



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Agraria

Laurea Triennale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**SELEZIONE DI CEPPI AZIENDALI DI
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ISOLATI DA
FERMENTAZIONI SPONTANEE DI MALVASIA
DI BOSA**

Relatore:

Prof.ssa Marilena Budroni

Correlatore:

Dott. Giacomo Zara

Elaborato finale di:

Alberto Tanda

Anno Accademico 2015/2016

A Giorgio,

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella realizzazione della Tesi, la Professoressa Marilena Budroni e il dott. Giacomo Zara per avermi guidato in questa esperienza, mio zio Luigi ed infine la mia famiglia.

Sommario

INTRODUZIONE	7
Malvasia di Bosa.....	7
I lieviti enologici.....	7
Fermentazione spontanea.....	8
Lieviti flor e affinamento biologico.....	10
La fermentazione guidata.....	11
Scopo del lavoro	12
MATERIALI E METODI	13
Ceppi e piano di campionamento.....	13
Substrati colturali	14
Isolamento dei lieviti	14
Selezione dei lieviti.....	14
Identificazione e caratterizzazione molecolare	15
Estrazione DNA genomico.....	15
Amplificazione delle regioni ITS mediante PCR.....	15
Amplificazione delle regioni minisatelliti mediante PCR.....	16
Prova di fermentazione	19
Prova di florizzazione su terreno di florizzazione (YNB+ etanolo)	19
Prova di florizzazione su vino	19
RISULTATI e DISCUSSIONE.....	19
Isolamento dei lieviti	19
Master degli isolati a fine fermentazione.....	21
Identificazione e caratterizzazione molecolare.....	22
Caratterizzazione tecnologica	23
Test di florizzazione	24
CONCLUSIONI.....	26
BIBLIOGRAFIA	26

RIASSUNTO

La selezione di ceppi aziendali è una pratica sempre più in uso poiché permette l'utilizzo di lieviti locali che si sono meglio adattati a fermentare uno specifico substrato e a determinate condizioni tecnologiche di produzione dei vini. I lieviti aziendali consentono di produrre vini caratterizzati da un forte legame con il territorio e la cantina di produzione, e differenziarlo dagli altri. Questo studio è stato condotto nella cantina Cau di Bosa sui lieviti della Malvasia di Bosa fermentata spontaneamente. Sono stati isolati 69 lieviti e dopo identificazione e caratterizzazione molecolare e tecnologica, sono stati selezionati sei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*. Dai risultati ottenuti si evidenzia la presenza in cantina di un ceppo dominante aziendale.

ABSTRACT

The selection of corporate strains is a always more in use practice because it allows the use of local yeasts which are better adapted to ferment a specific substrate and in certain technological conditions of the production of wines. The corporate yeasts allow to produce wines characterized by a close link with the territory and the production cellar, and differentiate them from others. This study was conducted in Cau's cellar of Bosa on yeasts from the "Malvasia di Bosa" fermented spontaneously. The 69 yeasts were isolated and after being identified, and molecular and technological characterized, and it were selected six strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Our results highlight the presence in the cellar of a corporate's dominant strain.

INTRODUZIONE

Malvasia di Bosa

È un vitigno iscritto nel Registro nazionale delle varietà italiane di vite a bacca bianca e come Malvasia di Sardegna nell'Elenco delle varietà raccomandate in tutta l'Isola (Reg. Cee 1250/70, D.M. 25/5/1970).

La Malvasia di Bosa, insieme al Moscato e al Cannonau, occupava un posto importante tra le coltivazioni nella Sardegna spagnola (XVI-XVII secolo), come attestano le parole di una relazione trasmessa nel 1612 al Re di Spagna Filippo III dall'inviato nell'Isola Martin Carrillo “*Los vinos son tintos y blanco, y canonates de color como rubi, muy sano, y muy bueno; el blanco es de moscate, y malvasia, y otros muy buenos..*” (Ferrante, 2000). Il vitigno viene poi citato da Manca dell'Arca (1780) e dal Moris (1837) che lo chiama *Vitis Malvatica* e lo inserisce tra le varietà ad acini bianchi e rotondi. La qualità dei vini di Malvasia prodotti nei territori di Bosa e Cagliari viene sottolineata da Mameli (1913) in un'ampia scheda ampelografica del vitigno. La diffusione della Malvasia in Planargia (nei Comuni di Bosa, Suni, Tinnura, Flussio, Magomadas, Tresnuraghes, Modolo, in Provincia di Oristano) è pari a circa 132,42 ha, ricadenti soprattutto nel comune di Bosa, con 55,21 ha circa (41,7% sulla superficie totale a Malvasia della Planargia) (dati Agenzia regionale LAORE, 2014). In questo comune l'incidenza della Malvasia su superficie vitata totale è del 74,9 %, con 87 aziende attive nel settore vitivinicolo. Per quanto riguarda i vigneti iscritti alla D.O.C. Malvasia di Bosa, nel territorio di Bosa siamo a circa 13,81 ha (50,62% del totale dei vigneti a Malvasia DOC). Le uve sono utilizzate prevalentemente per la vinificazione in purezza che consente di produrre il vino Malvasia di Bosa D.O.C. (D.P.R. 21/6/1972; 21/7/1972), con resa pari a 110 q/ha. La Malvasia di Bosa si può produrre solo in Planargia e comprende le tipologie dolce naturale, riserva, spumante e passito.

I lieviti enologici

I lieviti sono microorganismi appartenenti al *phylum* dei funghi, essi partecipano alla trasformazione della sostanza organica e sono utilizzati nelle principali produzioni delle industrie agro-alimentari. In ambito enologico, sono responsabili della fermentazione alcolica, producono anche altri prodotti secondari come esteri, aldeidi, alcoli superiori, terpeni, che partecipano alla caratterizzazione chimica e sensoriale del vino.

Il contributo del lievito è fondamentale anche alle trasformazioni che avvengono durante la fase di maturazione ed affinamento (invecchiamento) biologico del vino come nel caso di vini affinati sotto flor (biofilm) o in fase di rifermentazione per gli spumanti. L'origine dei lieviti presenti in cantina sono le uve. In particolare, durante le diverse fasi della maturazione dei grappoli varia la concentrazione e la composizione della microflora dei lieviti presenti sugli acini (Rosini, 1982). Le specie più frequentemente isolate dalle uve a piena maturità sono *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum* e *Metschnikowia pulcherrima*. *Saccharomyces cerevisiae*, la specie di interesse enologico più importante, è raramente presente sulla superficie degli acini, ma è presente e domina nel mosto grazie a contaminazioni ambientali in cantina (Pretorius, 2000).

Fermentazione spontanea

Nel mosto la fermentazione avviene spontaneamente grazie ai lieviti che erano presenti nella superficie degli acini e nella cantina. Con la fermentazione ha inizio la trasformazione da zuccheri in alcol; quindi il mosto si riscalda e libera CO₂. La fermentazione alcolica spontanea, senza l'inoculo di lieviti noti, non è un processo semplice da gestire e porta spesso a risultati deludenti soprattutto in mosti che provengono da varietà apprezzate e danno luogo a vini che non esprimono tutta la loro potenziale qualità (Coratza et al., 1992). La difficile gestione della fermentazione spontanea dipende dalla elevata variabilità nella composizione della microflora spontanea, fortemente condizionata da fattori difficilmente controllabili dall'uomo: temperatura, piogge, grado di maturazione dell'uva, presenza di patogeni ed insetti, uso di fitofarmaci ecc.

Inoltre i lieviti selvatici non-*Saccharomyces* che iniziano la fermentazione, in quanto presenti in elevate quantità sulle uve, sono generalmente poco resistenti all'alcol e possono produrre elevate quantità di acido acetico e di altri composti poco graditi nel vino. Per queste loro caratteristiche e per la bassa resistenza all'azione dell'anidride solforosa (SO₂), non sono apprezzati per condurre fermentazioni in purezza. Fra i non-*Saccharomyces* i lieviti apiculati *Kloeckera spp* e *Hanseniaspora spp*, sono caratterizzati da una bassa produzione di alcol etilico e, in maggior misura, di prodotti secondari. Altri lieviti non-*Saccharomyces* che si possono trovare sugli acini sono appartenenti ai generi *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces*. Generalmente, nel corso della fermentazione spontanea, si assiste ad una successione di specie e generi di lievito in funzione della variabile resistenza all'etanolo dei non-*Saccharomyces*.

Infatti, sebbene possano raggiungere concentrazioni di 10^6 - 10^7 CFU/ml, a circa metà fermentazione e ad una concentrazione alcolica di circa 8-10% vol/vol vengono sostituiti da ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, che tollera alte percentuali di etanolo (Beltrán et al., 2002), e specie correlate come *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Schizosaccharomyces spp*, che sono più competitive per la crescita nel mezzo (Querol et al., 1990) e sono in grado di completare il processo fermentativo (Fleet and Heard 1993). La produzione di etanolo da parte di *S.cerevisiae* è il fattore più importante nel condizionare la crescita dei non-*Saccharomyces* durante la fermentazione. Generalmente, le specie di *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* non sono tolleranti a concentrazioni di etanolo maggiori a 5-7% (Heard and Fleet, 1988). Comunque, le basse temperature diminuiscono la sensibilità di queste specie all'etanolo e, di conseguenza, le fermentazioni vinarie condotte a temperature inferiori ai 15-20°C potrebbero mostrare un maggior contributo da parte di specie come *Hanseniaspora* e *Candida*. In queste condizioni, queste specie potrebbero predominare a lungo insieme a *S. cerevisiae* fino al termine della fermentazione e, perciò, influenzare positivamente le caratteristiche del vino, enfatizzando proprietà aromatiche e complessi profili gustativi (Heard and Fleet, 1988; Erten, 2002). Altri lieviti, come *Brettanomyces spp*, *Schizosaccharomyces spp*, *Torulaspota spp* e *Zygosaccharomyces spp*, potrebbero esser presenti durante la fermentazione o l'invecchiamento del vino, e a causa di modificazioni nei parametri fermentativi, dominare parte del processo e influire sfavorevolmente sulla qualità del vino (Pretorius, 2000).

Innumerevoli fonti riportano l'influenza benefica e/o alterativa dei lieviti non-*Saccharomyces* sulla composizione aromatica del vino (Ciani and Maccarelli, 1998; Granchi et al., 2002; Romano, 2002; Mingorance-Cazorla et al., 2003; Plata et al., 2003; Romano et al., 2003c; Clemente-Jimenez et al., 2004). Questi lieviti producono pectinasi, β -glicosidasi, proteasi, esterasi e lipasi, enzimi che interagendo con i composti precursori presenti nelle uve, permettono di esaltare l'aroma varietale e di migliorare il processo di vinificazione (Fleet and Heard, 1993; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Fernandez et al., 2000; Cordero Otero et al., 2003).

A fine fermentazione possono intervenire altri lieviti non-*Saccharomyces*, i lieviti della fioretta *Pichia membranifaciens*, *Candida vini* e *Hansenula anomala*, caratterizzati da una esclusiva attività aerobia, che in vini a contatto con l'ossigeno sono capaci di ridurre la concentrazione alcolica e produrre elevate quantità di acido acetico ed acetato di etile (Zambonelli 1988).

Tuttavia, recentemente si stanno diffondendo le fermentazioni miste che prevedono l'utilizzo in co-inoculo o in successione di un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* preceduto da un ceppo di lievito non-*Saccharomyces*, appositamente selezionati e caratterizzati in modo da conferire maggiore complessità alle caratteristiche sensoriali del vino. In questo caso le condizioni di fermentazione sono controllate e guidate grazie all'utilizzo di SO₂ e alla selezione dei ceppi utilizzati in modo da evitare i problemi associati ad una fermentazione spontanea incontrollata.

Lieviti flor e affinamento biologico

I lieviti flor sono ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* che al termine della fermentazione, in contenitori scolmi, sono in grado di risalire sulla superficie del vino e formare un velo o biofilm. Questo è un meccanismo di sopravvivenza adottato per sfuggire alle proibitive condizioni quali: la scarsità o assenza di zuccheri da fermentare e di sostanze azotate.

Quando il biofilm si completa e colonizza tutta la superficie all'interfaccia aria/vino la sua presenza evita l'ossidazione delle sostanze coloranti del vino riducendo il contatto con l'ossigeno. Al contrario l'ambiente aerobio permette ai lieviti flor di passare dal metabolismo anaerobio fermentativo a quello aerobio ossidativo (*shift diauxico*) a spese di alcuni prodotti della fermentazione: etanolo, glicerina, acido acetico, prolina vengono utilizzati e altri metaboliti sono invece prodotti. In particolare aumenta il contenuto di acetaldeide, apprezzata nei vini invecchiati biologicamente perché responsabile di peculiari aromi e sapori (Farris et al. 1990), e di altri composti aromatici come acetali ed esteri. Viene degradato anche l'acido malico, con ottenimento di ossiacidi ed altri composti. La diminuzione iniziale di alcol (dovuta al suo consumo come nutrimento) è compensata dalla contemporanea evaporazione d'acqua attraverso le botti, tale da determinare un incremento del grado alcolico.

Importante è il contenitore in cui avviene il processo di florizzazione: non deve cedere alcuna sostanza al vino (es. polifenoli) che rischierebbe di mascherare l'aroma dell'affinamento biologico ed inoltre potrebbe ostacolare la formazione del velo. Per questo motivo si consigliano contenitori neutri come le botti in legno di castagno, povero in tannini e poroso per l'affinamento biologico di Vernaccia e Malvasia.

La fermentazione guidata

Visti i problemi che la fermentazione spontanea può presentare, l'industria enologica utilizza un processo estremamente semplificato dal punto di vista microbiologico: la fermentazione guidata. La fermentazione alcolica del mosto è quindi affidata ad un solo ceppo starter di *Saccharomyces cerevisiae*, generalmente inoculato ad una elevata concentrazione cellulare (10^6 cellule/ml) in modo da prendere il sopravvento sulla microflora selvaggia. I ceppi starter di *S. cerevisiae* sono dotati di elevato potere alcoligeno e normalmente assicurano un'attività fermentativa costante e in purezza (fino ad esaurimento degli zuccheri). Inoltre l'inoculo massiccio di ceppi starter permette di inibire la crescita dei lieviti selvaggi cioè sia i non-*Saccharomyces* che i *Saccharomyces* eventualmente presenti sulle uve o in cantina. L'uso dei ceppi starter permette di semplificare il processo di fermentazione e consente di ottenere risultati costanti e programmabili, tuttavia l'eliminazione dei lieviti non-*Saccharomyces* e dei ceppi spontanei di *Saccharomyces* comporta l'appiattimento delle proprietà sensoriali del vino finito. Come detto infatti i lieviti spontanei possono favorire la produzione di un aroma più complesso e in generale caratterizzare il vino stesso (Lema et al., 1996; Henick-Kling et al., 1998; Heard, 1999). Molti lavori hanno mostrato l'effetto positivo della fermentazione spontanea sulla complessità organolettica del vino come una conseguenza della attività metabolica di differenti specie/ceppi (La Jeune et al. 2006; Wondra and Boveric 2001).

Inoltre i ceppi selezionati commerciali di *S. cerevisiae*, seppur disponibili in un certo numero (a partire dal ventesimo secolo sono stati identificate diverse centinaia differenti ceppi di *Saccharomyces*) (Robinson 2006) posseggono caratteristiche enologiche molto simili, e portano alla produzione di vini con qualità standard. Un recente studio ha infatti dimostrato che, grazie al sequenziamento del genoma di 212 ceppi, di cui 119 starter commerciali distribuiti da 9 diverse compagnie produttrici, si è osservata una forte percentuale di imbreeding. Questo fa ritenere che i ceppi starter vinari siano molto simili fra loro e portatori di un pool genetico molto limitato, se confrontato alla diversità genetica mostrata dalla specie *S. cerevisiae* (Borneman et al., 2016).

Utilizzare ceppi commerciali che possiedono una combinazione ideale di caratteristiche tecnologiche adattabili a tutti i tipi di processi produttivi enologici è una possibilità molto difficile da realizzare. Al contrario, lieviti isolati da specifiche aree geografiche, comunemente indicati come lieviti locali e/o aziendali, sono in grado di caratterizzare in maniera specifica il vino prodotto nelle aree di isolamento (Ranieri and Pretorius, 2000). Per queste ragioni avere una fermentazione stabile e controllabile non può essere l'unico obiettivo di un enologo che vuole differenziare il suo vino e renderlo unico.

I lieviti locali meglio adattati a fermentare in uno specifico mosto d'uva in cui si sono selezionati, potrebbero perciò essere una valida alternativa agli starter commerciali.

Isolare, caratterizzare e selezionare ceppi di lievito locali da inoculare in una fermentazione guidata comporta diversi vantaggi rispetto alla fermentazione spontanea e a quella guidata con ceppi starter commerciali. Innanzitutto è possibile mantenere e stabilizzare le caratteristiche qualitative del prodotto, legate al *terroir*. Il vino è probabilmente una delle più importanti bevande fermentate in cui il riconoscimento della "territorialità" è fondamentale per il suo gradimento. Il termine "*terroir*", definito come un ecosistema in cui la vite interagisce con i fattori ambientali (suolo e clima) interessando la qualità e la tipicità del vino prodotto in un particolare luogo, riguarda un aspetto base dell'analisi sensoriale dei vini (Mazzei et al., 2010).

In secondo luogo l'aggiunta di specifici ceppi di lieviti locali produrrebbe un aroma controllato ed efficace, influenzando le qualità organolettiche del vino (Koulougliotis e Eriotou, 2016).

Infine è possibile prevedere l'utilizzo di lieviti locali in fermentazioni miste ed in particolare in fermentazioni sequenziali che utilizzano un lievito non-*Saccharomyces* con un ceppo di *S. cerevisiae*, appositamente selezionati. Le fermentazioni miste costituiscono una via per dare maggiore complessità ai vini enfatizzando quei particolari caratteri tipici delle fermentazioni spontanee ma senza i rischi tecnologici che queste ultime comportano (Ciani et al., 2010).

Da quanto detto risulta importante lo studio, la conservazione e l'utilizzazione di un patrimonio microbiologico di cui la Sardegna può ancora usufruire, soprattutto in zone ad alta vocazione viticola come la Planargia, grazie alla scarsa presenza di cantine che fanno uso di lieviti selezionati. Queste condizioni possono favorire la conservazione dei pool genici, e la selezione di ceppi starter aziendali in grado di sviluppare l'aroma di uve come la Malvasia di Bosa.

Scopo del lavoro

Nell'ottica del miglioramento del processo di produzione di vini tipici e di qualità, va considerata la selezione e l'utilizzo di ceppi di lievito autoctoni, cioè presenti nella zona di produzione nelle diverse fasi della fermentazione spontanea dei mosti. Lo scopo del lavoro di tirocinio è quindi quello di isolare, identificare e caratterizzare tecnologicamente e molecolarmente ceppi di lieviti aziendali in grado di dominare la fermentazione ed esaltare gli aromi della Malvasia di Bosa DOC.

L'idea alla base di questa strategia è che i lieviti in grado di esaltare le caratteristiche di tipicità di un vino sono quelli che, nel corso dei decenni, sono stati selezionati proprio per la produzione di quello specifico vino. Da qui la convinzione di utilizzare lieviti selezionati locali, cioè naturalmente presenti nella zona di produzione e responsabili della fermentazione spontanea, con lo scopo di ottenere un prodotto tipico e di qualità.

MATERIALI E METODI

Ceppi e piano di campionamento

I lieviti oggetto di studio sono stati isolati nella Cantina del dott. Cau da mosto di Malvasia appena ottenuto (1° campionamento) e dal vino a fine fermentazione al momento del travaso (2° campionamento). In particolare il secondo campionamento ha previsto la raccolta dei campioni da tre diversi contenitori in acciaio e tre zone: le fecce, il fondo e la superficie del contenitore.

Complessivamente sono stati quindi raccolti 12 campioni indicati con le sigle riportate in tabella:

Tabella 1. Schema del prelievo dei campioni.

		contenitore 1	contenitore 2	contenitore 3
I campionamento (mosto)		M1	M2	M3
II campionamento (vino)	Superficie	T1a	T2a	T3a
	Fondo	T1b	T2b	T3b
	Fecce	T1c	T2c	T3c

Come ceppo di confronto nelle prove di florizzazione su vino è stato utilizzato il ceppo flor di *Saccharomyces cerevisiae* A9 che appartiene alla collezione di microrganismi dell'Istituto di Microbiologia generale ed applicata dell'Università degli Studi di Sassari.

Substrati colturali

YPD agar per crescita e mantenimento degli isolati: bacto-yeast-extract 1%; bacto-peptone 2%; glucosio 2%; bacto-agar 2%.

YPD liquido per le precolture: bacto-yeast-extract 1%; bacto-peptone 2%; glucosio 2%.

WL nutrient agar terreno differenziale per l'identificazione degli isolati: su un litro di acqua distillata, 79g di W.L. (Oxoid) e 2,5g di Agar.

YNB (terreno precolturale per la florizzazione): 0,67% yeast nitrogen base without amino acids (DIFCO).

Mosto di Malvasia, prelevato e conservato in bottiglie di vetro dopo pasteurizzazione, è stato utilizzato per le prove di fermentazione.

Vini Malvasia (Acidità totale (g/l) 6,90; Acidità volatile (g/l) 0,45; pH 3,33; Alcol 15,00 % vol/vol; anidride solforosa totale 115 mg/l) e Marsala (Marco de Bartoli [®]), utilizzati nelle prove di florizzazione.

Terreno di florizzazione: YNB (senza amminoacidi, con amminosolfato) + 4% di etanolo; sterilizzazione per filtrazione, impiegato per la prova di florizzazione su terreno sintetico.

Isolamento dei lieviti

Da ogni campione è stato prelevato 1 ml mosto/vino successivamente diluito serialmente (fino a 10^{-6}) in acqua peptonata sterile. Dalle diluizioni 10^{-3} e 10^{-4} si è seminato per spandimento su piastre petri contenenti i terreni colturali YPD e WL. Le piastre sono state messe ad incubare a 25°C per 48-72h.

Selezione dei lieviti

Le colonie ottenute al termine della fase di isolamento sono state contate e sono stati selezionati 69 isolati sulla base delle caratteristiche morfologiche (grandezza, colore, forma, margine) e trasferiti su piastra master su terreno YPD. Ogni isolato è stato infine trasferito in criotubi contenenti 40% YPD liquido + 60% glicerolo e conservato a -80°C.

Identificazione e caratterizzazione molecolare

Estrazione DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico è stato seguito il seguente protocollo.

Quindici isolati (Sc2, Sc3, Sc14, Sc16, Sc17, Sc25, Sc27, Sc33, Sc35, Sc41, Sc43, Sc46, Sc48, Sc54, Sc59) sono stati precultivati in WL a 25 °C per 3 giorni circa, sono state prelevate le cellule dalla piastra con un'ansa e poste in Eppendorf in 300 µl della Soluzione 1 (0,1M Tris pH 8, 50 mM EDTA pH8, 1% SDS). In seguito all'aggiunta di 0,3 grammi di sfere di vetro i campioni sono stati vortexati per 1 minuto, messi in ghiaccio e rivortexati per 3 minuti. Per denaturare eventuali DNAsi i campioni sono stati quindi trasferiti in acqua bollente per 10 minuti.

Successivamente ad ogni campione sono stati aggiunti, nell'ordine: 20µl di 1M tris-HCl, 15µl di 0,5M EDTA, 50µl SDS 10%, 200µl 5M Kacetato, avendo cura di mischiare per inversione e porre il tutto in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti (velocità max). A questo punto è stato prelevato un quantitativo di 500-600 µl di surnatante che è stato posto in nuove eppendorf e aggiunto lo stesso volume di propanolo freddo; il tutto è stato mischiato per inversione. In seguito ogni campione è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente, centrifugato un'altra volta per 10 minuti ed eliminato il surnatante. Dopo aver lavato il pellet di DNA in 0,5 µl di etanolo al 70%, è stato centrifugato per 5 minuti ed eliminato nuovamente il surnatante.

Infine il pellet è stato risospeso in 150µl di TE e i campioni trasferiti per 15 minuti in stufa a 30 °C.

La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state determinate per via spettrofotometrica leggendo le assorbanze a 260nm e 280nm.

Amplificazione delle regioni ITS mediante PCR

Le regioni ITS (internal transcribed spacer) del genoma degli organismi eucarioti contengono il gene 5,8S che codifica per l'rRNA 5,8S; insieme all'rRNA 5S e all'rRNA 28S costituisce la subunità 60S del ribosoma eucariota. Il complesso delle regioni ITS presenta un'elevata variabilità interspecifica, pertanto l'analisi degli amplificati delle regioni ITS consente l'identificazione tassonomica delle specie di lieviti (Zaroso et al., 1999).

Per l'identificazione molecolare è stato seguito il seguente protocollo: 0,5 µl di DNA, precedentemente estratto dai vari isolati (Sc2, Sc3, Sc33, Sc41, Sc43, Sc54), è stato aggiunto al mix per PCR (24,5µl) così composto:

<i>Reagenti</i>	Concentrazione finale
Buffer 10X	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	0,5µM
Primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	0,5µM
Taq polimerase	1 Unità
DNA	50 ng
H ₂ O	A volume
Tot:	25µl

Il mix di reazione è stato amplificato utilizzando il seguente protocollo.

Fase	T(°C)	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95	05:00	1
Denaturazione	95	00:30	35
Appaiamento	54	02:00	
Estensione	72	07:00	
Estensione finale	72	07:00	1

Amplificazione delle regioni minisatelliti mediante PCR

In *S. cerevisiae* sono stati descritti 84 microsatelliti, pertanto, ceppi diversi possono essere differenziati sulla base della diversa lunghezza di uno o più di questi *loci*. Infatti le regioni minisatellite, in qualità di hot spot per la ricombinazione genica, sono la causa del polimorfismo di lunghezza e rappresentano il target per l'identificazione molecolare di ceppi differenti all'interno della stessa specie (Marinangeli et al., 2004).

SEDI. Per l'identificazione molecolare è stato seguito il seguente protocollo: 50ng di DNA, precedentemente estratto dai seguenti isolati Sc2, Sc3, Sc33, Sc41, Sc43, Sc54, è stato aggiunto al mix per PCR (24,5µl) così composto:

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer 10X	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
Primer <i>SED r</i> (5'-TTATAAGAATAACATAGCAACACCAGCCAAACC-3')	2 µM
Primer <i>SED f</i> (5'-ATGAAATTATCAACTGTCCTATTATCTGCCGG-3')	2 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng
H ₂ O	A volume
Tot:	25µl

Il DNA target è stato amplificato utilizzando il seguente protocollo:

Fase	T(°C)	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95	03:00	1
Denaturazione	95	01:00	35
Appaiamento	64	01:00	
Estensione	72	02:00	
Estensione finale	72	07:00	1

HSP150. Per l'identificazione molecolare è stato seguito il seguente protocollo: 0,5 ng di DNA, precedentemente estratto dai vari isolati (T_{1aB}, T_{1aC}, T_{2bO}, T_{2bZ}, T_{3aA}, T_{3bN}), è stato aggiunto al mix per PCR (24,5µl) così composto:

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer 10X	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
Primer <i>HSP150r</i> (5'-TACCGGACAAACATTGGTAGAAGACA-3')	2 µM
Primer <i>HSP150f</i> (5'-CACTTTGACTCCAACAGCCACTTACA-3')	2 µM
Taq polimerase	1 U
DNA	50 ng
H ₂ O	A volume
Tot:	25 µl

Il DNA target è stato amplificato utilizzando il seguente protocollo:

Fase	T(°C)	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95	04:00	1
Denaturazione	95	00:30	35
Appaiamento	64	00:30	
Estensione	72	01:00	
Estensione finale	72	07:00	1

Un'aliquota pari a 5 µl degli amplificati dei geni *SED1* e *HSP150* è stata analizzata su gel di agarosio 1,5% dopo corsa elettroforetica a 80V per 60 e 90 minuti rispettivamente utilizzando il *DNA Ladder 1kb (Euroclone)* come marcatore molecolare. Le analisi sono state realizzate utilizzando il *Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad)*.

Prova di fermentazione

I lieviti isolati su WL sono stati precoltivati in beute da 300 mL contenenti 50 ml di YPD liquido a 28°C in agitatore (200 rpm), per 24 ore. Successivamente è stata valutata la concentrazione cellulare delle precolture con lettura della densità ottica allo spettrofotometro (OD600). I lieviti sono stati quindi inoculati ad una concentrazione finale di 5×10^5 cell/ml in beute da 100 ml chiuse con valvola di Muller e riempite con 75 ml di mosto di Malvasia per 20 giorni a 25°C. La prova è stata condotta in doppio per ogni isolato. La produzione di alcool etilico è stata determinata per calo ponderale.

Prova di florizzazione su terreno di florizzazione (YNB+ etanolo)

I 6 ceppi selezionati, precoltivati nelle condizioni descritte nel paragrafo precedente, sono stati inoculati in concentrazione di 1×10^6 cell/ml in falcon da 15 ml, centrifugate (3 minuti a 2000 rpm) ed il pellet lavato con acqua sterile. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in 5 ml di terreno di florizzazione, e le colture poste in cella termostata a 25°C per una settimana in statico. L'esperimento è stato svolto in 2 repliche.

Prova di florizzazione su vino

Due ceppi isolati in questo lavoro (Sc41, Sc33) ed il ceppo A9 (controllo) sono stati precoltivati e inoculati in 100 ml di YPD liquido + 4% di etanolo. Dopo 24 ore a 28°C in statico, 5 ml delle colture ad una concentrazione di 1×10^8 cell/ml sono stati trasferiti in nuove beute contenenti 100 ml di YPD liquido + 8% di etanolo. Dopo 24 ore a 28°C, le colture ottenute sono state poste in Falcon da 50ml, centrifugate a 3000 rpm per 3 minuti, eliminato il surnatante ed aggiunti 40 ml di vino Marsala per il lavaggio del pellet, miscelato per inversione e di nuovo centrifugato a 3000 rpm per altri 3 minuti. Infine le colture sono state trasferite in beute da 500 ml contenenti 200 ml di vino Malvasia e vino Marsala.

L'esperimento è stato svolto in doppio per ogni ceppo quindi son state allestite 2 prove di florizzazione per ciascun vino.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Isolamento dei lieviti

Allo scopo di valorizzare la Malvasia di Bosa mediante l'uso di ceppi starter locali di *S. cerevisiae*, l'attività di ricerca ha riguardato inizialmente l'isolamento di 69 lieviti presenti nel mosto e nel vino Malvasia di Bosa a fine fermentazione presso la cantina Cau di Bosa.

Tabella 2. Sigle dei campioni isolati e loro provenienza.

I CAMPIONAMENTO (MOSTO)			
Contenitore	M ₁	M ₂	M ₃
Campioni	nSc1,nSc2, nSc3	nSc4	nSc5,nSc6,nSc7
II CAMPIONAMENTO (VINO)			
	Superficie	Fondo	Fecce
Contenitore 1	T _{1a}	T _{1b}	T _{1c}
Campioni	Sc1,Sc2,Sc3,Sc4,Sc5, Sc6, Sc7, Sc8, Sc9, Sc10, Sc11, Sc12, Sc13, Sc14	Sc15, Sc16, Sc17, Sc18, Sc19, Sc20	/
Contenitore 2	T _{2a}	T _{2b}	T _{2c}
Campioni	Sc21, Sc22, Sc23, Sc24, Sc25, Sc26, Sc27, Sc28, Sc29, Sc30, Sc31, Sc32	Sc33, Sc34, Sc35, Sc36, Sc37, Sc38, Sc39, Sc40, Sc41, Sc42	/
Contenitore 3	T _{3a}	T _{3b}	T _{3c}
Campioni	Sc43, Sc44, Sc45, Sc46, Sc47, Sc48, Sc49, Sc50, Sc51	Sc52, Sc53, Sc54, Sc55, Sc56, Sc57, Sc58, Sc59, Sc60, Sc61, Sc62	/

Tutti gli isolati ottenuti sono stati conservati in YPD più glicerolo al 60% a -80°C.

Per le prove successive sono stati selezionati solo gli isolati le cui colonie su WL presentavano il seguente aspetto morfologico, corrispondente al genere *Saccharomyces*: aspetto cremoso e opaco, colore bianco crema-verde pallido, bordi lisci (Pallmann et al., 2001).

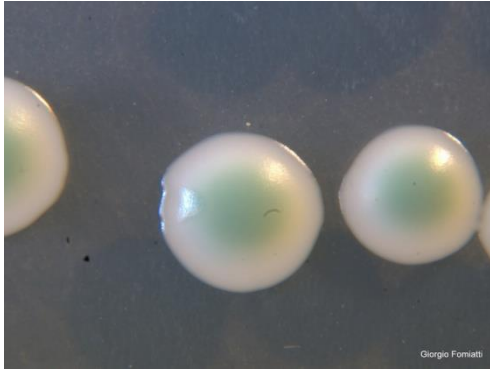


Figura 1. *S. cerevisiae* su piastra di W.L. agar

Master degli isolati a fine fermentazione

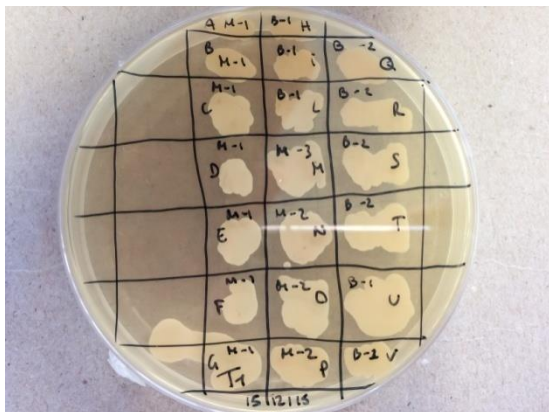


Figura 2. Master degli isolati dal contenitore 1 (T1)

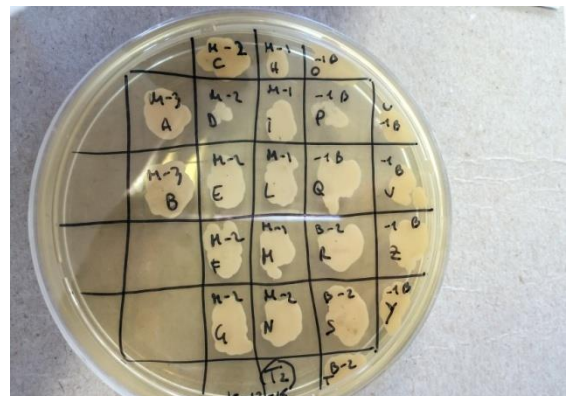


Figura 3. Master degli isolati dal contenitore 2 (T2)

Identificazione e caratterizzazione molecolare

Dopo la prima fase di isolamento, si è passati alla fase di identificazione e analisi molecolare. Sono stati analizzati 15 isolati allo scopo di determinare la specie di appartenenza. Il DNA estratto da ciascuna colonia è stato quindi utilizzato in reazioni di PCR per l'amplificazione della regione ITS 1-4. L'analisi degli amplificati ottenuti ha mostrato per ciascun isolato una singola banda di 880bp che, in accordo con quanto riportato in letteratura, corrisponde alla dimensione attesa per *Saccharomyces cerevisiae* (Zarzoso *et al.*, 1999).

Successivamente, sei isolati di *Saccharomyces cerevisiae*, 2 per ciascun contenitore del secondo campionamento, sono stati caratterizzati molecularmente e tecnologicamente. La caratterizzazione molecolare è stata eseguita studiando il polimorfismo di lunghezza di *SED1* ed *HSP150*, geni che codificano per proteine della parete cellulare di *S.cerevisiae*, caratterizzati da polimorfismo di lunghezza della loro sequenza.

Inizialmente è stato studiato il polimorfismo di lunghezza del gene *SED1*. I risultati ottenuti hanno mostrato un profilo di amplificazione identico in tutti gli isolati analizzati. In particolare, è stato osservato un unico prodotto di amplificazione di 700 bp. Questo risultato potrebbe far supporre che i diversi isolati rappresentino cloni di un unico ceppo. La successiva analisi molecolare sulla regione minisatellite di *HSP150* sostiene l'ipotesi precedente, cioè che i 6 isolati siano relativi ad un unico ceppo dominante le fermentazioni spontanee della Malvasia (Fig. 3).

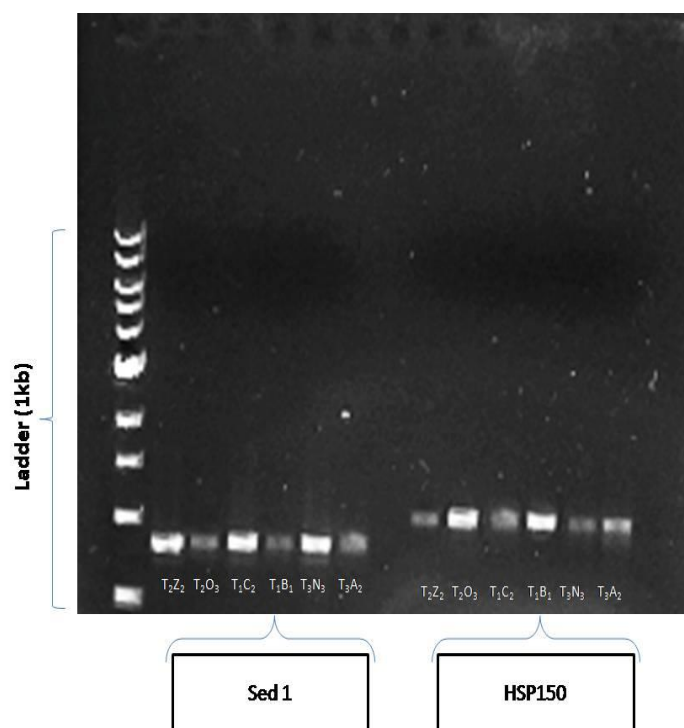


Figura 4. Gel elettroforesi

Caratterizzazione tecnologica

Sono state condotte delle micro fermentazioni su mosto di Malvasia di Bosa, valutando giornalmente il calo ponderale delle beute. Questo parametro, che corrisponde all'anidride carbonica liberata durante il processo fermentativo, permette di determinare la capacità fermentativa dei ceppi (Bely et al.,1990). Nella Figura 5 sono indicati i risultati delle prove di fermentazione riportati al volume standard di 100 ml.

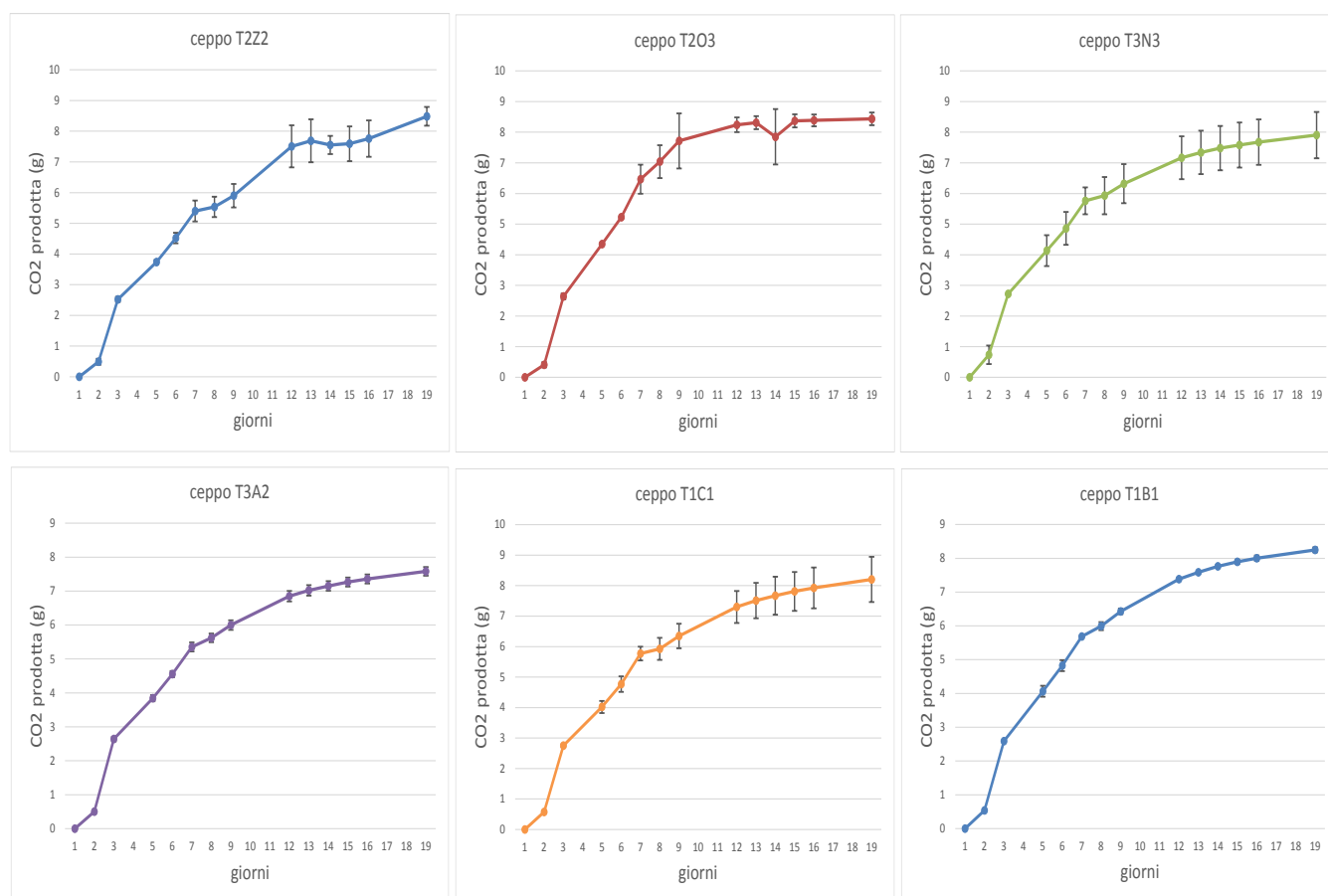


Figura 5. Andamento fermentativo di 6 isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae*.

L'analisi dei risultati indica una sostanziale equivalenza dell'andamento fermentativo. In particolare tutti gli isolati presentano una fase lag iniziale ridotta, ad indicare un ottimo adattamento al substrato di fermentazione, ed un potere fermentativo statisticamente uguale ($p > 0,05$), quantificabile in 13-14° alcolici. Per quanto riguarda il vigore fermentativo, cioè la capacità di dare luogo a pronte ed efficaci fermentazioni, parametro essenziale in uno starter, tutti i ceppi mostrano una produzione media di CO₂ nei primi tre giorni di circa 0,90 g CO₂ per giorno. Questo valore rientra nel 60° percentile dei valori riportati per *S. cerevisiae* (0,40-1,60) ed indica la capacità dei ceppi selezionati di prendere il sopravvento, nei primi giorni di fermentazione, sui lieviti spontanei del mosto.

Test di florizzazione

Infine si è verificata la capacità dei 6 isolati di florizzare sia su terreno colturale sintetico (Fig 6) sia su vino.



Figura 6. Prova di florizzazione su YNB + 4% etanolo.

Nessun isolato da Malvasia ha prodotto un biofilm. Tuttavia l'uso di un terreno sintetico, seppure molto utilizzato per testare la capacità di florizzazione di *S. cerevisiae*, potrebbe portare a dei falsi negativi, in quanto la composizione nutritiva dell'YNB è molto semplificata e meno ricca di quella riscontrabile nel vino. Per questo motivo è stata allestita una prova di florizzazione su due diversi vini (Malvasia di Bosa e Marsala) (Fig. 7 e 8) per verificare effettivamente la formazione di un velo da parte degli isolati in questione. I risultati ottenuti mostrano che solo A9 è in grado di formare un biofilm su Marsala, mentre su Malvasia di Bosa neanche il ceppo di riferimento ha prodotto il biofilm, suggerendo condizioni di substrato difficili per la sopravvivenza di questo ceppo flor, probabilmente un'elevata concentrazione di anidride solforosa.



Figura 7. Confronto tra A9 e T₂bZ su Marsala.



Figura 8. Formazione del velo in A9.

CONCLUSIONI

I 6 isolati selezionati e caratterizzati da diversi contenitori e in diverse zone degli stessi potrebbero essere cloni di un unico ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* aziendale. Questo ceppo potrebbe rappresentare il ceppo “aziendale” predominante, in grado quindi di prendere il sopravvento sui lieviti spontanei e guidare così la fermentazione. Tale ceppo risulterebbe estremamente interessante in quanto sarebbe possibile ascrivergli gran parte della qualità della Malvasia di Bosa ottenuta presso la cantina oggetto dello studio.

Le prospettive future di questo lavoro sono basate sulla possibilità di caratterizzare per altri parametri questo ceppo e di inocularlo in volumi maggiori di mosto per una prova pilota di fermentazione così da ottenere una quantità di vino utilizzabile per prove di analisi sensoriale. Inoltre sarebbe interessante caratterizzare molecolarmente anche alcuni isolati prelevati ad inizio fermentazione, con l’obiettivo futuro di realizzare in cantina una fermentazione sequenziale utilizzando un lievito non-*Saccharomyces* con un ceppo di *S. cerevisiae* allo scopo di migliorare il prodotto finale, enfatizzandone quei particolari caratteri aromatici, tipici delle fermentazioni spontanee.

BIBLIOGRAFIA

- Bely M, Sablayrolles JM, Barre P. 1990. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance Am. J. Enol. Vitic, 41, 319-324.
- Borneman, A. R., Forgan, A. H., Kolouchova, R., Fraser, J. A., & Schmidt, S. A. 2016. Whole Genome Comparison Reveals High Levels of Inbreeding and Strain Redundancy Across the Spectrum of Commercial Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 6(4), 957–971.
- Callejon R. M., Clavijo A., Ortigueira P., Troncoso A. M., Paneque P., Morales M. L. 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chem. Acta* 660 68–75. 10.1016/j.aca.2009.09.040.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.*, 10(2), 123-33.

- Ciani M., Maccarelli F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199–203.
- 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 Microbiology* 21, 149–155.
- Coratza G, Musmanno RA, Cresti S, Vagnoli P, Di Maggio T. 1992. L'evoluzione della popolazione di lieviti durante la fermentazione. Dipartimento di Biologia Molecolare-Sez. di Microbiologia – Università degli studi- Siena.
- Cordero Otero, R.R., Iranzo, J.F.U., Briones-Perez, A.I., Potgieter, N., Villena, M.A., Pretorius, I.S., van Rensburg, P., 2003. Characterization of the betaglucosidase activity produced by oenological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science* 68, 2564–2569.
- LAORE, Dati Agenzia regionale. 2014. Malvasia di Bosa DOC, indagine territoriale.
- Erten, H., 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 373–378.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49: 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* 1, 143–148.
- Farris G. A., Budroni M., Vodret T., Deiana P. 1990. Sull'origine dei lieviti vinari. I lieviti dei terreni, delle foglie e degli acini di alcuni vigneti sardi. *L'Enotecnico*, 26 (6), 99-108.
- Fernandez, M., Ubeda, J.F., Briones, A.I., 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 59, 29–36.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood, Philadelphia,PA, pp. 27–54.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Vincenzini, M., 2002. Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines

- produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Research* 2, 403–407.
- Heard, G., 1999. Novel yeasts in winemaking. Looking to the future. *Food Australia* 51 (8), 347 – 352.
 - Heard, G.M., 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 Bacteriology* 65, 23–28.
 - Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84, 865 – 876.
 - Koulougliotis D, Eriotou E. 2016. Isolation and Identification of Endogenous Yeast Strains in Grapes and Must Solids of Mavrodafni Kefalonias and Antioxidant Activity of the Produced Red Wine. *Ferment Technol.*
 - Le Jeune, C., Enry, C., Demuyter, C., Lollier, M., 2006. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology* 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. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 206 – 216.
 - Mariangeli P, Angelozzi D, Ciani M, Clementi F, Mannazzu I, 2004. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *Enology* 4(4-5):427-35.
 - Marilena Budroni, Severino Zara, Giorgia Pirino, Giovanni Pinna, Giovanni Antonio Farris. 2002. “I lieviti selezionati e il loro utilizzo in cantina” in Progetto VINEST – Comunità montana Marghine Planargia. Pag. 159.
 - Mazzei, P., Francesca, N., Moschetti, G., Piccolo, A., 2010. NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from Aglianico grapes. *Analytica Chimica Acta* 673, 167–172.
 - 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 Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 297–304.

- Nieddu G., 2011. Vitigni della Sardegna: Caratterizzazione genetica ampelografica, agronomica e tecnologica delle principali varietà di vite della Sardegna, Convisar.
- Pallmann CH, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA, Bisson LF. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am. J. Enol. Vitic* , 52, 198-203.
- 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 Microbiology* 20, 217–224.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675 – 729
- Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T., 1990. A study on microbiological and oenological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science* 55,1603–1606.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50, 15–31.
- J. Robinson. 2006 (ed) *"The Oxford Companion to Wine"* Third Edition pgs 778–780 Oxford University Press.
- Romano, P., 2002. Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. In: Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 99–109.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 86, 163–168.
- Rosini, G. 1982. Influenza della microflora saccaromicetica della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva. *Vignevini*, 9: 43-46.
- Wondra, M., Boveric, M., 2001. Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. *Food Technology and Biotechnology* 39, 141 –148.
- Zambonelli C. 1988. *Microbiologia e Biotecnologia dei vini*, Ed. Edagricole, Bologna.