateftaki *et al.*, 2000). In particolare, la tecnica che si è dimostrata in grado di apportare, in tempi abbastanza rapidi, informazioni utili per l'identificazione di lieviti del vino è stata la RAPD-PCR (Quesada e Cenis, 1995).

In questo lavoro di ricerca sperimentale, tale tecnica è stata scelta come prima analisi da applicare a tutti gli isolati, in quanto, dalle informazioni disponibili in letteratura, essa rappresenta un'indagine in grado di differenziare ceppi appartenenti ad una stessa specie (Busse *et al.*, 1996), per tipizzare i microrganismi, nonché analizzare dinamiche di popolazione e la dominanza di ceppi all'interno di un ecosistema (Williams *et al.*, 1990).

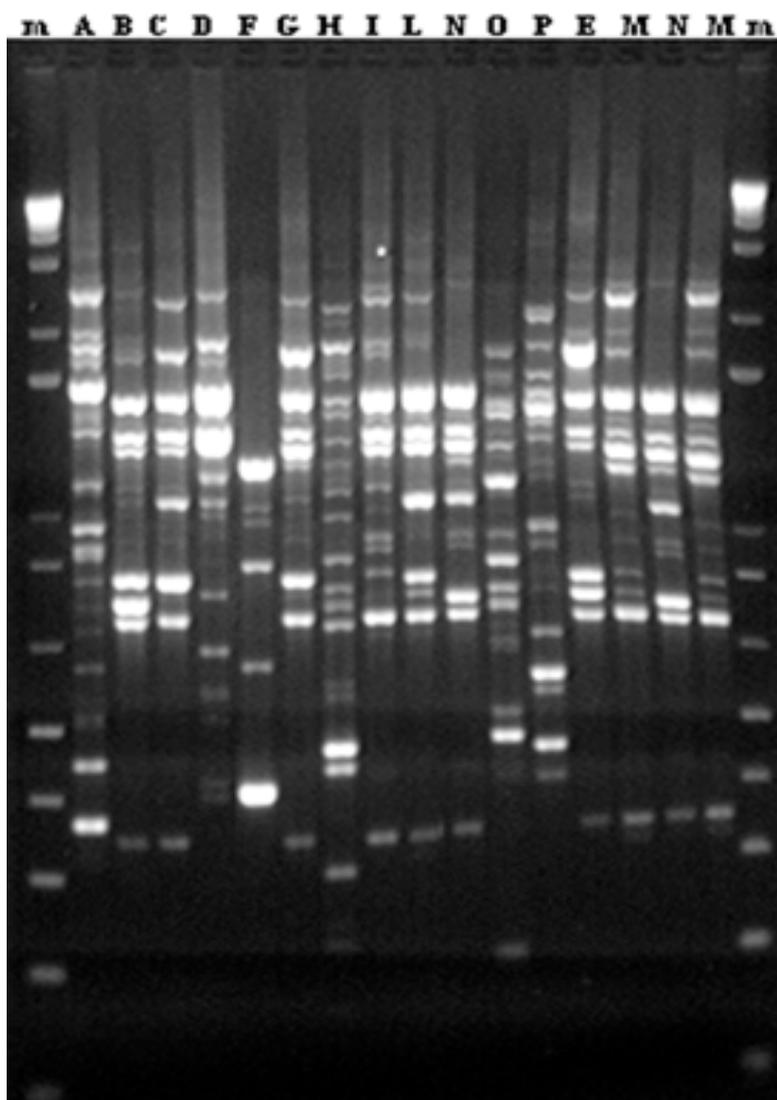
In altre parole, nell'ambito di popolazioni microbiche, tassonomicamente correlate, mediante l'impiego dell'analisi RAPD-PCR è possibile tipizzare ceppi microbici appartenenti alla stessa specie ed ottenere profili RAPD-PCR che, con buona probabilità, risultano ceppo-specifici. Infatti, nell'ambito di una stessa specie, i ceppi microbici possono presentare profili elettroforetici (pattern) RAPD-PCR differenti, ma nell'ambito di uno stesso gruppo RAPD-PCR, difficilmente i ceppi appartengono a differenti specie microbiche. Ecco perché applicando la tecnica RAPD-PCR come analisi preliminare su tutti i ceppi isolati, è stato possibile identificare i biotipi identici e ridurre notevolmente il numero di isolati da sottoporre, in un secondo momento, all'identificazione tramite sequenziamento del 26S rDNA.

Il primo step di questo lavoro ha riguardato l'estrazione del DNA genomico da tutti i 136 ceppi isolati, mediante il protocollo riportato in Materiali e Metodi che prevede l'utilizzo dell'InstaGene<sup>TM</sup> Bio-Rad Matrix. Con questo metodo di estrazione rapido, semplice e standardizzato, è stato possibile ottenere il DNA “target” in tempi molto ristretti.

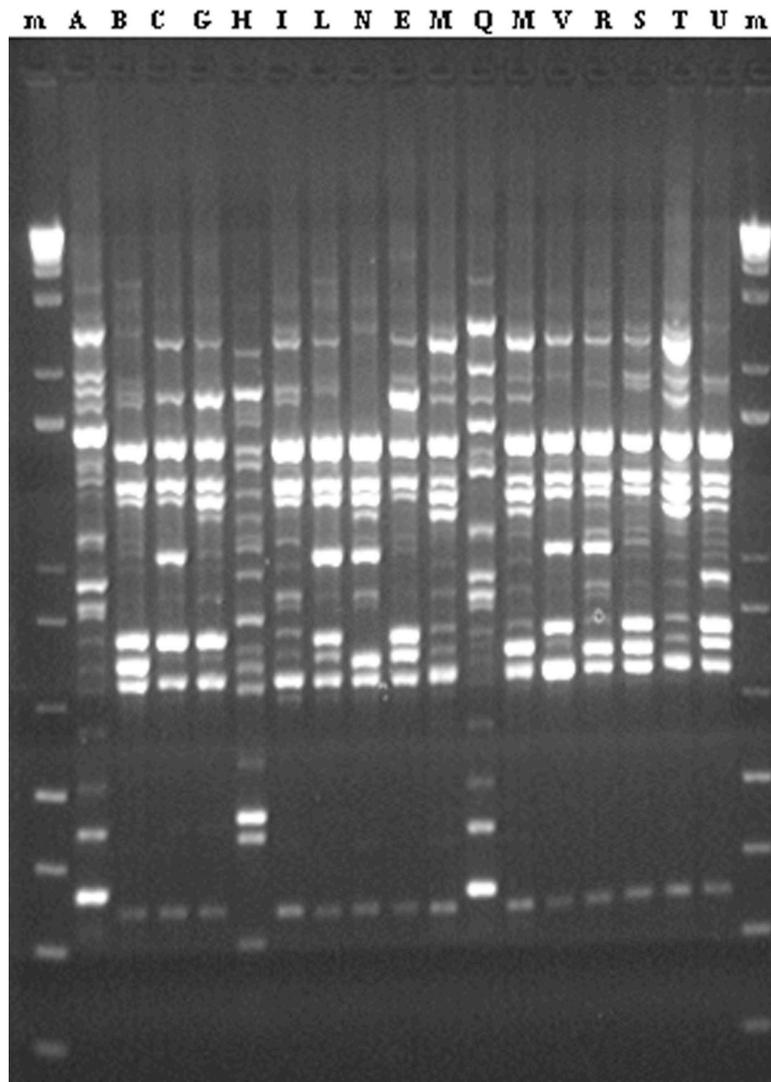
Al fine di selezionare il primer con il maggior potere discriminante nell'analisi RAPD, è stata condotta un'amplificazione preliminare RAPD-PCR solo su quattro isolati, che si sapevano dare fingerprinting diversi, con 12 diversi primers già descritti in letteratura.

Il primer XD5 è risultato quello in grado di differenziare meglio gli isolati analizzati ed è stato pertanto scelto e utilizzato per l'analisi RAPD di tutti gli isolati a disposizione.

I 136 isolati sottoposti ad analisi RAPD-PCR hanno fornito 20 profili elettroforetici diversi. Essi sono mostrati nelle figure 5a e 5b.



**Figura 5a** – Profili PCR-RAPD rilevati in questo studio. Su ogni lane è riportata l'indicazione del profilo. m, marker di pesi molecolari DNA 1 kb ladder plus (Invitrogen). A, isolato 5Y24a; B, 1Y42a; C, 2L22b; D, 2L12a; F, 4D21b; G, 2Y33a; H, 3Y33b; I, 3L28; L, 3L23; N, 3D22b; O, 8Y11a; P, 6L21a; E, 1L31b; M, 2L12b; N, 2L21b; M, 2L15b.



**Figura 5b** – Profili PCR-RAPD rilevati in questo studio. Su ogni lane è riportata l'indicazione del profilo. m, marker di pesi molecolari DNA 1 kb ladder plus (Invitrogen). A, isolato 5Y24a; B, 1Y42a; C, 2L22b; G, 2Y33a; H, 3Y33b; I, 3L28; L, 3L23; N, 3D22b; E, 1L31b; M, 2L12b; Q, 1L41b; M, 2L31b; V, 3L22; R, 3L24; S, 4D21a; T, 3R24a; U, 3D21a.

Nella tabella che segue sono riportati i profili RAPD degli isolati di ogni campione.

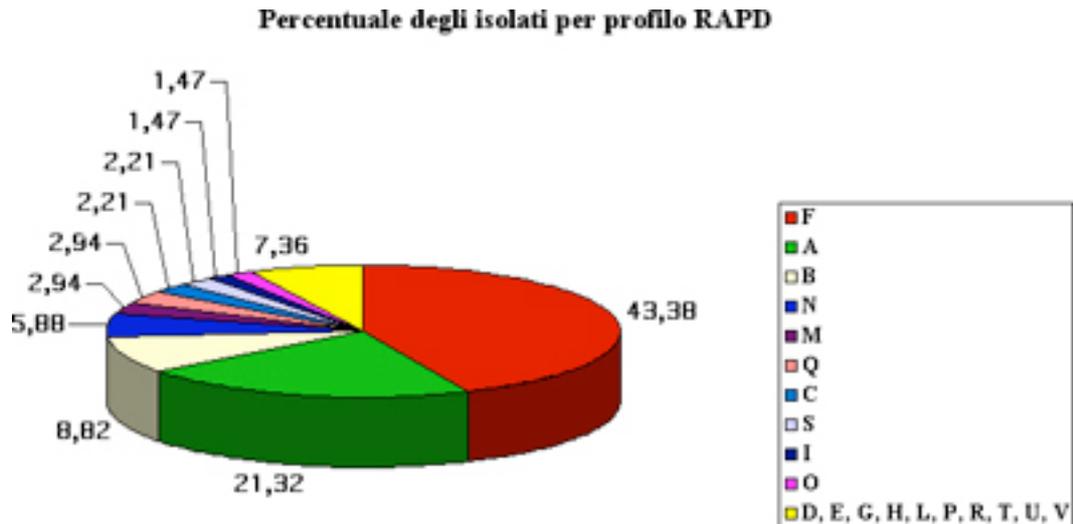
<b>Isolato</b>	<b>Substrato e diluizione</b>	<b>Pattern RAPD</b>
<b>Campione n. 1: Mosto appena ottenuto</b>		
1Y41a	YPD -4 a	A
1Y42a	YPD -4 a	B
1Y43a	YPD -4 a	A
1Y44a	YPD -4 a	A
1Y41b	YPD -4 b	A
1Y42b	YPD -4 b	A
1Y43b	YPD -4 b	A
1Y44b	YPD -4 b	A
1Y51a	YPD -5 a	A
1Y52a	YPD -5 a	A
1Y53a	YPD -5 a	Q
1Y54a	YPD -5 a	A
1Y51b	YPD -5 b	A
1Y52b	YPD -5 b	A
1Y53b	YPD -5 b	A
1Y54b	YPD -5 b	A
1Y55b	YPD -5 b	A
1L31b	LM -3 b	E
1L41a	LM -4 a	A
1L42a	LM -4 a	A
1L43a	LM -4 a	Q
1L41b	LM -4 b	A
1L42b	LM -4 b	A
1L51b	LM -5 b	A
1L52b	LM -5 b	A
1L53b	LM -5 b	A
<b>Campione n. 2: Dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio</b>		
2Y11a	YPD -1 a	F
2Y12a	YPD -1 a	F
2Y21a	YPD -2 a	F
2Y31a	YPD -3 a	F
2Y32a	YPD -3 a	F
2Y33a	YPD -3 a	G
2Y34a	YPD -3 a	A

2Y35a	YPD -3 a	A
2Y31b	YPD -3 b	F
2Y32b	YPD -3 b	F
2Y33b	YPD -3 b	F
2Y34b	YPD -3 b	Q
2L11a	LM -1 a	C
2L12a	LM -1 a	D
2L13a	LM -1 a	B
2L11b	LM -1 b	C
2L12b	LM -1 b	N
2L13b	LM -1 b	N
2L14b	LM -1 b	N
2L15b	LM -1 b	M
2L21b	LM -2 b	N
2L22b	LM -2 b	C
2L23b	LM -2 b	B
2L31b	LM -3 b	M
2L32b	LM -3 b	M
2L33b	LM -3 b	B
<b>Campione n. 3: Dopo 48 ore, in seguito a rimontaggio</b>		
3Y21	YPD -2	F
3Y31a	YPD -3 a	A
3Y32a	YPD -3 a	F
3Y32b	YPD -3 b	B
3Y33b	YPD -3 b	H
3L21	LM -2	F
3L22	LM -2	V
3L23	LM -2	L
3L24	LM -2	R
3L25	LM -2	F
3L26	LM -2	N
3L27	LM -2	S
3L28	LM -2	I
3L31	LM -3	B
3L32	LM -3	B
3R21a	LM -2a	M
3R22a	LM -2a	F
3R24a	LM -2a	T
3R22b	LM -2b	B
3R32a	LM -3a	F

3D21a	YPD -2a	U
3D21b	YPD -2b	F
3D22b	YPD -2b	N
3D23b	YPD -2b	N
3D24b	YPD -2b	B
3D25b	YPD -2b	F
3D31a	YPD -3a	B
3D32a	YPD -3a	F
3D31b	YPD -3b	I
3D32b	YPD -3b	B
3D33b	YPD -3b	B
3D34b	YPD -3b	F
3D35b	YPD -3b	F
<b>Campione n. 4: Dopo 72 ore, in seguito a rimontaggio</b>		
4R22a	LM -2a	F
4R23a	LM -2a	F
4R24a	LM -2a	S
4R25a	LM -2a	F
4R26a	LM -2a	F
4R23b	LM -2b	F
4R31a	LM -3a	N
4R32a	LM -3a	F
4R33a	LM -3a	F
4R34a	LM -3a	F
4D21a	YPD -2a	S
4D22a	YPD -2a	F
4D23a	YPD -2a	F
4D24a	YPD -2a	F
4D21b	YPD -2b	F
4D22b	YPD -2b	F
4D23b	YPD -2b	F
4D24b	YPD -2b	F
4D31a	YPD -3a	F
<b>Campione n. 5: Dopo 96 ore, in seguito a rimontaggio</b>		
5Y01a	YPD 0 a	F
5Y02a	YPD 0 a	F
5Y03a	YPD 0 a	F
5Y11a	YPD -1 a	F
5Y12a	YPD -1 a	F

5Y13a	YPD -1 a	A
5Y14a	YPD -1 a	F
5Y15a	YPD -1 a	F
5Y16a	YPD -1 a	F
5Y17a	YPD -1 a	F
5Y19a	YPD -1 a	F
5Y21a	YPD -2 a	F
5Y22a	YPD -2 a	F
5Y23a	YPD -2 a	F
5Y24a	YPD -2 a	A
5Y25a	YPD -2 a	F
5Y26a	YPD -2 a	A
5Y27a	YPD -2 a	F
5L11a	LM -1 a	F
5L12a	LM -1 a	Q
5L13a	LM -1 a	F
5L14a	LM -1 a	F
5L11b	LM -1 a	F
5L21a	LM -2 a	F
5L22a	LM -2 a	F
5L23a	LM -2 a	F
5L24a	LM -2 a	A
5L25a	LM -2 a	F
<b>Campione n. 6: Vino fiore, dopo 5 giorni</b>		
6Y13a	YPD -1 a	F
6L21a	LM -2 a	P
<b>Campione n. 8: Vino fiore + torchiato, dopo 5 giorni</b>		
8Y11a	YPD -1 a	O
8Y12a	YPD -1 a	O

Nella figura n. 6 è riportata la frequenza con cui ricorrono i 20 pattern in tutti gli isolati sottoposti ad analisi.



**Figura 6**

Come si può osservare, i profili F, A e B sono quelli che ricorrono maggiormente, comprendendo un totale di 59, 29 e 12 ceppi, rispettivamente.

In particolare, i ceppi mostranti il profilo elettroforetico RAPD-PCR F sono stati ritrovati in percentuale dominante nei campioni 2, 3, 4 e 5 ma sono risultati assenti nei campioni 1 e 8. La sola assenza nei campioni 1 e 8 può essere dovuta, molto probabilmente, alla casualità dell'isolamento.

Passando dai campioni iniziali a quelli finali, il numero di isolati ascrivibili al profilo F subisce dapprima un incremento fino ad arrivare ad un valore massimo in corrispondenza del campione 4 (84%) degli isolati, e poi in progressivo declino fino a costituire il 50% degli isolati nel campione 6, per risultare, infine, nullo nel campione 8.

Numericamente più importante dopo il profilo F, si ritrova il profilo A con il 21,32% dei ceppi totali. Il maggiore contributo al numero dei ceppi

ascrivibili a tale profilo è fornito dal campione 1 con l'84,6% degli isolati.

Nei campioni 2, 3 e 5 è presente in percentuali variabili dal 3 al 14%.

Un altro profilo frequentemente ritrovato in diversi campioni, ma numericamente meno significativo rispetto ai profili A e F è il pattern B che conta l'8,8% dei ceppi totali. Sebbene i profili A, F e B siano prevalenti in numero rispetto agli altri, non bisogna certamente trascurare la ricorrenza dei rimanenti pattern, che si rinvencono con una frequenza che varia tra il 5,9% per il profilo N e lo 0,7% per i profili D, E, G, H, L, P, R, T, U e V. Per ciascuno di questi ultimi pattern è stato rilevato un solo isolato. Gli isolati mostrandoti questi pattern RAPD costituiscono il 7,36% del totale.

Nell'ambito dei diversi campioni, quelli che hanno mostrato la maggiore variabilità dei profili, contraddistinguendosi in maniera significativa dagli altri, sono il 2 e il 3 con, rispettivamente, 9 e 10 profili elettroforetici RAPD-PCR differenti. Bisogna tuttavia tener conto che il numero degli isolati non è omogeneo in tutti i campioni; in particolare, negli ultimi, esso è notevolmente ridotto rispetto a quelli iniziali.

Per ciascuno dei 20 diversi pattern RAPD si è proceduto alla scelta di un rappresentante da sottoporre al sequenziamento del 26S rDNA, sfruttando il fatto che, nonostante il 26S rDNA sia una regione altamente conservata, esso contiene dei domini variabili che consentono una differenziazione a livello di specie (Kurtzman e Robnett, 1998).

Le sequenze ottenute sono state inserite nel database della GeneBank del National Center of Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997), per compararle con le sequenze note del 26S rDNA già depositate.

I risultati relativi alla identificazione speciografica dei ceppi selezionati sulla base del sequenziamento del 26S rDNA sono riportati nella tabella che segue.

<b>ISOLATO</b>	<b>PATTERN RAPD</b>	<b>IDENTIFICAZIONE 26S SEQUENCING</b>	<b>% OMOLOGIA</b>
5Y24a	A	<i>Candida stellata</i>	100%
1Y42a	B	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
2L22b	C	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
2L12a	D	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%
1L31b	E	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
4D21b	F	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	99%
2Y33a	G	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3Y33b	H	<i>Zygoascus hellenicus</i>	99%
3L28	I	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3L23	L	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
2L32b	M	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3D22b	N	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
8Y11a	O	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	98%
6L21a	P	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98%
5L12a	Q	<i>Candida stellata</i>	100%
3L24	R	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
4R24a	S	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3R24a	T	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3D21a	U	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%
3L22	V	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%

Come si può osservare, è stato possibile risalire alla specie microbica di tutti i ceppi sottoposti a sequenziamento, e ciò dimostra la validità del protocollo eseguito per tale scopo.

Dai 20 isolati analizzati, sono state identificate complessivamente 7 specie microbiche:

- *Candida stellata*
- *Hanseniaspora guilliermondii*
- *Issatchenkia orientalis*
- *Issatchenkia terricola*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Zygoascus hellenicus*
- *Zygosaccharomyces bailii*

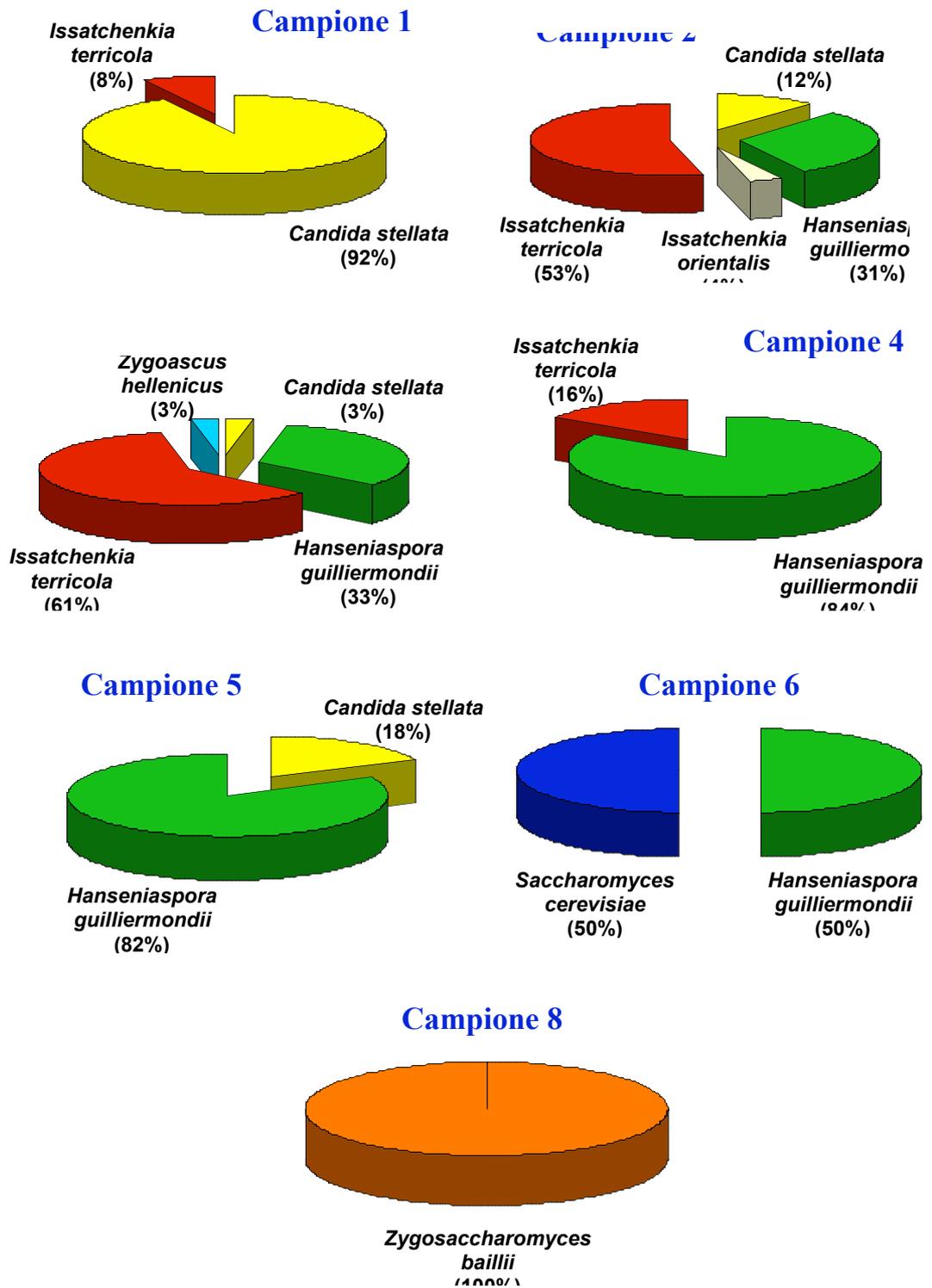
La presenza di tali specie è indice di una buona diversità nella popolazione dei lieviti caratteristici delle fermentazioni spontanee ed è dovuta al fatto che non ci sono stati inoculi e si sono adottati metodi tradizionali di vinificazione (Torija *et al.*, 2001). Dalla letteratura si evince che la maggior parte delle specie identificate sono state ritrovate anche in altre regioni geografiche, sebbene a differenti frequenze (Fleet *et al.*, 1984; Schütz e Gafner, 1993; Versavand *et al.*, 1995; Pramateftaki *et al.*, 2000). Pardo *et al.* (1989) hanno ritrovato nel mosto, con maggiore frequenza, *Candida pulcherrima*, *Candida stellata* e *Kloeckera apis*.

Per alcune specie è stata anche possibile una differenziazione a livello di ceppo e ciò a conferma della validità della tecnica RAPD-PCR adoperata come metodo di indagine in grado di tipizzare ceppi microbici appartenenti ad una stessa specie.

La specie che ha mostrato la maggiore variabilità a livello di ceppo è stata *Issatchenkia terricola*, dal momento che la maggior parte delle tipologie RAPD (13 su 20) si è rivelata appartenere a tale specie. Fra i 13 biotipi evidenziati come rapportabili a questa specie, i più frequenti sono risultati quelli caratterizzati dal profilo B (12 isolati) e dal profilo N (8 isolati). Nonostante i 13 profili RAPD erano presenti in percentuali piuttosto basse nei diversi campioni analizzati, nel loro complesso hanno reso la specie *Issatchenkia terricola* numericamente più importante e più ricorrente (28,7%) dopo *Hanseniaspora guilliermondii*. Quest'ultima, rappresentata dal 43,4% degli isolati totali non ha presentato ceppi diversi, ma un unico biotipo rapportabile alla tipologia RAPD F.

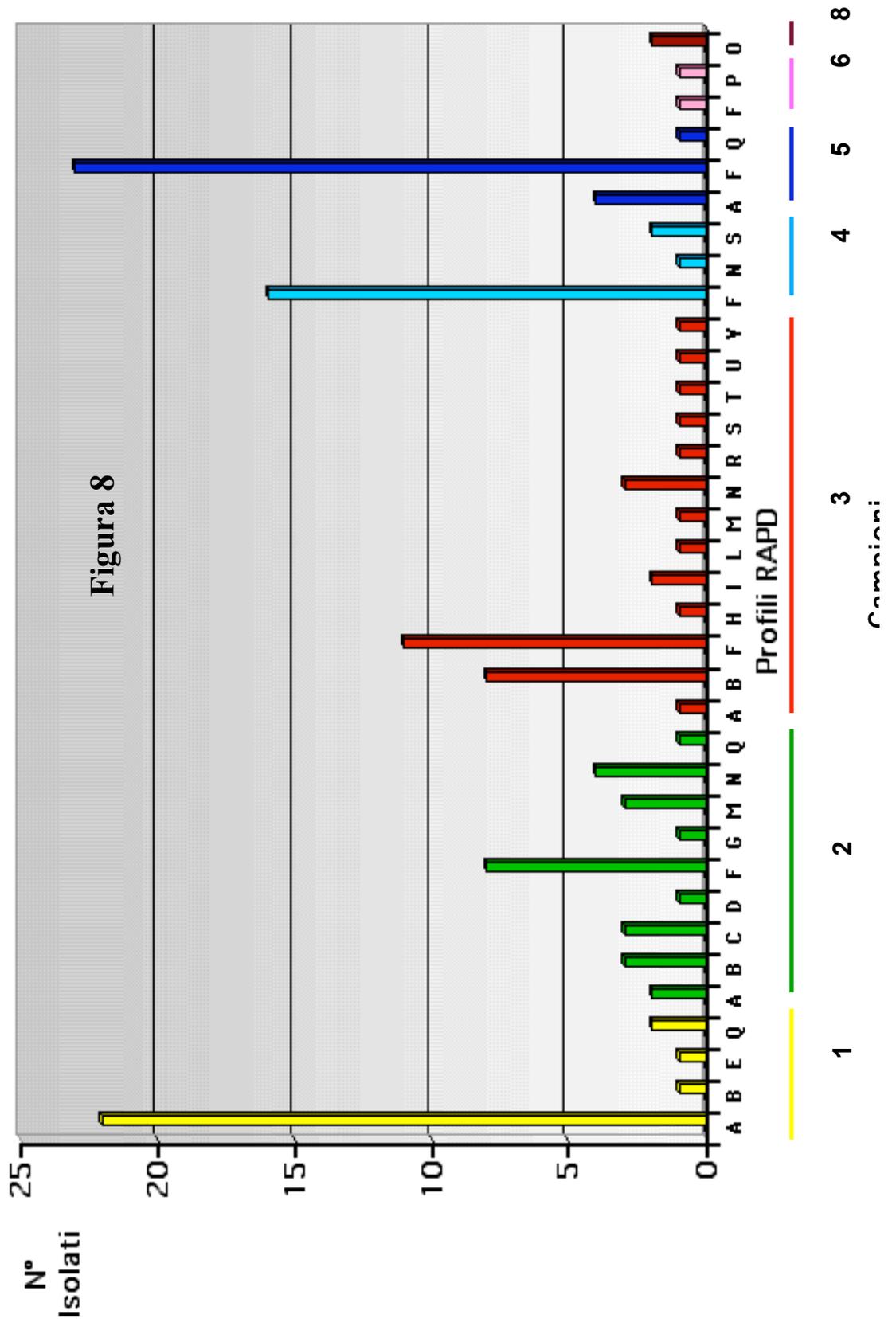
La specie *Candida stellata*, anch'essa presente in numero abbastanza rilevante (24,3%) ha presentato 2 ceppi diversi ascrivibili alle tipologie RAPD A (29 isolati) e Q (4 isolati). Le altre specie invece, comprendenti ciascuna un unico ceppo, erano presenti in percentuali piuttosto basse.

Dall'analisi dei grafici riportati nella figura n. 7 è possibile evidenziare la presenza e il numero delle diverse specie nei vari campioni.



**Figura 7**

In particolare, nel campione 1 sono state ritrovate solo 2 specie, *Candida stellata* che costituisce il 92% degli isolati di tale campione e *Issatchenkia terricola* che costituisce l'8%. Tuttavia, se si tiene conto anche dei profili RAPD che sono stati rilevati fra gli isolati di ciascun campione (figura n. 8), si deve ritenere che in realtà la diversità microbica è ben più ampia. Tale situazione si evidenzia in tutti i campioni analizzati; l'unico campione in cui è stato ritrovato per ciascuna specie un unico biotipo è stato il campione 6, dove i due isolati appartenevano alle specie *Hanseniaspora guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae*. I campioni in cui è stato possibile evidenziare la maggiore variabilità a livello di specie sono stati il 2 e il 3 e sono stati quelli in cui era presente anche il maggior numero di ceppi. Considerando che questi due campioni corrispondono alle prime fasi della fermentazione, si può affermare che essi, con la diversità microbica che li caratterizza, hanno contribuito in maniera marcata all'andamento del processo considerato.



Le osservazioni microscopiche eseguite, come indicato, partendo da colture su Yeast Morphology Agar, hanno confortato i risultati relativi all'identificazione speciografica delle colture, realizzate adottando le procedure molecolari descritte, nel senso che tutti gli isolati rapportati alla stessa specie hanno mostrato la stessa morfologia, e che le morfologie rilevate sono risultate del tutto coerenti con quanto descritto in letteratura per le entità microbiche identificate. Immagini relative a ciascuna delle specie rinvenute in questo lavoro sono riportate di seguito con la descrizione di ognuna delle stesse specie.

E' ben noto che la trasformazione del mosto d'uva in vino è un processo biochimico piuttosto complesso al quale partecipano, nelle fermentazioni spontanee, diverse specie microbiche. Di questi microrganismi, i lieviti sono i principali responsabili della fermentazione alcolica. La microbiologia del vino e l'origine dei lieviti indigeni sono state ampiamente studiate e si sa ormai che sono due le possibili fonti dei lieviti del vino: il vigneto (che include i grappoli) e la cantina (che include le varie attrezzature e le superfici delle vasche di fermentazione). Alcuni dei più comuni lieviti selvaggi presenti sui grappoli sono *Hanseniaspora uvarum* (e la sua forma imperfetta *Kloeckera apiculata*) e quelli dei generi *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* e *Hansenula* (Fleet e Heard, 1993). Tuttavia il numero di specie e la loro presenza durante la fermentazione dipendono dall'area di produzione (Amerine e Kunkee, 1968), dal processo

tecnologico (Cuinier, 1978) e dal tipo di vino prodotto (Poulard, 1984). *Saccharomyces cerevisiae*, il principale agente della fermentazione alcolica, è assente o raramente presente sui grappoli d'uva, ma è associato all'ambiente di cantina ed è incorporato nel mosto durante la fermentazione (Longo *et al.*, 1991).

I lieviti non-*Saccharomyces* crescono bene durante le prime fasi della fermentazione, quando la concentrazione di etanolo è ancora bassa, lasciando successivamente il posto ai *Saccharomyces*, che dominano l'intero corso della fermentazione (Amerine *et al.*, 1982; Lafon-Lafourcade, 1983; Querol *et al.*, 1990. Tuttavia non sempre gli studi sono stati concordi circa tale situazione, infatti in uno studio effettuato da Beltran *et al.* (2002) è stato riportato che i lieviti non-*Saccharomyces* erano i microrganismi più ricorrenti nel mosto, probabilmente perché essi sono presenti sui grappoli d'uva e nel vigneto, dove i lieviti *Saccharomyces* sono generalmente assenti. In un'altro studio di identificazione molecolare di lieviti del vino in due aree della Grecia (Pramateftaki *et al.*, 2000) è stato riportato che le specie non-*Saccharomyces* erano favorite, nella fermentazione spontanea, sia quantitativamente che qualitativamente. Tali differenze nella popolazione dei lieviti naturali, con le informazioni riportate in letteratura, potevano essere attribuite ai ben noti parametri che influenzano la diversità della microflora dell'uva: la varietà dell'uva, l'area geografica, le condizioni climatiche e le pratiche viticole ed enologiche (Parrish e Carrol, 1995;

Heard e Fleet, 1988; Mora *et al.*, 1988; Longo *et al.*, 1991). Nel 1984 Fleet *et al.* avevano riportato che i lieviti non-*Saccharomyces* fornivano un contributo fondamentale alla fermentazione, dal momento che raggiungevano popolazioni di circa  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml; nel 2002 Nurgel *et al.* hanno evidenziato una notevole crescita dei non-*Saccharomyces* fino alla fine della fermentazione tumultuosa. È stato inoltre riportato che valori elevati di tali popolazioni esercitassero una notevole influenza sulla composizione del vino, ma anche sullo sviluppo dei *Saccharomyces*, dal momento che i cambiamenti chimici del vino prodotti dai non-*Saccharomyces* influenzano sia la cinetica che il metabolismo di *Saccharomyces* (Lema *et al.*, 1996).

Nel presente studio, come precedentemente descritto, le specie più abbondanti nel corso della fermentazione spontanea sono state le specie non-*Saccharomyces*, nell'ambito delle quali, *Hanseniaspora guilliermondii* ha avuto una netta predominanza, seguita da *Issatchenkia terricola* e *Candida stellata*. In alcuni studi (Longo *et al.*, 1991; Fleet e Heard, 1993; Schütz e Gafner, 1994; Constantí *et al.*, 1997, 1998) *Hanseniaspora uvarum* è stata riportata come la specie più abbondante tra i non-*Saccharomyces*, in altri (Torija *et al.*, 2001) *Candida stellata* era la principale specie dei non-*Saccharomyces* ed era presente anche negli ultimi stadi della fermentazione. *Issatchenkia terricola* è stata ritrovata, seppure in

basse quantità, nei mosti di Bordeaux e scompariva rapidamente all'inizio della fermentazione (Mora *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda *Saccharomyces cerevisiae* la bassa ricorrenza registrata nel presente lavoro potrebbe essere imputata a diverse cause. *Saccharomyces cerevisiae* è un lievito presente generalmente nell'ambiente di cantina e non si rinviene normalmente su grappoli d'uva, ciò potrebbe spiegare la maggiore frequenza dei non-*Saccharomyces*. Inoltre risulta abbastanza difficile scoprire tale lievito nei mosti senza l'uso di tecniche di arricchimento (Gafner *et al.*, 1997). A tutto ciò si può aggiungere la mortalità che per tale microrganismo può essersi verificata in seguito al congelamento dei campioni. È infatti noto che l'abbassamento di temperatura determina alterazioni della struttura e del metabolismo microbico, provocando la morte della maggior parte dei germi presenti (Mazur, 1961, 1967).

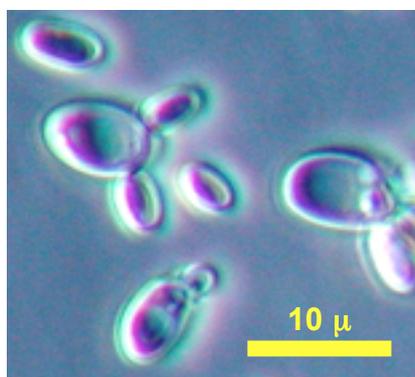
Come rilevato in impasti congelati, dove per *Saccharomyces cerevisiae* è stata registrata una mortalità del 99,9% (Anastasio *et al.*, 2003), allo stesso modo il congelamento del mosto potrebbe aver ridotto enormemente il già basso numero di partenza.

Diverso può essere stato il caso dei non-*Saccharomyces* nei quali la mortalità, quasi sicuramente presente, ha comunque consentito di evidenziare cariche notevoli, molto probabilmente perché partivano da una

carica iniziale elevata. Tuttavia non si può escludere una loro maggiore resistenza al congelamento rispetto ai *Saccharomyces*.

Le specie rinvenute in questo studio possiedono le caratteristiche qui di seguito riportate.

***Candida stellata*** (Kroemer e Krumbholz) Meyer e Yarrow 1978



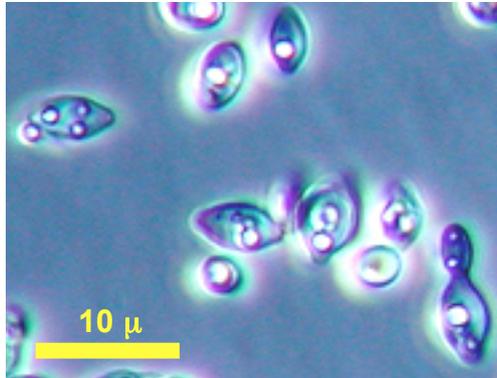
Si tratta di un lievito asporigeno (imperfetto), in cui la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multilaterale. Le cellule vegetative sono rotonde e si hanno formazioni cellulari a stella per aggregazione da gemmazione polare. Le colonie sono generalmente bianche, non vi è la presenza di filamenti. Fermenta il glucosio, il saccarosio e il raffinoso. Come fonte di carbonio è in grado di assimilare il saccarosio e il raffinoso; come fonte di azoto utilizza la lisina. È una specie ritrovata abbastanza frequentemente nei mosti e nei vini. Mora *et al.* (1988) in uno studio sulla microflora dei lieviti associata ad alcuni mosti e vini Majorcani hanno

rilevato *Candida stellata* predominante in tutti i campioni analizzati. È stato ritrovato abbondante anche in altre aree viticole (Fleet *et al.*, 1984; Sapis-Domercq e Guittard, 1976; Soufleros *et al.*, 1979). Il contributo significativo di questa specie alla fermentazione è stato segnalato anche da Torija *et al.* (2001) che la ritrovavano perfino nelle ultime fasi della fermentazione. Alcuni Autori (Benda, 1981; Lafon-Lafourcade, 1983) pensano che la presenza e la crescita di *Candida stellata* sia incoraggiata nel mosto con alte concentrazioni di zucchero e la sua persistenza nel vino rosso potrebbe essere dovuta alla pratica di macerazione durante il processo. Altri sostengono che la sua continua presenza nel mosto sia dovuta alla capacità di tollerare il 10-12% di etanolo (A. Bertrand e E. Soufleros, Ph. D. theses *et al.*, Université de Bordeaux II, Talence, Francia, 1975 e 1978).

*Candida stellata* può influenzare notevolmente la qualità del vino in quanto produce acido acetico, etile-lattato e metil-2-propanolo, che se presenti nelle opportune concentrazioni contribuiscono al flavour del vino.

La specie, oltre che nel mosto e nel vino, è stata ritrovata sui grappoli d'uva, nel suolo e sui moscerini della frutta.

***Hanseniaspora guilliermondii*** (Pijper, 1982)



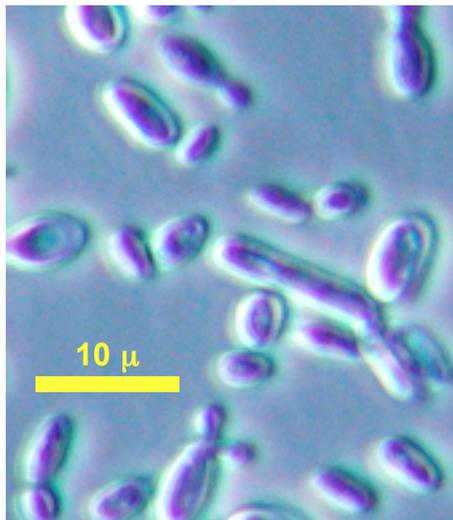
È la forma perfetta di *Kloeckera apis*. La riproduzione vegetativa avviene per gemmazione bipolare; gli aschi sono evanescenti e contengono 1-4 ascospore a forma di elmetto. Le cellule vegetative sono limoniformi apiculate, le colonie sono generalmente bianche. Fermenta solo il glucosio e può utilizzare come fonte di carbonio il cellobiosio, come fonte di azoto la lisina. È stata ritrovata frequentemente nel succo d'uva, nel mosto, in diversi frutti, nel suolo, nelle bottiglie di pomodoro e nei datteri.

Nel 1954 Castelli rilevò che in Puglia, Calabria, Sicilia, Molise, Campania, così come in altri paesi mediterranei, nei mosti in fermentazione, soprattutto quelli delle zone litoranee, i lieviti apiculati erano rappresentati in maggioranza non da *Kloeckera apiculata* ma da *Hanseniaspora guilliermondii*.

*Hanseniaspora guilliermondii* ha caratteristiche enologiche differenti da *Kloeckera apiculata*: come quest'ultima produce alte quantità di acido

acetico ma è più resistente all'anidride solforosa e più alcool tollerante (Cantarelli, 1955).

***Issatchenkia orientalis*** (Kudriavzev)



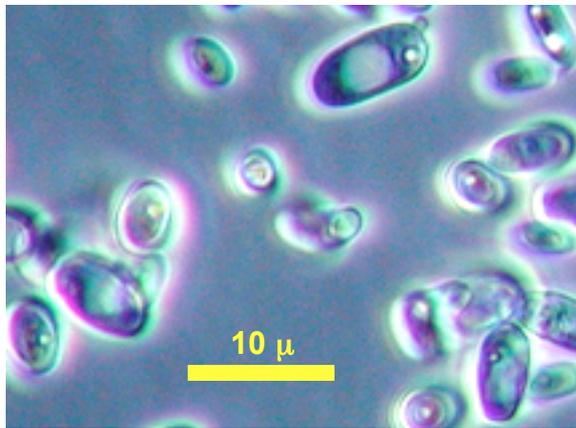
Si tratta di un lievito sporigeno; è la forma perfetta di *Candida krusei*. Le cellule sono ovoidali o allungate e singole o in corte catene. Le colonie sono generalmente bianche o color crema, la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multilaterale; presenta pseudoife semplici o ramificate, gli aschi sono persistenti e contengono 1 o 2 ascospore sferoidali con superficie ruvida o liscia.

Fermenta il glucosio; può utilizzare come fonte di carbonio l'acido succinico, l'acido citrico, il lattato, l'etanolo, il glicerolo; come fonte di azoto la lisina.

È stata ritrovata nello yogurt, cacao, suolo, marmellata e recentemente da Pallmann *et al.* (2001) nel mosto.

Fleet *et al.* (1984) hanno rilevato che *C. krusei* determina aumenti dei livelli di acido acetico, esteri e alcoli superiori nel vino.

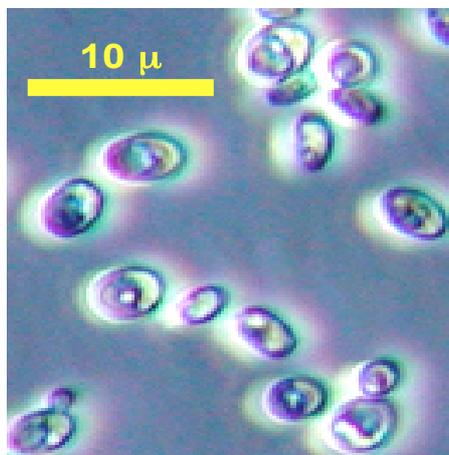
***Issatchenkia terricola*** (van der Walt) Kurtzman *et al.*



Si tratta di un lievito sporigeno in cui la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multilaterale. Le cellule sono ovoidali o allungate; le colonie sono generalmente bianche o color crema; presenta pseudoife semplici e ramificate; gli aschi sono persistenti e contengono 1-2 ascospore sferoidali con superficie liscia o rugosa. Fementa il glucosio e il galattosio; come fonte di carbonio può utilizzare l'acido succinico, l'acido citrico, il glicerolo, l'etanolo; come fonte di azoto la lisina.

Tale specie è stata rinvenuta nel suolo, nel succo di ciliegia, nei pesci, nel mare, ma anche nel mosto e nel vino, come riportato da Fleet *et al.* (1984).

***Saccharomyces cerevisiae*** Meyen ex Hansen (1883)



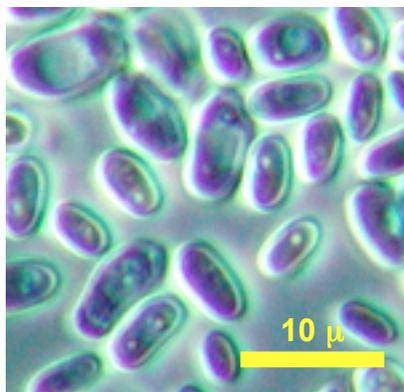
Le cellule vegetative possono essere globose o subglobose, ellittiche o cilindriche, talvolta possono essere anche molto lunghe (oltre 30  $\mu\text{m}$ ) e possono dare origine a pseudoife anche ramificate. Le cellule possono essere singole, appaiate o riunite per formare corte catene o aggregati. All'atto della sporificazione le cellule si trasformano direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 spore globose o ellittiche. La specie è dotata di vigorosissima attività fermentativa, è alcool tollerante ed è sempre stato

considerato il lievito più importante in assoluto, tanto che, di norma, la parola generica “lievito” senza nessun'altra precisazione sottintende questa specie. Per quanto concerne la fermentazione di galattosio, saccarosio, maltosio, raffinoso e amido il comportamento non è costante. Non è in grado di utilizzare la lisina come fonte di azoto.

Tale specie è stata rinvenuta nel vino, nel mosto, nella birra, nel sidro, nel formaggio, nel succo e mosto di pera, nel succo di mela, nel Kefyr, nel vino di palma, nel miele, nelle olive, nei soft drinks, nello zucchero di canna, nei succhi di frutta, nel suolo, sulla pelle dell'uomo.

Numerosi studi sono stati effettuati su *Saccharomyces cerevisiae* vista la sua notevole importanza nel settore enologico. Tali studi hanno riguardato soprattutto diversi ceppi di questa specie, molti dei quali sono stati isolati da varie fermentazioni di vino, e si è supposto che le caratteristiche del vino possono essere influenzate dal particolare ceppo che conduce la fermentazione. Questo perché ceppi diversi producono diverse concentrazioni di costituenti del flavour e dell'aroma, come l'acido acetico, gli esteri, gli alcoli superiori ed altri composti volatili (Eschenbruch *et al.*, 1978; Rankine, 1968, 1972; Shimazu e Watanave, 1981; Soles *et al.*, 1982; Sponholz e Dittrich, 1974; Usseglio – Tomasset e Stefano, 1981).

***Zygosaccharomyces bailii*** (Lindner) Guilliermond (1912)

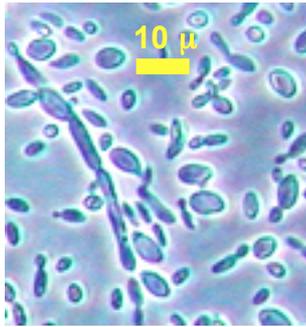


Le cellule vegetative sono globose, ellittiche o cilindriche, la riproduzione vegetativa avviene per gemmazione multilaterale; possono essere formate pseudoife semplici. Le cellule sono prevalentemente aploidi; la sporificazione, di norma, è preceduta da coniugazioni tra cellule, raramente tra cellule e rispettive gemme. L'unione di due cellule vegetative genera uno zigote con morfologia detta a manubrio. Fermenta il glucosio; utilizza la lisina come fonte di azoto. È scarsamente sensibile all'anidride solforosa. È dotato di elevato potere fermentativo che lo rende tra i lieviti di maggiore importanza sotto l'aspetto enologico.

Una caratteristica particolare di tale specie è l'elevato grado di osmofilia: riesce a svilupparsi a concentrazioni zuccherine superiori al 60% ed è stata spesso isolata dal miele in fermentazione. Secondo Verona tale specie può essere utilmente impiegata per la realizzazione delle fermentazioni scalari. Si rinviene nei mosti fermentanti spontaneamente anche se in subordine al

ben più vigoroso *Saccharomyces cerevisiae*, nel succo di mela, nella maionese, nel vino, nei succhi di frutta concentrati, nel sidro di pere, nell'aceto, nei sottaceti.

### **Zygoascus hellenicus**



Le cellule sono spesso allungate, a forma di salsiccia o pseudomiceliali, spesso curvate. È evidente un lungo pseudomicelio ramificato. Le colonie sono generalmente bianche o color crema; presenta una gemmazione multilaterale e non è caratterizzato da riproduzione sessuale. Fermenta il glucosio e il saccarosio; può utilizzare come fonte di carbonio il galattosio, il saccarosio, il maltosio, il trealosio, lo xilosio, l'amido solubile, l'etanolo e il glicerolo. Utilizza la lisina come fonte di azoto.

Questa specie, sulla base di quanto già noto, è stata rinvenuta solamente nel mosto.

## **4.2 Monitoraggio dei lieviti ricorrenti nella vinificazione spontanea dell'uva Catalanesca**

### **4.2.1 Catalanesca**

E' un vitigno esclusivamente campano, anzi vesuviano, a buccia bianca. Introdotta da Alfonso I d'Aragona (Gaudio, 1990) nel XIV secolo nelle campagne di Somma, si diffuse successivamente in quasi tutta la Campania. Secondo il Longo (1948), la tardiva e sorbevole "Catalanesca" era coltivata soprattutto a Somma Vesuviana, Santa Anastasia, Ottaviano e sulle pendici del monte Somma ad un'altitudine di m 150-500. L'esposizione al nord, oltre a favorire la produzione dell'uva tardiva, influisce anche sulla conservazione, perché esposta ai venti secchi di tramontana che ostacolano il ristagno dell'aria (Del Giudice, 1912). È coltivata anche nel versante di Resina (Ercolano) e Torre del Greco, ma la maturazione dell'uva avviene con molto anticipo (fine mese di Agosto, inizio Settembre).

La varietà è nota ai più come vitigno da tavola e come tale è iscritta nel Registro Nazionale delle varietà di vite tra i vitigni raccomandati per la Campania e autorizzati per la Sardegna.

Ma da sempre con le uve Catalanesca, nelle cantine vesuviane, è stato anche prodotto un vino, che localmente è molto apprezzato, alimentando le mense di un gruppo di appassionati, che negli anni è andato sempre più

ampliandosi. Stante, però, la registrazione come uva da tavola nell'ambito del catalogo nazionale, le produzioni attualmente in circolazione sono destinate all'autoconsumo e non sono commerciabili. Esistono molteplici diverse lavorazioni artigianali, ricercatissime, nell'alto colle vesuviano, tuttavia è possibile riscontrare il seguente comun denominatore nel Catalanesca prodotto attualmente: colore da verdolino a paglierino, odore vagamente muschiato, sapore marcatamente vinoso.

Ciò ha indotto l'avvio di uno studio finalizzato ad accertare le qualità enologiche del vitigno e la sua attitudine ad essere trasformata in vino e il prossimo passo consisterà nella richiesta di transizione di categoria, con conseguente istanza di denominazione di origine controllata.

Risulta che l'uva Catalanesca è in grado di raggiungere un'elevata gradazione zuccherina ed inoltre l'acidità totale e il pH sono tali da permettere l'ottenimento di un vino bianco secco caratterizzato da un buon equilibrio gustativo. Dal punto di vista aromatico il vino presenta note fruttate con odori tipici di albicocca secca e miele. Già al secondo anno della vendemmia l'odore evolve in note minerali dominate da sentori di kerosene tipici dei vini ottenuti dal vitigno Riesling (Moio, 2002). D'altra parte il pregio enologico delle uve Catalanesca è stato sempre sostenuto da tutti gli ampelografi campani (Pasquarella *et al.*, 2001).

La varietà è da sempre conosciuta con il nome di Catalanesca, *Catalana* o *Uva Catalana*, presenta grappoli medi o al di sopra della media, cilindro-conici, alati, spargoli, con lungo peduncolo.

L'acino è di grandezza uniforme (20-23 mm), cilindroide; la buccia è spessa, coriacea, con scarsa pruina, di colore giallo dorato spesso con punteggiature rossastre; la polpa è consistente e croccante, dolce, poco succosa; i vinaccioli sono presenti e allungati.



**Figura 9**

A causa del raspo molto forte e della buccia coriacea, in molti casi d'imperfetta vinificazione, con fermentazione prolungata del mosto, si può riscontrare un senso asciutto troppo marcato che può perfino risultare come

allappante. Regolando opportunamente la fermentazione e praticando parziali e spesso anche notevoli diraspature, questo inconveniente può essere eliminato ed allora il sapore ed il gusto di questi vini riescono veramente propri.

Il vino Catalanesca quando è fatto a regola d'arte è veramente gustoso: risulta molto profumato e piacevole come sapore, con un gusto vinoso marcato che ha come un lontano senso di muschiato, per quanto può lasciare un lieve senso d'astringente che riesce, però, gradevole.

Le qualità del vino Catalanesca, vitigno che certamente merita di uscire dalla clandestinità enologica per usufruire di una più ampia notorietà e valorizzazione sono state descritte dal Semmola già nel 1848: “ (...) *Matura nella seconda metà di ottobre; ma si conserva lungamente sulla pianta; e tolta da questa e tenuta sospesa in luogo ventilato si conserva per l'inverno. Ottima da tavola. Il vino scarso ma generoso, aromatico e grato: suolsi unire alle altre uve bianche e dà nerbo a questo vino. Molto fruttifero. Si coltiva generalmente più per vendere il frutto in piazza che per far vino, superando in dolcezza e sapore quella di qualunque altro luogo*”.

Per quanto riguarda il clima, (Serao, 1926) tenuto conto che l'Alto Colle Vesuviano si trova ad un'altitudine che varia dai 200 ai 500 m, la maturazione dell'uva, come in genere la vegetazione della vite, subisce le conseguenze della maggiore altitudine in confronto del Basso Colle Vesuviano e quindi un minimo ritardo che si accentua nel versante

setentrionale (Monte Somma). Così si è giustificata, in questi ambienti la coltivazione dell'uva Catalanesca, la quale unisce ai suoi pregi d'uva da tavola quello principale della sua tardiva maturazione e della inoltrata conservazione.

La “Catalanesca” a maturazione tardiva, si conserva bene sulla pianta ed in fruttajo, ovvero sotto tettoie aperte da ogni lato, resiste bene ai trasporti, e per tale caratteristica riveste interesse economico anche al di fuori dell'areale di produzione ove è utilizzato per la vinificazione da solo o con altri vitigni.

Dal mosto di Catalanesca si ricavano anche lambiccati e filtrati dolci i quali, oltre che per consumo diretto, sono usati dall'agricoltore o dal cantiniere napoletano per costituire tipi, per correggere vini scadenti ecc. Il lambiccato si ottiene (Rossi, 1890) da uve pigiate ed il mosto ottenuto viene lasciato fermentare per 24-36 ore. Appena la massa è riscaldata ed alzato il “cappello”, si svina e si torchia la vinaccia.

Il mosto-vino, in seguito, si filtra con sacchi di fitta tela di canapa formati a guisa di cappucci da monaco; il liquido che esce dal filtro è limpido e privo di fecce nei quali, tal volta, per aumentare il potere filtrante, si usa anche versare della sabbia.

Il mosto-vino, così chiarito, si pone nelle botti.

Il prodotto ottenuto, con l'aggiunta di altre uve, forma così tutti quei vini tanto ricercati dai consumatori della provincia di Napoli. Così pure, si

possono bene adoperare le vinacce di Catalanesca per far rifermentare vini scarsi o scadenti ai quali può giovare una maggiore quantità di tannino o riuscire favorevole un certo miglioramento nel gusto.

Il Vesuvio bianco (Giardullo, 1955), vino ottimo da pasto molto conosciuto, si produceva sulle falde meridionali del Vesuvio e precisamente nei territori dei comuni di Somma Vesuviana, Ottaviano, S. Giuseppe, Terzino, Boscotrecase, Resina, TorreAnnunziata; si otteneva dalle uve Catalanesca, Greco bianco e Falanghina, era così costituito: colore giallo paglierino, profumo delicato, asciutto, grado alcolico 11-12%; acidità totale 5-6%, estratto secco 18-19%, sapore neutro aromatico.

I vini bianchi (Fiorito, 1960) sono in maggioranza prodotti con uve di Catalanesca e di Gianniello ( “i vini d’oro” ) o misti con più o meno elevate percentuali di queste vitigni.

Il vitigno “Gianniello” è una sottovarietà o una mutazione della cv Catalanesca.

Nelle terre circostanti la zona della Catalanesca si produce pure un vino rosso che è chiamato <<Lacrjma di Somma>>, fatto con uvaggio misto d’Aglianico, Olivella ecc. e con l’inclusione di Catalanesca o altra uva bianca, vino che riesce di colore chiaro, di profumo tenue, di gusto più amabile.

Nella provincia di Caserta si trova anche la Catalanesca nera, ma non offre particolare interesse.

## 4.2.2 Conteggio delle popolazioni di lievito

La determinazione quantitativa della flora blastomicetica presente nelle diverse fasi del processo di vinificazione è stata effettuata mediante il conteggio delle piastre dei due substrati utilizzati.

Sono riportate di seguito le caratteristiche chimico-fisiche dei vari campioni analizzati.

Parametri chimico-fisici	Campione <sup>a</sup>				
	1	2	3	4	5
Determinazione					
pH	3.27	3.60	3.65	3.85	3.88
°Brix	21.4	20.2	10.8	6.8	6.8
Ac. Tot. g/l	5.08	5.60	5.81	6.18	5.5
Ac. Vol. g/l	0.15	0.31	0.28	0.3	0.45
°Alcol %V/V	-	2.02	9.65	13.2	13.2
PFT mg/l Ac. gallico	297.4	383.2	1041	743.14	1044
SO <sub>2</sub> libera mg/l	-	-	-	8	13.12
SO <sub>2</sub> legata inst. mg/l	-	-	-	8.96	9.6
SO <sub>2</sub> legata stab. mg/l	-	-	-	18.24	32.96
SO <sub>2</sub> Tot mg/l	-	-	-	35.2	55.68

<sup>a</sup>: 1, Mosto appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva; 2, mosto dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio; 3, mosto fiore, dopo 5 giorni, in seguito a svinatura; 4, vino fiore al momento del primo travaso, dopo circa 25 giorni; 5, vino dopo 5 mesi dall'inizio della vinificazione.

I risultati del conteggio, invece, sono riportati nella tabella che segue.

Campione		UFC ml <sup>-1a</sup>	
N.	Natura	YPD Agar	Lysine Agar
1	Mosto appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva	4.35x10 <sup>6</sup>	6.7x10 <sup>6</sup>
2	Mosto dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio	8.40x10 <sup>6</sup>	1.28x10 <sup>7</sup>
3	Mosto fiore, dopo 5 giorni, in seguito a svinatura	1.72x10 <sup>8</sup>	1.50x10 <sup>8</sup>
4	Vino fiore al momento del primo travaso, dopo circa 25 giorni	4.30x10 <sup>6</sup>	3.90x10 <sup>6</sup>
5	Vino dopo 5 mesi dall'inizio della vinificazione.	1.39x10 <sup>5</sup>	< 10

<sup>a</sup>: I dati rappresentano le medie di tre repliche; le deviazioni standard sono inferiori al 20% delle medie.

Come si può osservare, nella fase iniziale della fermentazione spontanea, il mosto fresco, appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva, esibisce una carica iniziale di lieviti, su piastre di YPD, di 4.35x10<sup>6</sup> UFC/ml, che raggiunge il valore massimo di 1.72x10<sup>8</sup> UFC/ml al quinto giorno dall'inizio del processo, che corrisponde alla fase intermedia della fermentazione, per poi subire un calo progressivo nei successivi campioni di vino fino ad arrivare ad un valore di 1.39x10<sup>5</sup> UFC/ml nell'ultimo campione prelevato dopo 5 mesi dall'inizio della vinificazione.

Relativamente alle colonie rilevate su piastre di Lysine agar, nonostante l'andamento generale sia abbastanza simile a quello evidenziato per il substrato YPD, bisogna sottolineare che per tale substrato sono state registrate maggiori differenze nei diversi campioni. Il valore iniziale, già alto ( $6.7 \times 10^6$  UFC/ml) di lieviti non-*Saccharomyces*, ha subito un incremento di una decade appena dopo 24 ore, con un valore pari a  $1.28 \times 10^7$  UFC/ml, per raggiungere un valore massimo di  $1.50 \times 10^8$  UFC/ml, in corrispondenza della svinatura effettuata dopo 5 giorni dall'inizio del processo, subire una riduzione in occasione del primo travaso per poi raggiungere un valore inferiore a 10 UFC/ml nell'ultimo campione.

Le alte popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces*, rilevate fin dall'inizio della fermentazione, si pensa che contribuiscano in maniera significativa all'andamento del processo fermentativo e alle caratteristiche organolettiche del vino, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a  $10^6$ - $10^7$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ , in accordo con quanto riportato da Fleet *et al.* (1984) e da Heard e Fleet (1986). Tuttavia, con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consentendo in tal modo ai lieviti *Saccharomyces*, generalmente dotati di un maggiore potere alcoligeno di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo.

E' noto che, alte popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* influenzano fortemente lo sviluppo di *Saccharomyces*, che, non saranno in grado di raggiungere tassi di crescita molto elevati, in quanto si troveranno a svilupparsi in un ambiente con una ridotta concentrazione di nutrienti (principalmente azoto) e fattori di crescita (vitamine, acidi grassi e steroli), lasciato dai lieviti non-*Saccharomyces*. L'azione inibente che uno sviluppo numericamente consistente delle popolazioni di lieviti non-*Saccharomyces* esercita sullo sviluppo della popolazione di lieviti *Saccharomyces* ha una notevole conseguenza pratica sull'ecologia del processo e, probabilmente, sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finito: infatti, la quantità e la tipologia degli zuccheri fermentati da *S. cerevisiae* può essere sensibilmente diversa da caso a caso.

In accordo con i risultati riportati nella vinificazione del Primitivo di Manduria, la presenza della sola microflora indigena, numericamente elevata, ha consentito l'avvio, in tempi abbastanza brevi, della fermentazione del mosto in vino.

Dalle piastre di YPD e di Lysine Medium sono state isolate complessivamente 161 colture di lieviti, che sono state sottoposte ad identificazione mediante l'utilizzo di metodi molecolari.

La tabella che segue riporta informazioni relative al campione, alla diluizione dell'inoculo ed al substrato.

<b>Campione</b>	<b>Substrato</b>	<b>Esponente diluizione</b>	<b>N° di isolati</b>
1) Mosto appena ottenuto dalla pigia-diraspatura dell'uva	YPD	-3	12
		-4	13
		-5	9
	LM	-3	1
		-4	13
		-5	6
2) Mosto dopo 24 ore, in seguito a rimontaggio	YPD	-5	6
	LM	-4	4
		-5	7
3) Mosto fiore, dopo 5 giorni, in seguito a svinatura	YPD	-4	7
		-5	10
	LM	-4	11
		-5	12
4) Vino fiore al momento del primo travaso, dopo circa 25 giorni	YPD	-4	2
		-5	7
	LM	-1	4
		-2	4
		-5	5
5) Vino dopo 5 mesi dall'inizio della vinificazione.	YPD	-2	6
		-3	15
		-4	7

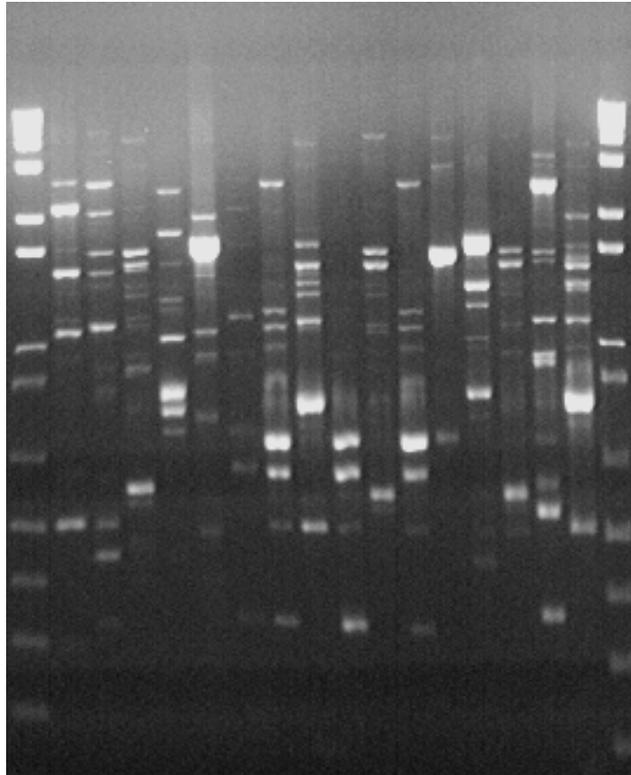
### **4.2.3 Identificazione delle colonie di lieviti mediante sequenziamento dei domini D1/D2 del 26S rDNA**

In questo lavoro di ricerca sperimentale, la tecnica RAPD-PCR è stata scelta come prima analisi da applicare a tutti gli isolati, in quanto, dalle informazioni disponibili in letteratura, essa rappresenta un'indagine in grado di differenziare ceppi appartenenti ad una stessa specie (Busse *et al.*, 1996), per tipizzare i microrganismi, nonché analizzare dinamiche di popolazione e la dominanza di ceppi all'interno di un ecosistema (Williams *et al.*, 1990). In altre parole, nell'ambito di popolazioni microbiche, tassonomicamente correlate, mediante l'impiego dell'analisi RAPD-PCR è possibile tipizzare ceppi microbici appartenenti alla stessa specie ed ottenere profili RAPD-PCR che, con buona probabilità, risultano ceppo-specifici. Infatti, nell'ambito di una stessa specie, i ceppi microbici possono presentare profili elettroforetici (pattern) RAPD-PCR differenti, ma nell'ambito di uno stesso gruppo RAPD-PCR, difficilmente i ceppi appartengono a differenti specie microbiche. Ecco perché applicando la tecnica RAPD-PCR come analisi preliminare su tutti i ceppi isolati, è stato possibile identificare i biotipi identici e ridurre notevolmente il numero di isolati da sottoporre, in un secondo momento, all'identificazione tramite sequenziamento del 26S rDNA.

L'identificazione dei lieviti presenti nelle diverse fasi della vinificazione della Catalanesca, è stata effettuata tramite sequenziamento della regione 26S rDNA comprendente i domini variabili D1/D2. A tale scopo, si è proceduto all'estrazione del DNA genomico da tutti i 161 ceppi isolati, mediante l'utilizzo dell'InstaGene<sup>TM</sup> Bio-Rad Matrix e successivamente all'analisi RAPD-PCR di tutti gli isolati. Il primer che è stato utilizzato è stato l'XD5, in quanto, dal precedente lavoro era risultato quello in grado di differenziare meglio gli isolati analizzati.

I 161 isolati sottoposti ad analisi RAPD-PCR hanno fornito 42 profili elettroforetici diversi. Essi sono mostrati nelle figure seguenti.

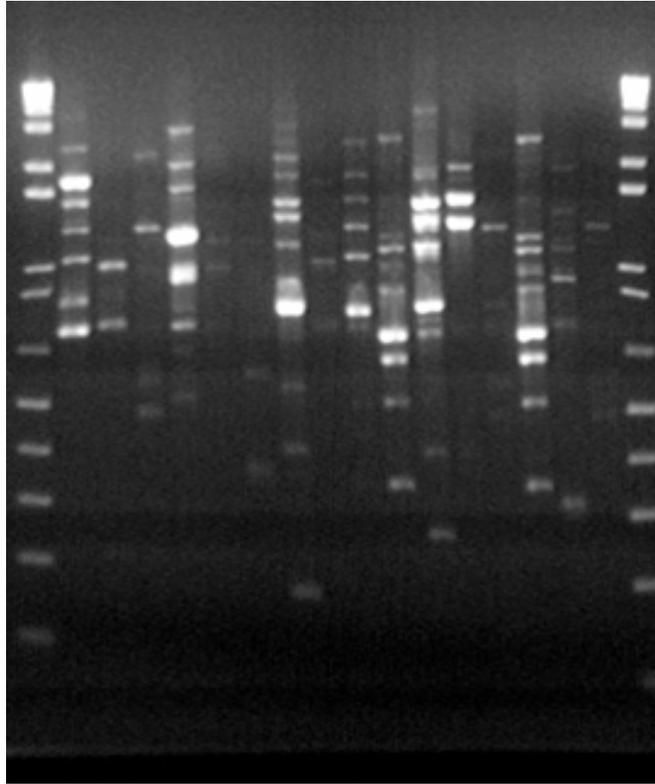
m A B C D E F G H I C G L M C O P m



**Figura 10a:** Profili RAPD-PCR rilevati in questo studio.

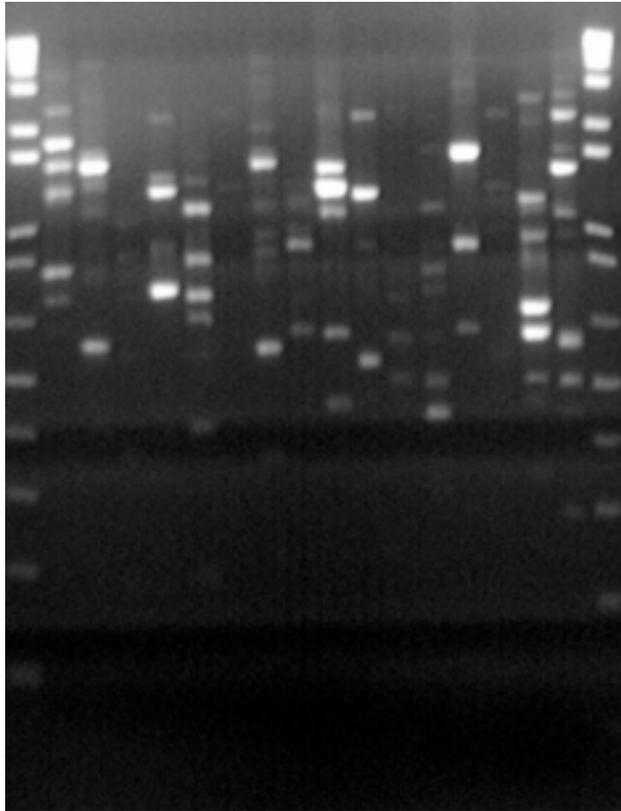
Su ogni lane è riportata l'indicazione del profilo.  
m, marker di pesi molecolari DNA 1 kb ladder plus (Invitrogen). A, isolato 3Y43b; B, 1Y32a; C, 4Y52b; D, 1L45b; E, 3Y43a; F, 3Y41b; G, 5Y42b; H, 3L42a; I, 5Y38a; C, 4L51b; G, 5Y43b; L, 3L42b; M, 1L44a; C, 4Y53a; O, 3L47b; P, 3L51b

m Q LA AAR J S T DA UGV W EA GFAN m



**Figura 10b** - Profili RAPD-PCR più rappresentativi rilevati in questo studio. Su ogni lane è riportata l'indicazione del profilo. M, marker di pesi molecolari DNA 1 kb ladder plus (Invitrogen). Q, isolato 1Y52a; LA, 3L54b; AA, 1Y44a; R, 4L11a; J, 1Y36a; S, 5Y41a; T, 1L52b; DA, 3L46b; U, 1L41b; G, 5Y23a; V, 2L44a; W, 2L51a; EA, 1Y57a; G, 5Y41b; FA, 1L51b; N, 2Y59a.

m Y X MA BA CA NA X GA K HA IA OA JA N KA PA m



**Figura 10c** - Profili RAPD-PCR più rappresentativi rilevati in questo studio.

Su ogni lane è riportata l'indicazione del profilo. m, marker di pesi molecolari DNA 1 kb ladder plus (Invitrogen). Y, isolato 1Y44b; X, 4L22a; MA, 2L55b; BA, 1Y47a; CA, 4L12a; NA, 3Y44a; X, 5Y31a; GA, 1Y51a; K, 1Y43a; HA, 2Y55a; IA, 3L52a; OA, 2Y55b; JA, 3L55b; N, 2Y54b; KA, 5Y35a; PA, 2L41a.

Nella tabella che segue sono indicati i profili RAPD degli isolati di ogni campione:

<b>ISOLATO</b>	<b>SUBSTRATO e DILUIZIONE</b>	<b>PATTERN RAPD</b>
<b>Campione 1: mosto appena pigiato</b>		
1Y31a	YPD -3	A
1Y32a	YPD -3	B
1Y33a	YPD -3	A
1Y34a	YPD -3	BA
1Y35a	YPD -3	A
1Y36a	YPD -3	J
1Y31b	YPD -3	A
1Y32b	YPD -3	D
1Y33b	YPD -3	A
1Y34b	YPD -3	H
1Y35b	YPD -3	AA
1Y36b	YPD -3	A
1IL31b	LM -3	J
1Y41a	YPD -4	D
1Y42a	YPD -4	D
1Y43a	YPD -4	K
1Y44a	YPD -4	AA
1Y47a	YPD -4	BA
1Y41b	YPD -4	H
1Y42b	YPD -4	D
1Y43b	YPD -4	A
1Y44b	YPD -4	Y
1Y45b	YPD -4	DA
1Y46b	YPD -4	DA
1Y47b	YPD -4	AA

1Y48b	YPD -4	AA
1L41a	LM -4	DA
1L42a	LM -4	D
1L43a	LM -4	EA
1L44a	LM -4	M
1L41b	LM -4	U
1L42b	LM -4	A
1L43b	LM -4	D
1L44b	LM -4	A
1L45b	LM -4	D
1L46b	LM -4	FA
1L47b	LM -4	AA
1L48b	LM -4	A
1L49b	LM -4	D
1Y51a	YPD -5	GA
1Y52a	YPD -5	Q
1Y53a	YPD -5	AA
1Y55a	YPD -5	J
1Y56a	YPD -5	B
1Y57a	YPD -5	EA
1Y51b	YPD -5	D
1Y52b	YPD -5	AA
1Y54b	YPD -5	AA
1L51a	LM -5	A
1L52a	LM -5	EA
1L53a	LM -5	AA
1L51b	LM -5	FA
1L52b	LM -5	T
1L53b	LM -5	AA
<b>Campione 2: mosto dopo 24 ore</b>		
2L41a	LM -4	PA
2L42a	LM -4	A

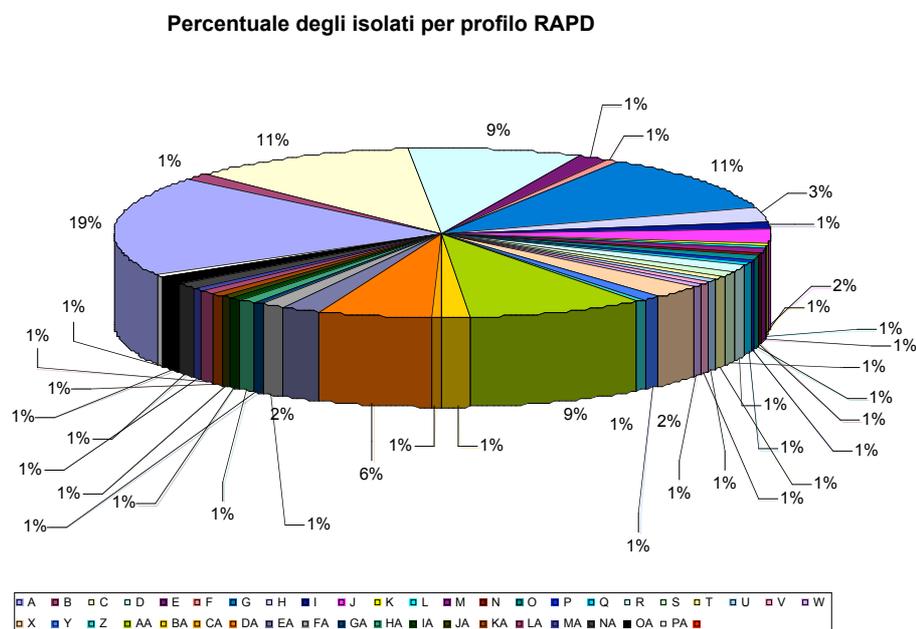
2L44a	LM -4	V
2L46a	LM -4	NA
2Y55a	YPD -5	HA
2Y59a	YPD -5	N
2Y51b	YPD -5	A
2Y52b	YPD -5	A
2Y54b	YPD -5	N
2Y55b	YPD -5	OA
2L51a	LM -5	W
2L52a	LM -5	A
2L55a	LM -5	D
2L51b	LM -5	A
2L52b	LM -5	D
2L54b	LM -5	MA
2L55b	LM -5	MA
<b>Campione 3: mosto dopo 5 giorni</b>		
3Y42a	YPD -4	E
3Y43a	YPD -4	E
3Y44a	YPD -4	NA
3Y45a	YPD -4	A
3Y41b	YPD -4	F
3Y43b	YPD -4	A
3Y44b	YPD -4	A
3L42a	LM -4	H
3L43a	LM -4	H
3L44a	LM -4	A
3L45a	LM -4	DA
3L46a	LM -4	H
3L41b	LM -4	DA
3L42b	LM -4	L
3L43b	LM -4	DA
3L44b	LM -4	DA

3L46b	LM -4	DA
3L47b	LM -4	O
3Y51a	YPD -5	A
3Y52a	YPD -5	DA
3Y53a	YPD -5	AA
3Y54a	YPD -5	C
3Y55a	YPD -5	C
3Y51b	YPD -5	D
3Y52b	YPD -5	A
3Y54b	YPD -5	A
3Y55b	YPD -5	C
3Y56b	YPD -5	AA
3L51a	LM -5	A
3L52a	LM -5	IA
3L53a	LM -5	D
3L55a	LM -5	J
3L56a	LM -5	AA
3L57a	LM -5	D
3L51b	LM -5	P
3L53b	LM -5	A
3L54b	LM -5	LA
3L55b	LM -5	JA
3L56b	LM -5	A
3L57b	LM -5	AA
<b>Campione 4: vino dopo il primo travaso</b>		
4Y41a	YPD -4	X
4Y42a	YPD -4	X
4L11a	LM -1	R
4L12a	LM -1	CA
4L13a	LM -1	R
4L14a	LM -1	A
4L21a	LM -2	A

4L22a	LM -2	X
4L23a	LM -2	A
4L31b	LM -2	A
4Y51a	YPD -5	A
4Y52a	YPD -5	C
4Y53a	YPD -5	C
4Y54a	YPD -5	C
4Y51b	YPD -5	C
4Y52b	YPD -5	C
4Y53b	YPD -5	C
4L51a	LM -5	C
4L52a	LM -5	C
4L51b	LM -5	C
4L52b	LM -5	C
4L53b	LM -5	C
<b>Campione 5: vino dopo 5 mesi</b>		
5Y21a	YPD -2	G
5Y22a	YPD -2	G
5Y23a	YPD -2	G
5Y21b	YPD -2	G
5Y22b	YPD -2	G
5Y23b	YPD -2	G
5Y31a	YPD -3	X
5Y32a	YPD -3	C
5Y33a	YPD -3	G
5Y34a	YPD -3	G
5Y35a	YPD -3	KA
5Y36a	YPD -3	G
5Y37a	YPD -3	G
5Y38a	YPD -3	I
5Y31b	YPD -3	C
5Y32b	YPD -3	C
5Y33b	YPD -3	C
5Y34b	YPD -3	G

5Y35b	YPD -3	S
5Y36b	YPD -3	G
5Y37b	YPD -3	I
5Y41a	YPD -4	S
5Y43a	YPD -4	G
5Y44a	YPD -4	G
5Y41b	YPD -4	G
5Y42b	YPD -4	G
5Y43b	YPD -4	G
5Y44b	YPD -4	G

Nella figura seguente è riportata la frequenza con cui i 42 pattern ricorrono in tutti gli isolati dei 5 campioni sottoposti ad analisi.



**Figura 11**

Come si può osservare, i profili A, C, G, D, AA, DA sono quelli che ricorrono maggiormente, comprendendo un totale di 31, 18, 18, 14, 14 e 9 ceppi rispettivamente.

In particolare, i ceppi mostranti il profilo elettroforetico RAPD-PCR A sono stati ritrovati in percentuale dominante nei campioni 1, 2 e 3; in percentuale inferiore nel campione 4 e sono risultati completamente assenti nel campione 5.

Numericamente più importante dopo il profilo A, si ritrova il profilo G con l'11,2% dei ceppi totali. I ceppi ascrivibili a tale profilo sono presenti esclusivamente nel campione 5 con il 64% degli isolati.

Un altro profilo interessante è il pattern C che conta il 10,6% dei ceppi totali. Esso è presente negli ultimi tre campioni e il contributo maggiore è fornito dal campione 4 con il 49% degli isolati. È invece assente nei campioni 1 e 2.

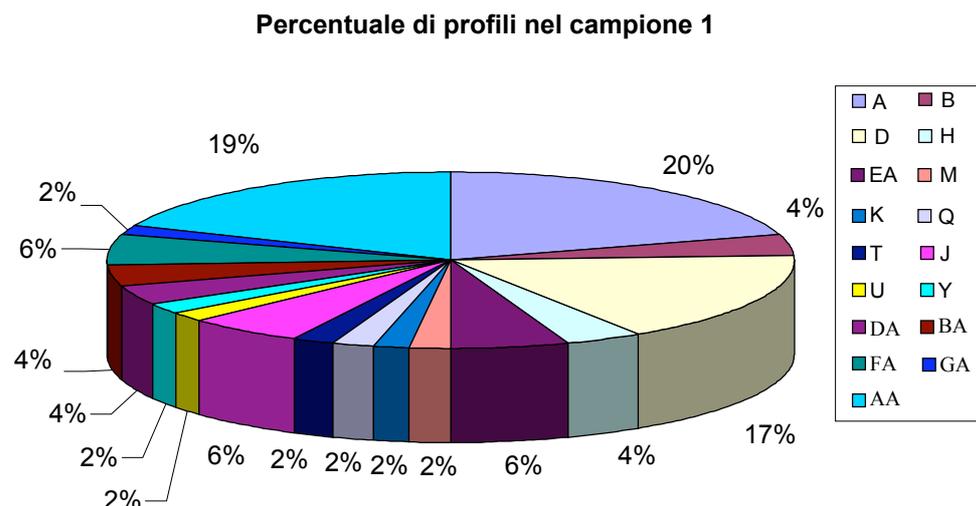
Passando dai campioni iniziali a quelli finali, il numero di isolati ascrivibili al profilo D subisce un progressivo declino fino a risultare assenti nei campioni 4 e 5.

I profili elettroforetici AA e DA sono rappresentati esclusivamente nei campioni 1 e 3, presentando la maggiore percentuale nel campione 1 e nel campione 3 rispettivamente.

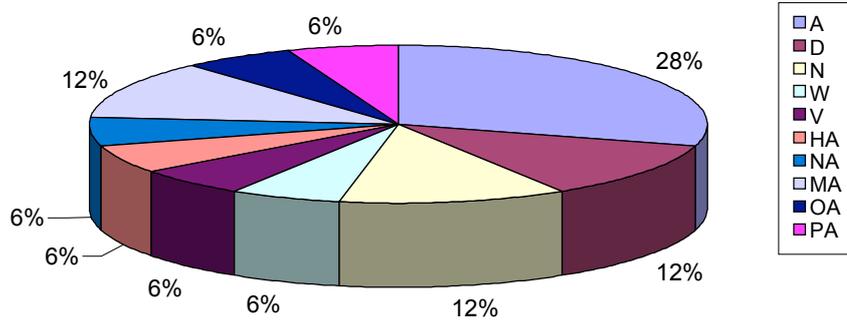
Non bisogna tuttavia trascurare la ricorrenza degli altri pattern per i quali è stato rilevato un isolato o pochi in più, ma che nel totale costituiscono comunque una buona percentuale.

Tra i vari campioni quelli che hanno mostrato la maggiore variabilità dei profili sono stati i campioni 1, 2 e 3, in cui sono stati ritrovati rispettivamente 17, 10 e 16 profili RAPD-PCR diversi. Bisogna però tenere anche conto del fatto che il numero di isolati per campione non è omogeneo; in particolare, negli ultimi, esso è notevolmente ridotta rispetto a quelli iniziali.

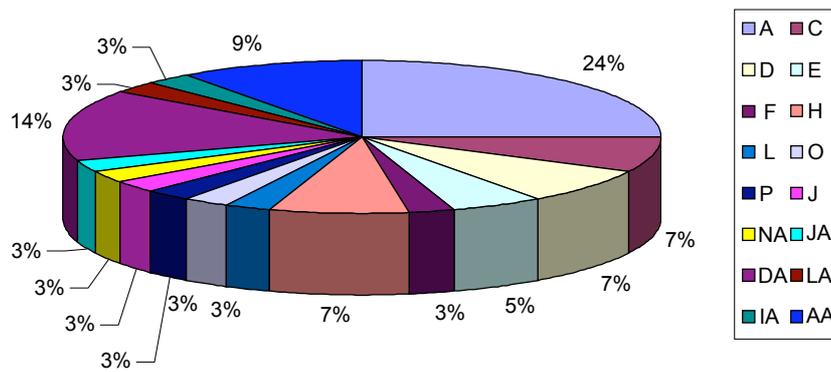
Nei grafici seguenti è riportata la percentuale dei profili nei singoli campioni.



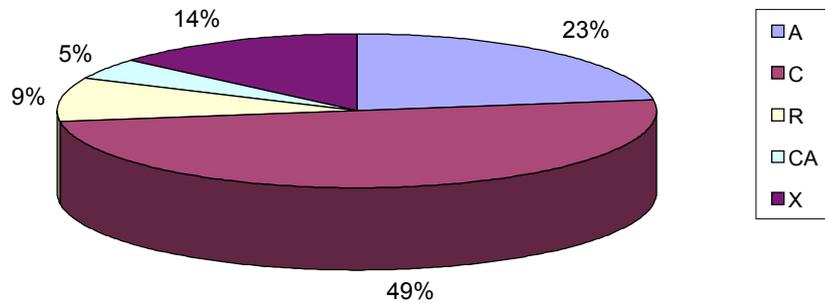
Percentuale di profili nel campione 2



Percentuale di profili nel campione 3



Percentuale di profili nel campione 4



### Percentuale dei profili nel campione 5



Per ciascuno dei 42 pattern RAPD è stato scelto un rappresentante che è stato sottoposto al sequenziamento del 26S rDNA. Le sequenze così ottenute sono state inserite nel database della GeneBank del National Center of Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997) per compararle con le sequenze note del 26S rDNA già depositate.

I risultati dell'identificazione speciografica ottenuti sono riportati nella tabella che segue:

Identificazione delle specie di lieviti mediante sequenziamento del 26S rDNA						
Isolato	Pattern RAPD	Campione <sup>a</sup>	Mezzo	Closest relative	% Omologia	Accession no.
1Y32a	B	1	YPD	<i>Candida stellata</i>	100%	AY394855
1Y36a	J	1	YPD	<i>Pichia kluyveri</i>	99%	AJ746339
1Y43a	K	1	YPD	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	100%	AJ973101
1Y44a	AA	1	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	U84229
1Y44b	Y	1	YPD	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%	U76345
1Y47a	BA	1	YPD	<i>Candida diversa</i>	99%	U71064
1Y51a	GA	1	YPD	<i>Pichia kluyveri</i>	99%	AJ746339
1Y52a	Q	1	YPD	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%	U76345
1Y57a	EA	1	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	U84229
1L41b	U	1	LM	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%	U76345
1L44a	M	1	LM	<i>Candida sp.</i>	99%	AY520361
1L45b	D	1	LM	<i>Issatchenkia terricola</i>	99%	U76345
1L51b	FA	1	LM	<i>Candida sp.</i>	99%	AY242304
1L52b	T	1	LM	<i>Candida sp.</i>	98%	AY452050
2Y54b	N	2	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	94%	AF 257273

2L44a	V	2	LM	<i>Candida sp.</i>	98%	AY452050
2L51a	W	2	LM	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100%	AY 707865
2Y59a	Z	2	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	U84229
2Y55b	OA	2	YPD	<i>Candida stellata</i>	100%	AY 394855
2L41a	PA	2	LM	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	99%	U76348
2Y55a	HA	2	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	U84229
2L55b	MA	2	LM	<i>Issatchenkia hanoiensis</i>	99%	AY163900
3Y41b	F	3	YPD	<i>Pichia kluyveri</i>	99%	AJ746339
3Y43a	E	3	YPD	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	100%	U76348
3Y44a	NA	3	YPD	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	U84229
3Y43b	A	3	YPD	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	100%	U76348
3L42a	H	3	LM	<i>Candida sp.</i>	97%	AY452050
3L42b	L	3	LM	<i>Candida sorboxylosa</i>	99%	U62314
3L46b	DA	3	LM	<i>Candida sp.</i>	99%	AY242304
3L47b	O	3	LM	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	99%	AJ508558
3L51b	P	3	LM	<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	97%	AJ745115
3L52a	IA	3	LM	<i>Candida sp.</i>	99%	AY242304
3L54b	LA	3	LM	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	99%	U73601
3L55b	JA	3	LM	<i>Candida sp.</i>	99%	DQ104729
4Y52b	C	4	YPD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	AJ746340
4L11a	R	4	LM	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	99%	U69581
4L12a	CA	4	LM	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99%	U72161
5Y31a	X	5	YPD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	AJ544259
5Y35a	KA	5	YPD	<i>Dekkera bruxellensis</i>	99%	AF113890
5Y38a	I	5	YPD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	AJ544259
5Y41a	S	5	YPD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	AJ544259
5Y42b	G	5	YPD	<i>Dekkera bruxellensis</i>	99%	AF113890

Come si può osservare, dai 42 isolati analizzati, sono stati identificati complessivamente 11 generi e 18 differenti specie di lievito:

- *Candida diversa*
- *Candida sp.*
- *Candida sorboxylosa*
- *Candida stellata*
- *Dekkera bruxellensis*
- *Hanseniaspora occidentalis*
- *Hanseniaspora uvarum*
- *Issatchenkia hanoiensis*

- *Issatchenkia occidentalis*
- *Issatchenkia orientalis*
- *Issatchenkia terricola*
- *Kluyveromyces thermotolerans*
- *Metchnikowia pulcherrima*
- *Pichia kluyveri*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces ludwigii*
- *Torulasporea delbrueckii*
- *Zygosaccharomyces bailii*

Nel presente studio, i lieviti più abbondanti, nel corso della fermentazione spontanea, sono stati i lieviti non-*Saccharomyces*, nell'ambito dei quali è stata ritrovata una grande variabilità a livello di specie. Quelle maggiormente ricorrenti appartenevano al genere *Issatchenkia* con il 33.5% degli isolati totali, rappresentando pertanto i lieviti principali nei campioni di mosto, seguite dai lieviti appartenenti al genere *Candida*, con il 16.8% della popolazione totale e quelli appartenenti al genere *Hanseniaspora* con il 14.3%.

Relativamente alla ricorrenza dei lieviti non-*Saccharomyces*, alla loro abbondanza nel corso delle fermentazioni vinarie e alla loro persistenza o meno fino alla fine del processo, non sempre gli studi sono stati concordi.

In uno studio effettuato da Beltran *et al.* (2002) è stato riportato che i lieviti

non-*Saccharomyces* erano i microrganismi più ricorrenti nel mosto, probabilmente perché essi sono presenti sui grappoli d'uva e nel vigneto, dove i lieviti *Saccharomyces* sono generalmente assenti. In un'altro studio di identificazione molecolare di lieviti del vino in due aree della Grecia (Pramateftaki *et al.*, 2000) è stato riportato che le specie non-*Saccharomyces* erano favorite, nella fermentazione spontanea, sia quantitativamente che qualitativamente. Tali differenze nella popolazione dei lieviti naturali, con le informazioni riportate in letteratura, possono essere attribuite ai ben noti parametri che influenzano la diversità della microflora dell'uva: la varietà dell'uva, l'area geografica, le condizioni climatiche e le pratiche viticole ed enologiche (Parrish e Carrol, 1995; Heard e Fleet, 1988; Mora *et al.*, 1988; Longo *et al.*, 1991). Nel 1984 Fleet *et al.* hanno riportato che i lieviti non-*Saccharomyces* fornivano un contributo fondamentale alla fermentazione, dal momento che raggiungevano popolazioni di circa  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml; nel 2002 Nurgel *et al.* hanno evidenziato una notevole crescita dei non-*Saccharomyces* fino alla fine della fermentazione tumultuosa. Gutiérrez *et al.* (1999) hanno riportato un' inusuale dominanza di lieviti non-*Saccharomyces* nella fermentazione tumultuosa, responsabile della comparsa di dati anomali per i vini di quell'anno. Inoltre, Heard e Fleet (1988) e Erten (2002) hanno riportato che basse temperature di fermentazione di 18-20 °C o inferiori sono considerate favorevoli ad uno sviluppo preferenziale dei lieviti apiculati, in particolare,

incrementano la tolleranza all'etanolo delle specie *Hanseniaspora* e *Candida*, al punto che questi lieviti non scompaiono e diventano specie dominanti accanto a *S. cerevisiae* per un tempo più lungo. Nel presente lavoro, il processo di fermentazione è stato condotto ad una temperatura di 16-18 °C e ciò potrebbe giustificare l'abbondante presenza di queste specie. Tuttavia, uno studio più approfondito di altre condizioni climatiche e colturali dovrebbe essere effettuato per capire la loro influenza sullo sviluppo di queste specie.

Nell'ambito della fermentazione in studio, tra le specie non-*Saccharomyces*, *Issatchenkia occidentalis* ha avuto la netta predominanza, seguita da *Hanseniaspora uvarum*, *Candida sp.* e *Issatchenkia terricola*.

Relativamente a *Issatchenkia occidentalis* ci sono poche informazioni in letteratura; si tratta di un lievito sporigeno la cui presenza è stata rilevata sui moscerini della frutta. Informazioni maggiori sono invece riportate sulla specie *Hanseniaspora uvarum*. In alcuni studi (Fleet e Heard, 1993; Schütz e Gafner, 1994) tale specie è stata riportata come la più abbondante tra i non-*Saccharomyces*, è quella più frequentemente incontrata nel mosto fresco, ed è la specie che può sopravvivere più a lungo ed arrivare a popolazioni di  $10^6$ - $10^7$  cellule/ml (Romano *et al.*, 1992; 1993; 1997a; 1997b). Questa specie, per lungo tempo, è stata considerata un microrganismo indesiderato a causa degli alti livelli di acido acetico prodotto, ma negli ultimi anni, numerosi studi condotti sui lieviti apiculati

hanno dimostrato che esiste una variabilità significativa di ceppo nell'ambito di questa specie relativamente alla produzione di acido acetico (Romano, 2002). Sono stati individuati ceppi che, producendo quantità inferiori a 1 g/l di acido acetico in diversi mosti d'uva, potrebbero essere adatti per essere usati come colture starter in fermentazioni miste con *S. cerevisiae*. E' stato riportato (Zironi *et al.*, 1993) anche un effetto positivo dell'interazione tra ceppi di *H. uvarum* e di *S. cerevisiae*, e molti sono gli studi applicativi indirizzati all'individuazione di combinazioni ottimali di ceppi delle due specie per l'ottimizzazione del processo fermentativo anche nella prima fase di trasformazione, notoriamente dominata da lieviti non-*Saccharomyces*. La frequente ricorrenza di *Candida sp.* è stata invece riportata da Cansado *et al.* (1989) ed attribuita alla mancanza di igiene nella cantina o a cattive condizioni di raccolta dell'uva. Rementeria *et al.* (2003) hanno ritrovato *Candida sp.* come la specie più frequente nei mosti ma anche sui grappoli, confermando gli studi di De La Torre, (1999) e Cocolin, (2001). Numerosi studi (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 1997b) riportano invece *Candida stellata* come il lievito principale tra i non-*Saccharomyces*, Torija *et al.* (2001) registrano la sua presenza anche negli ultimi stadi della fermentazione. La presenza e la crescita di *C. stellata* potrebbe essere favorita nei succhi d'uva con alte concentrazioni di zucchero (Benda, 1981; Lafon-Lafourcade, 1983). Il significativo contributo dei membri di questa specie durante fermentazioni vinarie

condotte in Spagna è stato riportato anche da Mora *et al.* (1990). E' noto che *C. stellata* riveste un certo interesse enologico per la sua buona capacità fermentativa, è capace infatti di produrre fino a 10 gradi alcolici, utilizzando preferenzialmente il fruttosio. Recenti studi riportano che alcuni ceppi di *Candida sp.* possono avere una tolleranza all'etanolo simile a quella di *S. cerevisiae* e produrre elevate quantità di glicerina. In questa categoria rientrano alcuni ceppi di *C. stellata* che sono stati usati in colture miste con *S. cerevisiae* per aumentare il contenuto in glicerolo e le caratteristiche aromatiche di alcuni vini (Soden *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003b). Ciani e Ferraro (1998) hanno dimostrato che fermentazioni miste contenenti *C. stellata* e *S. cerevisiae* esibiscono una più completa utilizzazione degli zuccheri e hanno ipotizzato che ciò era dovuto al fatto che *C. stellata* utilizzava preferenzialmente il fruttosio.

*Issatchenkia terricola* è stata ritrovata, seppure con differenti frequenze, in altre fermentazioni vinarie (Fleet *et al.*, 1984; Mora *et al.*, 1988; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Hierro *et al.*, 2006). Nella vinificazione del Primitivo di Manduria era tra le specie più abbondanti ed anche quella con la maggiore variabilità a livello di ceppo.

Altre specie di *Issatchenkia* sono state isolate nel corso della vinificazione della Catalanesca, seppure in quantità più basse, si tratta di *Issatchenkia hanoiensis* e di *Issatchenkia orientalis*.

Tali specie rivestono un interesse particolare in quanto sono fortemente correlate ai processi di vinificazione, ma il loro contributo all'andamento della fermentazione e la loro influenza sulle caratteristiche organolettiche del vino non sono del tutto noti. Inoltre tali specie sono state raramente ritrovate in altre fermentazioni e a differenti frequenze (Pallmann *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2005; Hierro *et al.*, 2006). Nel loro studio sui lieviti vinari durante la fermentazione spontanea di sei varietà di mosti, Clemente-Jimenez *et al.* (2004) notarono che *Issatchenkia orientalis* mostrava il miglior profilo, relativamente alla produzione di alcoli superiori, dopo *S. cerevisiae* e *H. uvarum* e il più basso valore di acetaldeide e così proposero un suo impiego ad una fase appropriata della fermentazione. Al contrario, *Issatchenkia terricola* mostrava un basso potere fermentativo e un'alta produzione di etil acetato, per cui non era consigliabile un suo uso in fermentazioni miste.

*Issatchenkia hanoiensis*, invece, è una nuova specie di lievito, descritta soltanto recentemente. E' stata scoperta da Thanh *et al.* (2003) nel tessuto del trivellatore del frutto del litchi *Conopomorpha cramerella* Snellen e fino ad allora non era mai stata isolata da nessun altro substrato; soltanto Hierro *et al.* (2006) identificarono tale specie tra le colonie di lieviti non-*Saccharomyces* isolate nel loro studio sulla fermentazione vinaria.

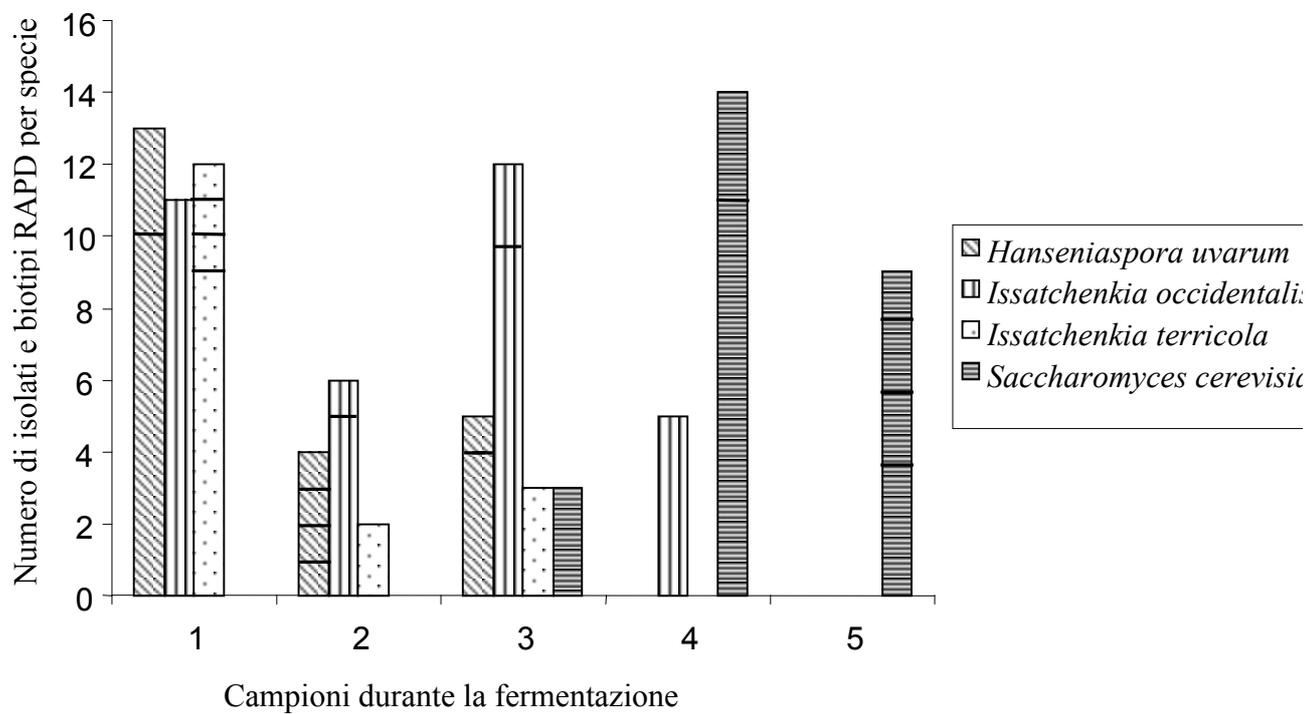
Sebbene queste specie fossero predominanti, altri lieviti non-*Saccharomyces* come *Candida sorboxylosa*, *Dekkera bruxellensis*,

*Hanseniaspora occidentalis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspota delbruekii*, sono stati isolati in questa fermentazione e la loro ricorrenza è stata evidenziata anche in altri studi (Pardo *et al.*, 1989; Longo *et al.*, 1991; Pramateftaki *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2003).

Per alcune specie è stata anche possibile una differenziazione a livello di ceppo e ciò a conferma della validità della tecnica RAPD-PCR adoperata come metodo di indagine in grado di tipizzare ceppi microbici appartenenti ad una stessa specie.

La specie che ha mostrato la maggiore variabilità a livello di ceppo è stata *Hanseniaspora uvarum* con sei differenti biotipi, seguita da *Issatchenkia terricola* e *Saccharomyces cerevisiae* con quattro biotipi rispettivamente e *Issatchenkia occidentalis* con tre biotipi.

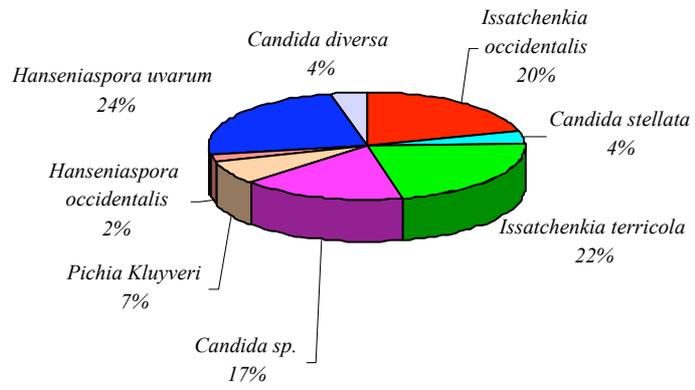
Le specie più frequentemente isolate e il loro corrispondente numero di biotipi RAPD-PCR sono riportati nel grafico seguente.



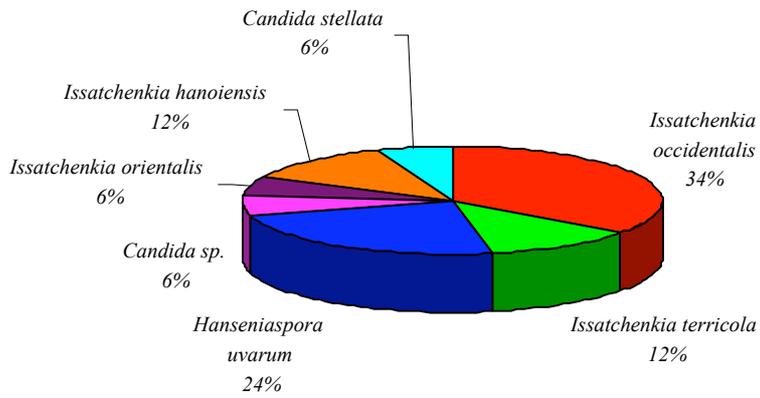
**Figura 12**

I grafici che seguono riportano invece la presenza e il numero delle diverse specie nei vari campioni.

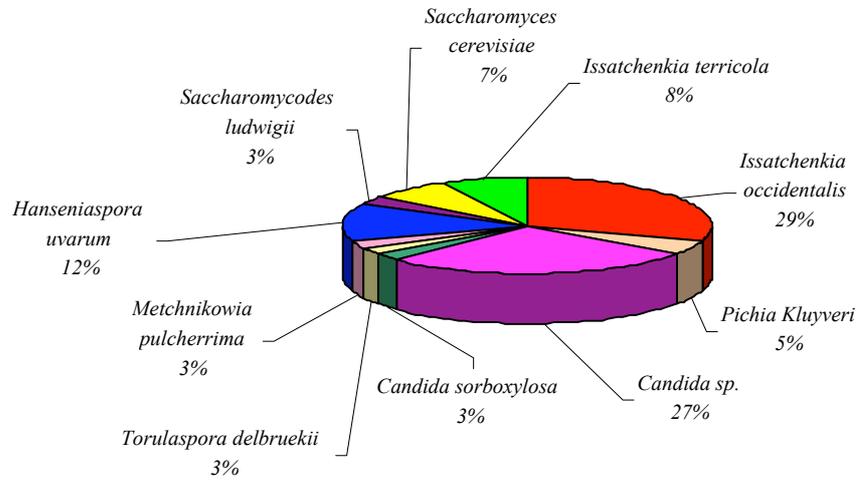
### Campione 1



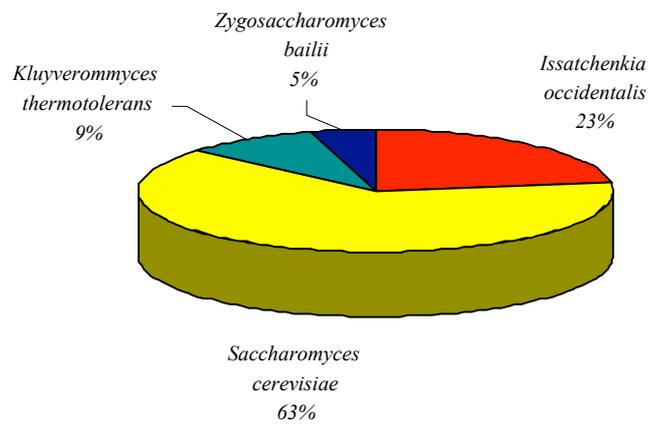
### Campione 2



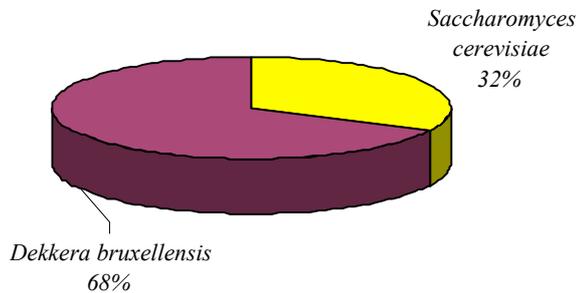
### Campione 3



### Campione 4



## Campione 5



Come si può osservare, il campione in cui è stato possibile evidenziare la maggiore variabilità a livello di specie è stato il campione 3, seguito dal campione 1 e dal 2, inoltre, se si tiene conto del fatto che in essi era presente anche il maggior numero di ceppi, si deve ritenere che in realtà la diversità che li caratterizza è ben più ampia. Considerando poi che si tratta di campioni che corrispondono alle fasi iniziali e intermedie della fermentazione, si può affermare che essi, con la microflora indigena presente, hanno contribuito in maniera significativa all'avvio e al prosieguo della fermentazione, inoltre le motivazioni di una biodiversità così elevata sono anche da ricercarsi nel fatto non si è fatto ricorso agli starter commerciali (Torija *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda *Saccharomyces cerevisiae*, in accordo con altri studi (Constanti *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1998; Torija *et al.*, 2001), comincia a comparire nella fase intermedia della fermentazione e domina nella fase finale, portando a termine il processo fermentativo. Di questa specie sono stati identificati quattro biotipi diversi, di cui solo uno è quello più frequentemente ricorrente, ed è ascrivibile al pattern RAPD-PCR C, ritrovato in maniera dominante nel campione 4, e quindi nella fase finale della fermentazione, probabilmente a causa della sua maggiore resistenza a condizioni di crescita restrittive, legate ad una mancanza di nutrienti e ad un alto contenuto di alcol. Questa diversità a livello di ceppi di *S. cerevisiae* è stata registrata in quanto non si è fatto uso di starter commerciali. E' noto che l'uso dei lieviti secchi attivi riduce il numero dei ceppi di *S. cerevisiae* indigeni in favore degli starter, sebbene vi sia ancora uno sviluppo significativo di ceppi naturali nelle prime fasi della fermentazione (Querol *et al.*, 1992a; Romano *et al.*, 2003a).

*Dekkera bruxellensis* è stata rilevata solo nell'ultimo campione e cioè nel vino dopo 5 mesi dall'inizio del processo; è considerata la forma perfetta e sporigena della specie *Brettanomyces bruxellensis*. Sulla base di studi eseguiti da Verona e Florenzano (1947) e Florenzano (1950) e, successivamente, da altri autori in Francia (Peynaud e Domercq, 1956) e in Sud-Africa (van der Walt e van Kerken, 1959, 1961a), si può affermare che non è affatto rara nei mosti e nei vini insieme con gli altri biotipi della

stessa specie. Quale sia il ruolo che può svolgere nel corso della vinificazione è tutt'altro che chiaro, anche se la sua attitudine a produrre elevate quantità di acido acetico la mette in posizione molto sospetta (Zambonelli, 1998).

I risultati relativi all'identificazione speciografica delle colture sono state confermate dalle osservazioni microscopiche eseguite, partendo da colture su Yeast Morphology Agar, nel senso che tutti gli isolati rapportati alla stessa specie hanno mostrato la stessa morfologia, e che le morfologie rilevate sono risultate del tutto coerenti con quanto descritto in letteratura per le entità microbiche identificate.

#### **4.2.4 Analisi PCR-DGGE**

I lieviti ricorrenti nella fermentazione spontanea della Catalanesca sono stati anche identificati attraverso il sequenziamento di frammenti DGGE appartenenti a regioni del 26S rDNA. Tale analisi, introdotta da Muyzer *et al.* (1993) è stata utilizzata con successo in molti studi di ecologia microbica (Muyzer, 1999; Norris *et al.*, 2002; Crump *et al.*, 2003; Nicol *et al.*, 2003) come strumento per analizzare la diversità microbica in habitat naturali, dal momento che si pensa sia in grado di superare i problemi associati con la coltivazione selettiva e l'isolamento dei microrganismi dai campioni naturali. Nel presente lavoro, questo protocollo è stato impiegato

come metodo culture-independent e culture-dependent, in combinazione con i metodi convenzionali culture-dependent per studiare la diversità delle specie dei componenti dominanti dell'ecosistema durante la fermentazione. Il DNA estratto direttamente dai campioni di mosto è stato analizzato per studiare la popolazione di lieviti senza coltivazione, mentre il DNA estratto dai bulk cellulari è stato analizzato per monitorare la comunità coltivabile. Due set di primer sono stati utilizzati per amplificare le regioni del 26S rDNA: NL1GC/LS2 (Cocolin *et al.*, 2000) e 403/662GC (Sandhu *et al.*, 1995).

I fingerprints DGGE ottenuti analizzando i frammenti amplificati 26S rDNA, usando il set di primer NL1GC/LS2 (Cocolin *et al.*, 2000) del DNA direttamente estratto dai campioni di mosto sono mostrati in figura 13 (Panel A).

Essi sono composti complessivamente da quattro bande specifiche, distinte sulla base delle differenti posizioni di migrazione nel gel DGGE. Per identificare le specie di lievito presenti nei campioni, le bande sono state tagliate dal gel, riamplicate e fatte correre di nuovo in un gel denaturante per riconfermare la loro posizione relativa nel campione di mosto originario, successivamente sono state purificate, sequenziate e comparate con le sequenze presenti in banca dati. Sfortunatamente, la purificazione e il sequenziamento della debole banda 1 non ha portato ad alcun risultato, mentre tutte le altre sequenze corrispondenti a porzioni del 26S rDNA dei

lieviti, erano rappresentate da diverse specie di *Candidae* precisamente la banda 2 a *Candida stellata*, la banda 3 a *Candida diversa* e la banda 4 a *Candida sp.* Inoltre, analizzando i profili DGGE, è stato possibile seguire l'evoluzione delle specie microbiche durante l'intero processo fermentativo: il campione 1 mostra un profilo in cui si rivela la presenza di tutte e quattro le bande, mentre nei campioni successivi sono presenti soltanto le bande corrispondenti a *Candida stellata* e *Candida sp.* (bande 2 e 4).

I profili delle sospensioni bulk, invece, presentavano una maggiore variabilità: i bulk provenienti dai campioni 1 e 2 presentavano le bande 2, 3 e 4, corrispondenti, rispettivamente a *Candida stellata*, *Candida diversa* e *Candida sp.*; dei bulk derivanti dal campione 3, uno presentava le tre bande già riscontrate nei primi due campioni, mentre negli altri era presente, oltre alle bande già evidenziate, anche la banda 1, di cui non è stato possibile accertarne l'identità. Le sospensioni bulk del campione 4, mostravano due profili differenti: uno in cui era presente la banda 2, altri in cui era visibile solo la banda 1. Infine, i bulk del campione 5 presentavano solo la banda 1. In generale è possibile affermare che i profili ottenuti applicando la tecnica molecolare PCR-DGGE, mostrano la presenza delle stesse bande sia nei campioni di mosto che nelle sospensioni bulk.

La presenza di specie di *Candida* in tutti i campioni di mosto, evidenziata attraverso il sequenziamento dei frammenti DGGE è stata confermata dai

risultati relativi all'identificazione speciografica dei ceppi sottoposti al sequenziamento del 26S rDNA. Questi lieviti riescono a sopravvivere anche nelle ultime fasi della vinificazione in cui si riscontra normalmente la dominanza di *S. cerevisiae*. Questo risultato, trovato precedentemente in altri lavori (Mora *et al.*, 1988; Fleet e Heard, 1993), si pensa sia dovuto ad una carica microbica iniziale elevata, che permette a questi lieviti non-*Saccharomyces* di persistere anche nelle fasi più spinte della fermentazione. Cocolin *et al.* (2001) osservarono che due specie di *Candida* erano presenti nel corso dell'intera fermentazione anche molto tempo dopo la comparsa di *S. cerevisiae*. La presenza persistente di ceppi di *Candida* potrebbe influenzare le caratteristiche sensoriali e la stabilità del vino finale. Dai profili DGGE dei 5 campioni di mosto, non è stato possibile rilevare la presenza di microrganismi appartenenti a specie di *S. cerevisiae*, sebbene predominanti nelle ultime fasi della fermentazione e ritrovati in buona percentuale sia attraverso il sequenziamento del 26S rDNA, sia attraverso l'analisi PCR-DGGE, con l'altro set di primer. L'assenza, nei profili, di questi lieviti potrebbe essere dovuta o a una bassa efficienza dell'estrazione del DNA o a una amplificazione preferenziale con il set di primer usato (Ercolini *et al.*, 2004). Tali fenomeni influenzano sia la concentrazione del DNA estratto dai lieviti in miscele complesse, sia la resa in prodotto PCR delle differenti specie.

I risultati dell'analisi PCR-DGGE, ottenuti, invece, con l'altro set di primer 403/662GC (Sandhu *et al.*, 1995) sono stati particolarmente interessanti in quanto hanno permesso di evidenziare alcune specie non ritrovate attraverso l'analisi del sequenziamento del 26S rDNA, è il caso di *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora clermontiae*, *Sclerotinia sclerotiorum/Botryotinia fuckeliana*. I profili ottenuti sono mostrati in figura 13 (Panel B).

I fingerprints ottenuti dall'analisi diretta dei campioni sono composti da 5 bande. La banda 9 e la banda 8, visibili durante l'intera fermentazione sono rapportabili alle specie *Hanseniaspora clermontiae* e *Candida stellata*. La banda 5 corrispondente a *Aureobasidium pullulans*, appare soltanto nei campioni 1 e 2. Questo microrganismo, ritrovato in diversi studi sulle fermentazioni spontanee (Pardo *et al.*, 1988; van Keulen *et al.*, 2003; Raspor *et al.* 2006) non è considerato un vero e proprio lievito secondo gli ultimi criteri tassonomici (Barnett *et al.*, 1983; Kreger-van Rij, 1984), è il saprofito più diffuso nella fillosfera ed è considerato un potenziale agente di biocontrollo contro la muffa grigia (Scheda *et al.*, 2003).

Le bande 6 e 7, corrispondenti a *Saccharomyces cerevisiae* e *Sclerotinia sclerotiorum/Botryotinia fuckeliana* rispettivamente, sono state rilevate soltanto dopo cinque giorni di fermentazione e ricorrono fino alla fine del processo. Da sottolineare il rilevamento di *Botryotinia fuckeliana*, forma perfetta di *Botrytis cinerea*, indice dell'attacco fungino subito dall'uva nei

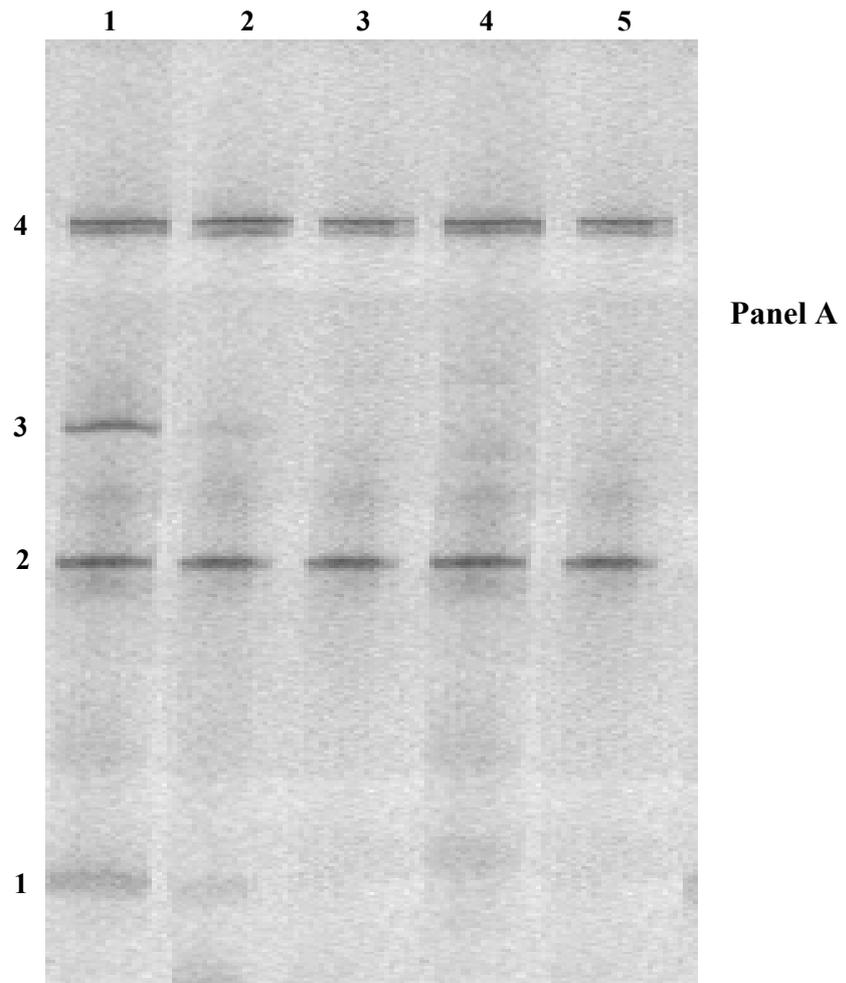
giorni precedenti la raccolta. Tale specie è stata rilevata, tramite analisi PCR-DGGE, anche nelle primissime fasi della vendemmia 2001, da Cocolin *et al.* (2001), durante la fermentazione spontanea di un vino commerciale.

L'analisi PCR-DGGE del DNA estratto dai bulk cellulari non ha permesso di ottenere ulteriori informazioni sulla popolazione di lieviti in quanto i profili ottenuti da questa analisi sono stati identici a quelli ottenuti dall'analisi del DNA dei campioni di mosto. pertanto si può affermare che le specie microbiche trovate nei profili DGGE sono specie coltivabili.

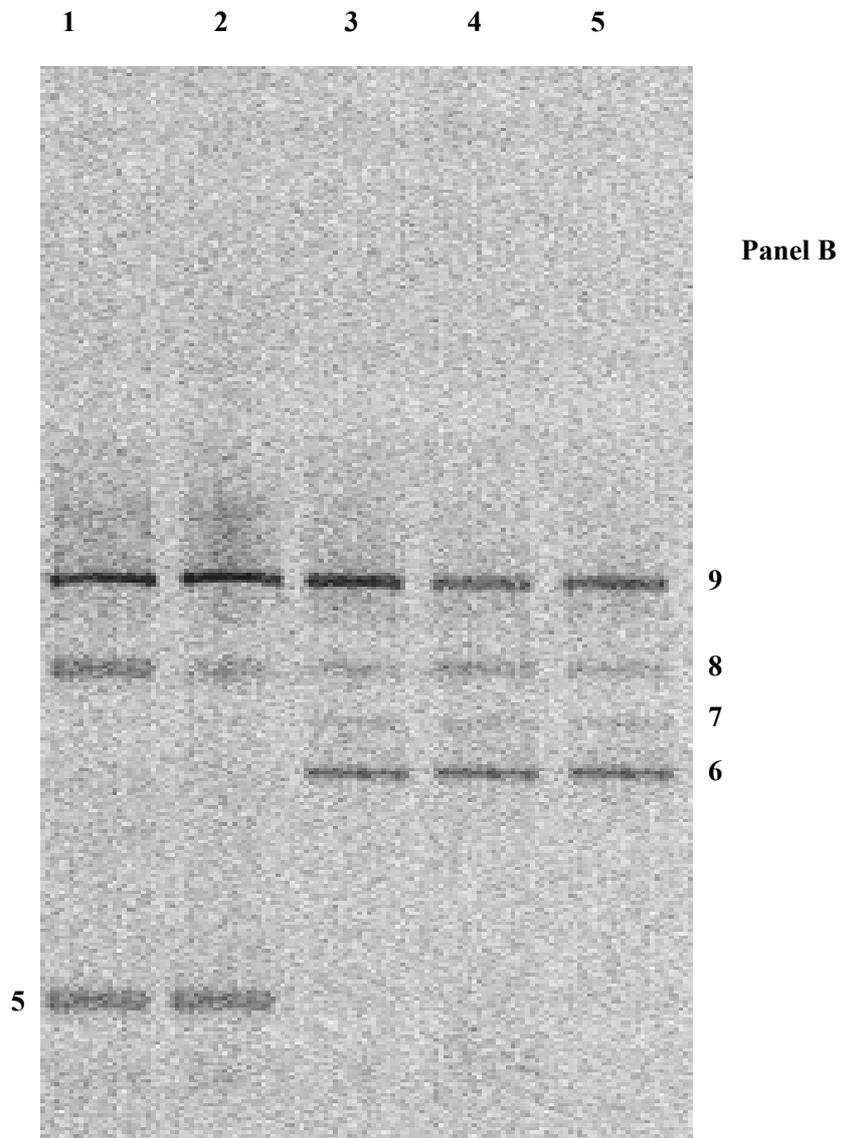
Le specie identificate con entrambe le coppie di primer e la loro percentuale di identificazione sono riportate nella tabella seguente.

Bande <sup>a</sup>	PCR-DGGE reference	Closest relative	% Omologia	Closest relative Accession no.
1	(Cocolin <i>et al.</i> , 2000)	Not identified		
2	(Cocolin <i>et al.</i> , 2000)	<i>Candida stellata</i>	98	AY394855
3	(Cocolin <i>et al.</i> , 2000)	<i>Candida diversa</i>	99	U71064
4	(Cocolin <i>et al.</i> , 2000)	<i>Candida sp.</i>	99	AY520384
5	(Sandhu <i>et al.</i> , 1995)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	AJ507454
6	(Sandhu <i>et al.</i> , 1995)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	AY497669
7	(Sandhu <i>et al.</i> , 1995)	<i>Botryotinia fuckeliana</i> / <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	97 97	AY544651/ AY789347
8	(Sandhu <i>et al.</i> , 1995)	<i>Candida cf stellata</i>	97	AY160761
9	(Sandhu <i>et al.</i> , 1995)	<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	100	AY953954

<sup>a</sup> profili DGGE ottenuti dopo l'amplificazione del 26S rDNA. I numeri delle bande sono indicati in Figura 13, Panel A e B



**Figure13** – Profili PCR-DGGE dei campioni di mosto, con il set di primer NL1/LS2 (Cocolin *et al.*, 2000). Lane: 1, mosto al tempo 0; 2, mosto dopo 24 ore; 3, mosto dopo 5 giorni; 4, vino dopo 25 giorni; 2, vino dopo 5 mesi. I numeri indicano le bande sequenziate.



**Figure 13** (Panel B) – Profili PCR-DGGE de campioni di mosto durante la vinificazione, con i set di primer 403/662 (Sandhu *et al.*, 1995). Lane 1, mosto al tempo 0; 2, mosto dopo 24 ore; 3 mosto dopo 5 giorni; 4, vino dopo 25 giorni; 5 vino dopo 5 mesi. I numeri indicano le band sequenziate.

#### 4.2.5 Potere e vigore fermentativo

Allo scopo di valutare il vigore e il potere fermentativo di alcune specie di lievito (elencate precedentemente), isolate nel corso della fermentazione spontanea, sono state condotte prove di microvinificazione su 100 ml di mosto Catalanesca alla temperatura di 16 °C, controllando giornalmente l'andamento fermentativo. Il vigore e il potere fermentativo esprimono rispettivamente la capacità di dare origine a pronte e rapide fermentazioni in presenza anche di antisettici nelle dosi consentite dalla legge, e la capacità di produrre vini con un grado alcolico elevato per fermentazione di un mosto contenente zucchero in eccesso. Questi due importanti parametri enologici sono stati determinati come calo in peso determinato dall'evoluzione della CO<sub>2</sub>.

Le specie prese in considerazione sono state specie predominanti nella prima e metà fase della fermentazione (*H. uvarum*, *C. stellata*, *Candida sp.*, *M. pulcherrima*, *H. occidentalis*, *T. delbrueckii*), quelle che normalmente sono note come le specie più vigorose ed alcoltolleranti della fase tumultuosa (*S. cerevisiae*, *Z. bailii*), il lievito alcol-tollerante e SO<sub>2</sub>-resistente *Saccharomyces ludwigii* e il lievito presente nel campione 5 in misura dominante *Dekkera bruxellensis*.

I risultati delle prove di fermentazione sono riportati in figura 14.



I lieviti non-*Saccharomyces*, invece, hanno esibito un basso vigore e potere fermentativo, ma uno di loro, *Hanseniaspora uvarum* ha dimostrato un'efficienza di fermentazione, generalmente non così elevata per questa specie. E' noto che, tra i lieviti dell'inizio fermentazione, *C. stellata* è la specie dotata del più elevato potere fermentativo: sono infatti disponibili ceppi capaci di raggiungere 8-9° di etanolo. Al contrario, le specie vinarie dei lieviti apiculati, quali *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondi*, sono più sensibili all'etanolo e difficilmente riescono a raggiungere 8° alcolici.

Sorprendentemente, lo starter commerciale, usato come controllo positivo in queste prove di fermentazione, ha dimostrato le peggiori performances di fermentazione rispetto agli altri ceppi indigeni di *S. cerevisiae*; mentre la microflora indigena, usata come controllo negativo, ha esibito la più bassa attività fermentativa.

*Dekkera bruxellensis*, il cui ruolo nell'ambito della fermentazione non è ancora del tutto chiaro, ha mostrato un'alta capacità fermentativa simile a quella dei ceppi di *S. cerevisiae*.

In definitiva, si può concludere che, ogni lievito ha esibito una curva di fermentazione che possiamo definire tipica di specie, confermando i lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae* come i più vigorosi e alcol-tolleranti, con l'eccezione di *H. uvarum* che ha mostrato le migliori performances tra i

lieviti non-*Saccharomyces* e che la variabilità di ceppo all'interno di una specie, non ha modificato il modello comune che caratterizza la specie.

## 5. CONCLUSIONI

Il crescente interesse da parte degli operatori del settore enologico di produrre vini con caratteristiche sensoriali che potessero riflettere i tratti tipici del vitigno e l'intento di ridurre od eliminare ogni intervento che prevede l'utilizzo di additivi chimici nel corso di un processo di vinificazione, nonché lo sviluppo di nuove pratiche tecnologiche per migliorare la qualità dei vini, ha stimolato, in questi ultimi anni, lo studio dell'ecologia e dell'evoluzione dei lieviti ricorrenti nelle fermentazioni vinarie con un'attenzione particolare alle fermentazioni spontanee, con l'intento di correlare l'avvicinarsi delle popolazioni microbiche ai tipi ed alle concentrazioni delle sostanze responsabili del flavour e dell'aroma del vino e quindi alle caratteristiche qualitative del prodotto finito. Il monitoraggio delle fermentazioni ha essenzialmente due finalità. La prima, di tipo speculativo, è quella di "fotografare" la composizione della microflora e individuare quanti e quali specie intervengono in contemporanea o in successione nel corso delle fermentazioni. La seconda, più applicativa, è di consentire agli operatori di cantina di intervenire tempestivamente, nel caso in cui, ad esempio, lo starter inoculato non prenda il sopravvento sulla microflora selvatica, nel caso di fermentazioni anomale e rallentamenti o arresti di fermentazione.

Inoltre la conoscenza e il controllo della composizione e dell'evoluzione della flora microbica nel corso della fermentazione alcolica si rende

necessaria nel momento in cui ci si pone come obiettivo la costanza qualitativa e la stabilità microbiologica del vino. A causa di ciò l'identificazione tassonomica dei lieviti del vino è stata oggetto di numerose ricerche e ha promosso lo sviluppo di un gran numero di differenti approcci, tra i quali i metodi molecolari hanno fornito un contributo significativo per una corretta caratterizzazione dei microrganismi.

L'uso dei lieviti secchi attivi nelle fermentazioni, sebbene assicuri un prodotto riproducibile e privo di difetti, porta, tuttavia, all'ottenimento di vini di media qualità e non permette di esaltare i tratti aromatici dei vini di una determinata zona. Per questo motivo, numerose ricerche (Ciani *et al.*, 1997; Mannazzu *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 2003; Rementeria *et al.*, 2003; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Paraggio, 2004) si sono orientate verso la caratterizzazione dei lieviti autoctoni isolati dalle fermentazioni spontanee, i quali, oltre a garantire un miglior controllo della fermentazione alcolica in modo analogo a quanto fanno i lieviti commerciali, assicurano anche il mantenimento della tipicità organolettica di ciascun vino locale che può essere compromessa dall'uso di colture starter non appositamente selezionate.

In questo contesto, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di ottenere un quadro completo della dinamica e dei cambiamenti della popolazione di lieviti presenti nella fermentazione spontanea di due vini dell'Italia Meridionale, il Primitivo di Manduria e la Catalanesca, come primo step in

un programma di selezione di lieviti autoctoni, i quali potrebbero essere i più idonei a fermentare il mosto, dal momento che sono meglio adattati alle specifiche condizioni ambientali.

La Catalanesca, come già ricordato precedentemente, è registrata come uva da tavola, ma presenta caratteristiche enologiche tali da consentire l'ottenimento di un vino bianco secco caratterizzato da un buon equilibrio gustativo, da qui il crescente interesse nei confronti di questo vitigno dalle ottime potenzialità.

L'identificazione dei lieviti vinari è stata effettuata in questo studio mediante l'impiego di diverse tecniche di analisi molecolare, al fine di conoscerne le loro potenzialità e di valutarne la loro effettiva validità.

In tal senso, per entrambe le vinificazioni, la tecnica RAPD-PCR è risultata adatta a ridurre notevolmente il numero di isolati da sottoporre all'identificazione tramite sequenziamento del 26S rDNA. Essa ha inoltre fornito elementi preliminari per differenziare ceppi appartenenti ad una stessa specie (Busse *et al.*, 1996). Sono state così ottenute agevolmente importanti informazioni circa la biodiversità microbica del sistema in studio. Allo stesso modo l'identificazione delle specie per sequenziamento della regione 26S rDNA comprendente i domini variabili D1/D2, si è rivelato un sicuro e rapido strumento di indagine in quanto ha fornito importanti informazioni tassonomiche ed ha permesso di rilevare un numero abbastanza elevato di specie. Con coefficienti di similarità del 99-

100%, sono state identificate 7 specie di lievito nella vinificazione del Primitivo di Manduria e 18 nella vinificazione della Catalanesca, mettendo in tal modo in evidenza che le fermentazioni spontanee sono caratterizzate da una microflora complessa ricca di specie, che talvolta può essere difficile da controllare ma che, probabilmente è responsabile dello sviluppo del flavour tipico dei vini. In entrambe i processi, è stata inoltre rilevata una significativa presenza di lieviti non-*Saccharomyces*, nell'ambito dei quali è stata ritrovata anche una grande diversità di specie, di cui alcune, soprattutto nella fermentazione della Catalanesca erano in grado di sopravvivere fino alla fine del processo fermentativo, sebbene questa fase fosse dominata da *S. cerevisiae*, sottolineando in tal modo che il loro contributo all'andamento della fermentazione, non si poteva certamente ritenere trascurabile. Questo rappresenta il motivo per cui diversi autori (Ciani e Ferraro 1998; Soden *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003b) hanno considerato vantaggioso formulare e usare colture miste starter che prevedono l'intervento dei lieviti apiculati indigeni, adeguatamente selezionati, nella prima fase della fermentazione e successivamente l'intervento di *S. cerevisiae*, con l'obiettivo di ottenere un vino finale di elevata qualità.

Sono state inoltre identificate specie che sono associate ai processi di vinificazione, ma che sono state isolate raramente nel corso delle

fermentazioni e non ritrovate con la stessa frequenza, è il caso di *Issatchenkia hanoiensis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis* e *Issatchenkia terricola*. Queste ultime due sono state ritrovate in entrambe le vinificazioni e *Issatchenkia terricola* è stata rinvenuta nella vinificazione del Primitivo di Manduria con un elevato numero di biotipi. *Issatchenkia hanoiensis*, invece, è una specie nuova che è stata descritta soltanto recentemente ed è stata ritrovata solo nella vinificazione della Catalanesca. In accordo poi con altri studi sulle fermentazioni spontanee (Constanti *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1998; Torija *et al.*, 2001), nella vinificazione della Catalanesca, *S. cerevisiae* è stato ritrovato dominante nella fase intermedia e finale della fermentazione. Dei quattro biotipi evidenziati, soltanto uno era quello più frequentemente ritrovato ed era ricorrente soprattutto alla fine della fermentazione, probabilmente a causa della sua resistenza a ristrette condizioni di crescita. Nella vinificazione del Primitivo di Manduria, invece, è stata registrata una bassa ricorrenza di questo lievito, che potrebbe essere imputata al fatto che esso è considerato un importante componente della cosiddetta flora blastomicetica “residenziale” o di “cantina” e non si rinviene normalmente sui grappoli d’uva (Fleet e Heard, 1993).

L’ampia biodiversità, registrata sia a livello di specie che a livello di ceppo, che potrebbe essere dovuta ai ben noti fattori che influenzano la diversità, la composizione e l’evoluzione dei lieviti nelle fermentazioni: la varietà

dell'uva, l'età del vigneto, le pratiche viticole, la posizione geografica, le condizioni climatiche, la tecnologia di produzione, la temperatura di fermentazione, il mancato ricorso a starter commerciali (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982) rende conto, insieme alle caratteristiche proprie dei vitigni, del valore attribuito ai vini finali, che li ha portati ad ottenere, per il Primitivo di Manduria, il riconoscimento DOC, nel 1974 e a richiedere per la Catalanesca la transizione di categoria.

La tecnica PCR-DGGE, usata in questo studio per monitorare e identificare la flora blastomicetica della Catalanesca, come metodo culture-independent direttamente nei campioni di mosto in fermentazione e come metodo culture-dependent, in alternativa ai metodi tradizionali di identificazione delle specie dominanti, purtroppo non si è rivelata di grande utilità nel fornire ulteriori informazioni sulla microflora dell'habitat studiato, soprattutto con riferimento al set di primer NL1/LS2 (Cocolin *et al.*, 2000), che ha consentito solo il rinvenimento di specie di *Candida*, mentre con l'altro set di primer 403/662GC (Sandhu *et al.*, 1995) sono stati ottenuti risultati più interessanti in quanto sono state evidenziate specie non ritrovate attraverso l'analisi del sequenziamento del 26S rDNA.

Tuttavia, tale tecnica è risultata da sola inefficiente per il monitoraggio di popolazioni di lieviti durante una vinificazione.

In definitiva, si può concludere che, in entrambe le vinificazioni in studio, l'analisi della sequenze nucleotidiche dei geni codificanti per l'rRNA

ribosomiale, ha rappresentato un metodo valido per conseguire il monitoraggio, la biotipizzazione e una corretta e rapida identificazione delle specie di lievito coinvolte nelle fermentazioni spontanee, sottolineando la necessità dell'utilizzo delle tecniche molecolari per conseguire una inequivocabile identificazione delle specie microbiche.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review*, **59**: 143-169.
- Amerine, M.A. e Kunkee R.E. (1968) Microbiology of winemaking. *Annu Rev Microbiol.*, **22**: 323-358.
- Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton V.L.U.L., Webb, A.D. (1982) The Technology of Wine Making, 4th edn. AVI Publishing Company, Westport, Conn.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in the Mexican pozon, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent method to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5464-5473.
- Anastasio, M., Pepe, O., Protopapa, A. (2003) Indagine preliminari riguardante la crioresistenza e l'attività rifermentativa di batteri lattici e lieviti in impasti lievitati sottoposti a congelamento. Giornate Scientifiche delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia,

Medicina Veterinaria e Agraria. Università di Napoli Federico II.  
Napoli 5-6 Giugno.

- Angelo, J. e Siebert, K.J. (1987) A new medium for the detection of wild strains in brewing culture yeast. *J Am Soc Brew Chem* **45**: 135-140.
- Antonelli, A., Castellari L., Zambonelli C., Carnicini A. (1999) Yeast Influence on volatile composition of wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1139-1141.
- Baleiras Couto, M.M., Eijsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, vol **62**, n° 1, 41-46.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (1983) *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.
- Baruzzini, L. (2001) Prime valutazioni sulle potenzialità del ceppo di lievito autoctono specifico per il vitigno Sauvignon. Notiziario ERSA. N°3.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.*, **25**: 287-293.

- Benda, I. (1981) Wine and brandy. In: *G. Reed (Ed) Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th edn (pp 293-402). AVI Publishing Company, Westport, Conn.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1995) *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman & Hall, New York.
- Brandolini, V., Romano P., Maietti A., Caruso M., Tedeschi P., Mazzotta D. (2002) Automated multiple development method for determination of glycerol produced by wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**: 481-485.
- Busse, H.O., Denner, E.B.M., Lubitz, W. (1996) Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*, **47**: 3-38.
- Calleja, A., Falqué, E. (2005) Volatile composition of Mencia wines. *Food Chemistry*. **90**, 357-363.
- Cansado, J., Longo, E., Agrelo, D., Villa, T.G. (1989) Levaduras asociadas a procesos de fermentación espontánea en vinos de Ribeiro. Analisis del homo/heterotalismo y sistema killer de las cepas *de S. cerevisiae*. *Microbiol. SEM* **5**: 79-88.
- Cantarelli, C. (1955) Studio comparativo dei lieviti apiculati dei generi *Kloeckera* (Janke) ed *Hanseniaspora* (Zikes). *Ann. Microbiol.*, **6**: 85.

- Castelli, T. (1954) Les agents de la fermentation vinaire. *Arch. Mikrobiol.*, **20**: 323.
- Charoenchai, C., Fleet G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N. (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **3**: 2-8.
- Ciani, M. e Ferraro, L. (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wine. *Journal of Applied Microbiology*, **85**: 247-254.
- Ciani, M. e Maccarelli, F. (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* **14**: 199-203.
- Ciani, M. (1997) Role, enological properties and potential biotechnological use of non-*Saccharomyces* wine yeasts., in "Recent Res. Devel. in Microbiology" Eds. S.G. Pandalai, **1**: 317-331. Research Signpost, Trivandrum, India
- Ciani, M. e Picciotti, G. (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotech. Letters*. **17**: 1247-1250.
- Ciani, M., Maccarelli, F., Martini, A., Vettorello G. (1997) Selezione di starter di vinificazione autoctoni della D.O.C. Prosecco di Conegliano-Valdobbiadene. *L'Enotecnico*, **33**: 81-89.

- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla L., Martinez-Rodriguez S., Las Heras-Vazquez F.J., Rodriguez-Vico F. (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* **21**: 149-155.
- Cocolin, L., Bisson L.F., Mills D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 81-87.
- Cocolin, L., Heisey A., Mills D.A. (2001) Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *Am J Enol Vitic* **52**: 49-53.
- Cocolin, L., Manzano, M., Rebecca, S., Comi, G. (2002) Monitoring of yeast population changes during a continuous winw fermentation by molecular methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**: 24-27.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A. e Martinez C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* **99**: 237-243.
- Comi G., Romano P., Cocolin L. e Fiore C. (2001) Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from Friuli region in North Italy. *World J Microbiol Biotechnol* **17**: 391-394.

- Constanti, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J.M. (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**: 339-344.
- Constanti, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M. (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**: 169-175.
- Cordero Otero, R.R., Iranzo J.F.U., Briones-Perez A.I., Potgieter N., Villena M.A., Pretorius I.S., e van Rensburg P. (2003) Characterization of the beta-glucosidase activity produced by oenological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Food Sci* **68**: 2564-2569.
- Cordonnier, R. e Bayonove, C. (1981): \_tude de la phase préfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composes de l'arome. *Coon. Vigne Vin.* **15**, 269-286.
- Crump, B.C., Kling, G.W., Bahar, M., Hobbie, J.E. (2003) Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2253-2268.
- Cuinier, C. (1978) Changes in the microflora of Chinon wines during winemaking. *Vignes vins*, **269**: 29-33.
- De La Torre, M., Millan M., Perez-Juan P., Morales J., Ortega J. (1999) Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios* **100**: 27-40.

- Degré, R. (1993) Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic: Reading; 421-447.
- Delfini, C. (1995) – *Scienza e Tecnica di Microbiologia Enologica*. 1<sup>a</sup> Edizione. Casa Editrice Il Lievito, Asti.
- Dellaglio, F., Lombardi, A., Torrioni, S. (1998) Tassonomia e nuove prospettive nell'identificazione dei microrganismi non starter di interesse caseario. *Ind. Latte*, **34**: 57-76.
- Dittrich, H.H. (1976) Spontangärung oder Reingärung? Ergebnisse, Konsequenzen, neue Wege. *Weinwirtschaft*, **112**: 9611-965.
- Egli, C. M., Ednger, W. D., Mitrakul, C.M., Hnick-Kling, T. (1998) Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, **85**: 779-789.
- Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.P., Backhaus, H. (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ Microbiol.* **64**: 2814-2821.
- Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* **56**: 297-314.

- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. (2001) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. *Syst Appl Microbiol* **24**: 610-617.
- Ercolini, D.(2003). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, **56**: 297-314.
- Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R. (2003) Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiology* **69**, 3540-3548.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., (2001) Behaviour of Variable V3 Region from 16S rDNA of Lactic Acid Bacteria in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Current Microbiology*, **42**: 199-202.
- Erten, H. (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J Microbiol Biotechnol* **18**: 373-378.
- Eschenbruch, R., Bonish, P. and Fisher, R.M. (1978) the production of H<sub>2</sub>S by pure culture wine yeasts. *Vitis*, **17**: 67-76.

- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A. (1998) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int Microbiol* **1**: 143-148.
- Fernandez, M., Ubeda, J.F., Briones, A.I. (2000) Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. *Int J Food Microbiol* **59**: 29-36.
- Fernández, M.T., Ubeda, J.F., Briones, A.I. (1999) Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters*, **173**: 223-229.
- Fia, G.; Giovani, G.; Rosi, I. (2005) Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 509-517.
- Fiorito, G. (1960) Breve rassegna vitivinicola della provincia di Napoli. *Agricoltura Napoletana*. 30-40.
- Fleet, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**: 11-22.
- Fleet, G.H. (1993) The microorganism of winemaking-isolation, enumeration and identification. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic: Reading; 1-25.

- Fleet, G.H. (1998) The microbiology of alcoholic beverages. In *Microbiology of Fermented Foods*, vol 1, Wood BJB (ed). Blackie Academic and Professional: Glasgow; 217-262.
- Fleet, G.H. e Heard G.M. (1993) Yeast-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic: Reading; 27-54.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon, P. (1984) – Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 1034-1038.
- Florenzano, G., (1950) Due nuove specie di lieviti asporigeni isolate da vini (*Trichosporon intermedium nov. Spec.* e *Brettanomyces custersii nov. Spec.*). *Ric. Sci.*, **20**: 1494-1498.
- Fodde, R., Losekoot, M. (1996) Mutation Analysis by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Edited by Gerd P. Pfeifer, Plenum Press, New York.
- Franklin, R.B., Taylor, D.R., Mills, A.C. (1999) Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, **35**: 225-235.
- Frezier, V. e Dubourdieu, D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a

Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**: 375-380.

- Fugelsang, K.C. (1997) *Wine Microbiology*. Chapman and Hall: New York.
- Gafner, J., Hoffmann, P., Pulver, D. and Schütz, M. (1993) Neue Erkenntnisse zur Rolle von Hefen in der Weinbereitung. In *10th International Oenological Symposium, 3rd-5th May 1993, Montreux, Switzerland*, International Association for Winery Technology and Management.
- Gafner, J., Schütz, M., Viviani-Nauer, A., Pulver, D., Hoffmann, P. and Albisser, S. (1997) Ecology of yeasts and bacteria in winemaking-molecular biological studies with practical conclusions. *Am. J. Enol. Vitic.*, vol 48, N° 2, p. 264.
- Garoglio, P.G. (1981) “Nuova Enologia” Enciclopedia Vitivinicola Mondiale. Edizione AEB.
- Gaudio, M. (1990) Ercolano e il Vesuvio-Luoghi, tradizioni, vicende. Comune di Ercolano, Assessorato ai Beni Culturali. 112-113.
- Giardullo, S. (1955) I vini della Campania. *Agricoltura Napoletana*. 9-15.
- Giudici, P. e Zambonelli, C. (1992) Criteri di selezione dei lieviti per enologia. *Vignevini*, **9**: 29-34.

- Giudici, P., Romano, P., Zambonelli, C. (1990) A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal Microbiology*, **36**: 61-64.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A. e Vincenzini, M. (2002) Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res* **2**: 403-407.
- Grimont, F. & Grimont, P. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as possible taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiology*. (Paris) **137B**: 165-175.
- Gutiérrez, A.R., Santamaria, P., Epifanio, S., Garijo, P., Lopez, R. (1999) Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*, **29**: 411-415.
- Harteveld, C. L., Heister, J. G. A. M., Giordano, P. C., Losekoot, M. and Bernini, L. F. (1996) Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the  $\alpha$ -globin genes by DGGE and SSCA. *Hum. Mutat.* **7**, 114-122.
- Head, I.M., Saunders, J.R. e Pickup, R.W. (1997) Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. *Microb. Ecol.* **35**: 1-21.
- Heard, G.M. e Fleet, G.H. (1986) Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.*, **38**: 22-25.

- Heard G.M. e Fleet, G.H. (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology*, **65**: 23-28.
- Henschke, P.A. (1997) Wine yeast. In *Yeast Sugar Metabolism*, Zimmermann, F.K., Entian K-D (eds). Technomic Publishing: Lancaster, PA; 527-560.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., Cabezudo, M.D. (1990) The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulphur dioxide. *Am J Enol Vitic* **41**: 313-318.
- Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M. (2006) Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res* **6**: 102-111.
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N. (2001) The effect on the survival of non-*Saccharomyces* yeast during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 541-547.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. and Strans, N. (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 945-952.

- Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I.S. (2003) The occurrence of non-*Saccharomyces* yeast species over three vintages on four vineyards and grape musts from four production regions of Western Cape, South Africa. *S Afr J Enol Vitic* **24**: 35-42.
- Kreger van Rij, N.J.W. (1984) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, B.V. Amsterdam.
- Kunkee, R.E. e Amerine, M.A. (1970) Yeast in wine-making. In *The Yeast, vol 3, Yeast Technology*, Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds). Academic Press: New York; 5-57.
- Kurtzman, C.P. e 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. (1987) Prediction of biological relatedness among yeasts from comparisons of nuclear DNA complementarity. *Stud. Mycol.* **30**: 459-468.
- Lachance, M.A. e Stramer W.T. (1998) Ecology and yeast. In *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Kurtzman CP, Fell JW (eds). Elsevier Science: Amsterdam; 21-30.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983) Wine and brandy. In: *Reed G. (Ed) Biotechnology*, Vol. **5**: 81-161. Verlag Chemie, Heidelberg.
- Lambrechts, M.G. e Pretorius, I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S Afr J Enol Vitic* **21**: 97-129.

- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., Lollier, M. (2006) Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol* **23**: 709-716.
- Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L. (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**: 206-216.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T.G. (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**: 141-144.
- Longo, E., Velázquez, J.B., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P., Villa, T.G. (1992) Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnes, N.W. Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**: 539-541.
- Lurton, L. (1995) Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J. Sci. Food Agric.*, vol. **67**: 485-491.
- Mafart, P. (1989) Influence de la flore de fermentation sur la flaveur des vins et sélection des souches. *Revue des Oenologues*. **12**: 25-28.
- Maffezzoli, I., Galli, A., Franzetti, L., Ferrante, P. (1996) Reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca di *Listeria* spp. in alimenti e contemporanea identificazione di *Listeria monocytogenes*.

In: Porretta, S., Ricerche e Innovazioni nell'industria alimentare, Chiriotti Editori, vol.II.

- Mannazzu, I., Clementi, F., Ciani, M. (2002) Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts* (Ciani M, ed). Research Signpost, Trivandrum, India, 19–35.
- Martínez-Murcia, A.J., Acinas, S.G., Rodríguez-Valera, F. (1995) Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microb. Ecol.*, **17**: 247-256.
- Martini, A. (1984) Contributi recenti nel campo della microbiologia enologica. *Atti Accad. Ital. Vite e Vino*, **36**: 177-191.
- Martini, A. (1993) The origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyes cerevisiae*. *J Wine Res* **4**: 165-176.
- Martini, A. (1996) La collezione nazionale italiana di colture microbiche. In: BIODIVERSITÀ MICROBICA, Aspetti tassonomici, biotecnologici e metodologici. CNR-RAISA-ROMA-1996 (Manachini, P.L., Fortina, M.G., Parini, C.) 17-24.
- Martini, A., Federici, F., Rosini, G. (1980) A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can J Microbiol* **26**: 856-859.

- Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T., Pastor, A. (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to aroma of wines. *Int J Food Microbiol* **14**: 153-160.
- Mazur, P. (1961) Physical and temporal factors involved in the death of yeast at sub-zero temperatures. *Biophys. J.*, **1**: 247.
- Mazur, P. (1967) Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeast. In: Cellular injury and resistance in living organism. E. Asahina, (ed) Inst. Low Temp. Sci. Sapporo.
- Michot, B. e Bachellerie, J. (1987) Comparisons of large subunit rRNAs reveal some eukaryote-specific elements of secondary structure. *Biochimie* **69**:11–23.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4884-4893.
- Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M., Martinez-Rodriguez, S., Las Heras-Vazquez, F.J., Rodriguez-Vico, F. (2003) Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol* **19**: 297-304.
- Moio L., Genovese A., Ugliano M., Piombino P., Gambuti A. (2002) Atti del convegno: “Il vino e il territorio”.
- Mora, J., Barbas, J.I. & Mulet, A. (1990) Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces*

*thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**: 156-159.

- Mora, J., Barbas, J.I., Ramis, B., Mulet, A. (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**: 344-346.
- Morris, E.O., Eddy, M.A. (1957) Method for measurement of Wild yeast infection in pitching yeast. *J. Inst. Brew.*, **63**: 34-43. Citato da Radler e Lotz (1990).
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villani, F., Deiana, P., Coppola, S. (1998) Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. **85**: 25-36.
- Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 317–322.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.
- Myers, R. M., Maniatis, T. and Lerman, L. S. (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzimol.*, **155**: 501-527.

- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. and Maniatis T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**: 3131-3145.
- Nicol, G.W., Glover, L.A., Prosser, J.I. (2003) The impact grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environm. Microbiol.*, **5**: 152-162.
- Norris, T.B., Wraith, J.M., Castenholz, R.W., McDermott, T.R. (2002) Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6300-6309.
- Nurgel, C., Erten, H., Canabas, A., Cabaro\_lu, T., Selli, S. (2002) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavour compounds in white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**: 28-33.
- Nykänen, L. (1986) Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverage. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**: 84.
- Nykänen, L. e Suomalainen, H. (1983) Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages, D. Reidel Publishing Company 5. Dordrecht, Holland/Boston, USA/London, England, 3.
- Ogram, A. and Feng, X. (1997) Methods of soil microbial community analysis. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.C., McInerney, M.J.,

Stetzenback, L.D., Walter, M.V. (Eds), Manual of Environment Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 422-430.

- Pallmann, C.L., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A., Bisson, L.F. (2001) Use of WL medium to profile native flora fermentation. *Am J Enol Vitic* **52**: 198-203.
- Panon, G. (1997) Influence of oxygen on fermentation pattern in model media containing mixed or sequential cultures of three cider-producing yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora valbyensis* and *Metschnikowia pulcherrima*. *Sciences des Aliments*, **17**: 193-217.
- Paraggio, M. (2004) Biodiversity of a natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* from Aglianico del Vulture. *Food Technol Biotechnol* **42** (3) 165-168.
- Pardo, I., García, M.J., Zúñiga, M., Uruburu, F. (1989) Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Appl Environ Microbiol* **55**: 539-541.
- Parrish, M.E. e Carroll, D.E. (1995) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 165-169.
- Pasquarella C., Lauro P., Sannino S. (2001) “Catalanesca”, vitigno a buccia bianca. Germoplasma Frutticolo Autoctono Campano. La Grafica, Amelia L., Nocera Inferiore.

- Peynaud, E. e Domercq S., (1956) Sur les Brettanomyces isoles de raisin et du vin. *Arch. Microbiol.*, **24**: 266.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M. (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol* **20**: 217-224.
- Polsinelli, M., Romano, P., Suzzi G., Mortimer, M. (1996) Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape wine. *Letters in Applied Microbiology*, **22**: 110-114.
- Poulard, A. (1984) Influence of several factors affecting variability of the yeast microflora of musts and wines. *Vignes vins*, **326**: 18-21.
- 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.
- Pretorius, I.S. e Van der Westhuizen, T.J. (1991) The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry-a review. *S Afr J. Enol. Vitic.*, **12**: 3-31.

- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J Enol Vitic.*, **20**: 61-74.
- Querol, A. e Ramón, D. (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science & Technology*, **7**: 73-78.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992b) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2948-2952.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992b) Strain for use as dry yeast in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J Food Sci* **57**: 183-185.
- Querol, A., Jiménez, M. & Huerta, T. (1990) A study on microbiological and enological parameter during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* **55**: 1603-1606.
- Quesada, M.P. e Cenis, J.L. (1995) Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the Characterization of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. **46**, n° 2, pp. 204-208.

- Rainieri, S. e Pretorius, I.S. (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol* **50**: 15-31.
- Rankine, B.C. (1968) The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines. *Vitis*, **7**: 22-49.
- Rankine, B.C. (1972) Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23**: 152-158.
- Rankine, B.C. e Lloyd, B. (1963) Quantitative assessment of dominance of added yeast in wine fermentations. *J Food Sci Agric* **14**: 793-798.
- Rapp, A. (1998) Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* **42**: 351-363.
- Rapp, A. e Versini, G. (1991) Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ (Ed.), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. *American Society for Enology and Viticulture*, Davis, CA, 156-164.
- Rappe M.S. e Giovannini S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 369-394.
- Raspor, P., Mikli Milek, D., Polanc, J., Smole Možina, S., Šadež N. (2006) Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* **109**: 97-102.

- Rementeria, A., Rodriguez J.A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J.R., Hernando, F.L. Sevilla, M.J. (2003) Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, **86**: 201-207.
- Romano, P. (2002) Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts*. (Ciani M, ed), Research Signpost, Trivandrum, India, 99-109.
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., Fatichenti, F. (1997b) Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 239-242.
- Romano, P. (1997) Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, **35**: 255-260.
- Romano P. e Suzzi G. (1996) Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 309-315.
- Romano P., Brandolini, V., Ansaloni, C., Menzioni, E. (1998) The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**: 649-653.

- Romano, P., Palla, G., Caligari, A., Brandolini, V., Maietti, A., Salzano, G. (2000) Evaluation of stereoisomers of 2,3-butanediol and acetoin to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* wine strains. *Biotechnology Letters*, **22**: 1947-1951.
- Romano P., Suzzi, G., Mortimer, R., Polsinelli, M. (2005). Production of high level of acetoin in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast is a recessive trait. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**: 169-173.
- Romano, P., Caruso, M., Capece, A., Lipani, G., Paraggio, M., Fiore, C. (2003a) Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts. *World J Microbiol Biotechnol* **19**: 311–315.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003b) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**: 169–180.
- Romano, P., Granchi, L., Caruso, M., Borra, G., Palla, G., Fiore, C., Ganucci, D., Caligiani, A., Brandolini, V. (2003c) The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int J Food Microbiol* **86**:163–168.
- Romano, P., Soli, M.G., Tini, V. (1979) Studio e selezione clonale di lieviti per enologia. 2) I lieviti del Sangiovese di Romagna. *Vignevini*, **6**: (3), 36.

- Romano, P., Soli, M.G., Tini, V. (1980) Studio e selezione clonale di lieviti per enologia. 4) I lieviti del «Vino di Bosco» ferrarese. *Vignevini*, **7**: (1-2), 45.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. (1992) Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J Appl Bacteriol* **73**: 126-130.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Mainfreni, M. (1997b) Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J Appl Microbiol* **82**: 615-618.
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., Fatichenti, F. (1997a) Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 239-242.
- Romano, P., Suzzi, G., Zironi, R., Comi, G. (1993) Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Appl Environm Microbiol* **59**: 1838-1841.
- Rosi, I.; Bertuccioli M. (1990) Attività proteolitica extracellulare in lieviti di interesse enologico. *Annals of Microbiology and Enzimology*, **43**: 77-84.
- Rosi, I., Costamagna, L., Bertuccioli, M. (1987) Screening for extracellular acid protease(s) production by wine yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, **93**: 322-324.

- Rosi, I., Costamagna L., Bertuccioli, M. (1988) Wine protein stabilization by using proteolytic yeast strain. *Proceeding of Second International Symposium for Cool Climate Viticulture and Enology*, Auckland.
- Rosini, G. (1982) Influenza della microflora saccaromicetica della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva. *Vignevini*, **9**: 43-46.
- Rossi, F. (1890) Il Lambiccato della Regione Vesuviana. *L'Agricoltura Meridionale*.21.
- Sabaté, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón JM (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res* **157**: 267-274.
- Sabaté, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J.M. (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol* **26**: 452-455.
- Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D. (1995) Molecular probes for the diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* **33**: 2913-2919.
- Sanger, F. (1988) Sequences, sequences and sequences. *Annual Review Biochemistry*, **57**: 1-28.
- Sapis-Domercq, S. e Guittard, A. (1976) Etude de la microflore levurienne du Roussillon. *Connaiss. Vigne Vin*, **10**: 1-21.

- Sceda, R. e Yarrow, D. (1966) The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. *Archives of Microbiology*, **55**: 209-225.
- Sceda, R. e Yarrow, D. (1968) Variation in the fermentative pattern of some *Saccharomyces* species. *Archives of Microbiology*, **61**: 310-361.
- Schena L., Nigro F., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A. (2003) Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, **30**: 209-220.
- Schreier, P. (1979) Flavour composition of wines: a review. *CRC Critical review in Food Science and Nutrition*, **12**: 59-111.
- Schuller, D. e Casal, M. (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, **68**: 292-304.
- Schütz, M. e Gafner, J. (1992) Pro und kontra Reinzuchtheffe. *Weinwirtschaft Technik*, **7**: 14-15.
- Schütz, M. e Gafner, J. (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 551-558.
- Schütz, M. e Gafner, J. (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by

CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, **19**: 253-257.

- Semmola, V., (1848) Delle varietà de' vitigni del Vesuvio e del Somma. Napoli, Tipografia nel Reale Albergo de' Poveri. 1-136.
- Serao, G., (1926) La Viticoltura nella provincia di Napoli. S.I.E.M. Napoli 3-50.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. e Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40 base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. *Proc. Natl. Acad. Set, USA* **86**: 232-236.
- Shimazu, Y. e Watanabe, M. (1981) Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *J. Ferment. Technol.*, **59**: 27-32.
- Soden, A., Francis, I.L., Oackey, H., Henschke, P.A. (2000) Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Austr J Grape Wine Res*, **6**: 21-30.
- Soles, R.M., Ough, C.S. e Kunkee, R.E. (1982) Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**: 94-98.

- Soli, M.G., Romano, P., Grazia, L., Zambonelli, C. (1976) Studio e selezione dei lieviti da «Lambrusco». I. Caratterizzazione dei ceppi isolati da mosti solfitati. *Vignevini*, **3**: (11-12), 17.
- Soufleros, E., Paneras, E., Sapis-Domercq, S. (1979) Etude ecologique de la microflore levurienne de la region vinicole de Naoussa. *Connaiss. Vigne Vin*, **13**: 137-48.
- Sponholz, W.R. e Dittrich, H.H. (1974) Die bildung von SO<sub>2</sub>-bindenden Gärungs-Nebenprodukten, höheren Alkoholen und Estern bei einigen Reinzachthefestämmen und bei einigen für die Weinbereitung wichtigen “wilden” Hefen. *Wein Wissenschaft*, **29**: 3011-304.
- Sponholz, W.R. e Dittrich, H.H. (1974) The formation of fermentation by-products which bind SO<sub>2</sub> of higher alcohols and esters by several pure culture yeasts and by enologically important wild yeasts. *Wein-Wiss*, **29**: 301-314.
- Stainer, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. (1988) Il mondo dei microrganismi. Cap.2: I metodi della microbiologia, 17-41. Zanichelli, Bologna.
- Suomalainen, H. e Lehtonen, M. (1979) The production of aroma compounds by yeasts. *J. Inst. Brew.*, **85**: 149-156.
- Suzzi, G., Romano, P. (1980) Studio e selezione clonale di lieviti per enologia. 5) I lieviti dei vini piacentini (Monterosso, Gutturnio ed altri). *Vignevini*, **7**: (10), 41.

- Thanh, V.N., Hai, D.A., Lachance, M.A. (2003) *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. *FEMS Yeast Res* **4**: 113-117.
- Tini, V., Romano, P., Soli, M.G. (1979) Studio e selezione clonale di lieviti per enologia. 1) I lieviti del Trebbiano di Romagna. *Vignevini*, **6**: (2), 21.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 345-352.
- Török, T., Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M., (1996) Quest for wine yeast-an old story revisited. *J Ind Microbiol.*, **17**: 303-313.
- Usseglio-Tomasset, L. e Stefano, R.D. (1981) Variabilities in the production of volatile components with the same yeast strain. *Vini Ital.*, **23**: 249-264.
- Usseglio-Tomasset, T. e Ciolfi, G. (1981) Osservazioni sulla flora lievitifforme presente sulle uve al momento della vendemmia. *Vignevini*, **8**: 51.
- van der Walt J.P. e van Kerken A.E., (1959) The wine yeasts of the Cape. Part II. The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and

*Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. A. van Leeuwenhoek, **25**: 145.

- van der Walt J.P. e van Kerken A.E., (1961a) The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. A. van Leeuwenhoek, **27**: 81.
- van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E., Gerlosky, W. (2003) Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**: 149-154.
- Vaughan-Martini, A. e Martini, A. (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol* **14**: 514-522.
- Verona O. e Florenzano G., (1947) Sulla presenza e l'intervento nella fermentazione vinaria di alcune specie del genere *Brettanomyces*. *Ric. Sci.*, **17**.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environm. Microbiol.*, **61**: 3521-3529.
- Vilanova, M., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. (2005) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on general composition and sensorial properties of white wines made from *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Food Technology and Biotechnology*, **43**: 79-83.

- Vincenzini, M., Romano, P., Farris, G.A. (2005) *Microbiologia del vino*. Casa Editrice Ambrosiana.
- Visser, W., Scheffers W.A., Batenburg-Van Der Vegte W.H., Van Dijken J.P. (1990) Oxygen requirements of yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3785-3792.
- Walker, G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley: New York.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Williams, G., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, A., Tingey, S. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, **18**: 6531-6535.
- Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** : 3741-3751.
- Wucherpfennig, K. e Bretthauer, G. (1970) Über die Bildung von flüchtigen Aromastoffen in Traubenwein in Abhängigkeit von der Mostbehandlung sowie von der verwendeten Heferasse. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **20**: 36-46.

- Yeates, C. e Gillings, M.R. (1998) Rapid purification of DNA from soil for molecular biodiversity analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 49-53.
- Zambonelli, C. (1998) Microbiologia e biotecnologia dei vini. Edagricole-Edizioni Agricole.
- Zambonelli, C., Tini, V., Castellari, L. (2000) Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia. Calderini, Edagricole.
- Zambonelli, C., Tini, V., Coloretti, F., Benevelli, M. (2004) Lieviti indigeni in fermentazioni scallari. *Vignevini*, **11**: 107-109.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., Comi, G. (1993) Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **15**: 235-238.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S. (1995) Wine Analysis and Production. *Chapman and Hall: New York*.