



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Dipartimento DEMETRA

Dottorato di ricerca in Frutticoltura Mediterranea

XXII ciclo

(SSD AGR/16-Microbiologia Agraria)

- TESI DI DOTTORATO DI RICERCA -

**“Ecologia microbica del vitigno *Grillo* e selezione di ceppi ambientali
di *Saccharomyces cerevisiae*”**

Dottorando: NICOLA FRANCESCA

Tutor:

Prof. Giancarlo Moschetti

Coordinatore del Dottorato:

Prof. ssa Maria Antonietta Germanà

CAPITOLO I: **“Introduzione generale, il ruolo dei lieviti e dei batteri lattici nella produzione dei vini”** **1**

1.	La microflora spontanea dell’uva	2
2.	La fermentazione alcolica	3
3.	I lieviti più importanti dal punto di vista enologico	4
3.1.	Il genere <i>Saccharomyces</i>	7
3.1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.1.2.	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	10
3.1.3.	<i>Saccharomyces bayanus</i>	10
3.1.4.	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	11
3.2.	I lieviti apiculati	12
3.3.	I lieviti selezionati	12
4.	Criteri di selezione	14
5.	Funghi fitopatogeni e qualità del vino	17
6.	Metodi per l’identificazione dei lieviti vinari	18
6.1.	Strategie molecolari	20
6.2.	Tipizzazione dei lieviti enologici	23
6.2.1.	Metodi basati sulla restrizione del DNA	23
6.2.2.	Metodi basati sulla PCR	26
6.3.	Identificazione dei lieviti enologici	31
6.3.1.	Metodi basati sulla restrizione del DNA	31
6.3.2.	Metodi basati sulla PCR	32
6.4.	Monitoraggio dei lieviti enologici	34
6.5.	Applicabilità dei metodi molecolari per la caratterizzazione dei lieviti enologici	36
7.	I batteri lattici	37
7.1.	Origine dei batteri lattici nel settore viticolo	37
7.2.	Classificazione dei batteri lattici presenti nei mosti e nei vini	39
7.3.	Ruolo dei batteri lattici in enologia	41
7.4.	Fattori influenzanti l’attività dei batteri lattici nel vino	46
7.5.	Effetto del “lisozima” sullo sviluppo dei batteri lattici nel vino	54
7.6.	Gestione della vinificazione in bianco in Sicilia per ostacolare l’attività dei batteri lattici	56
8.	Bibliografia	58

CAPITOLO II: **“Caratterizzazione molecolare e tecnologica di lieviti vinari isolati dalla coltura *Grillo* nell’areale di produzione del vino Marsala D.O.C.”** **64**

Abstract	65	
Riassunto	67	
1.	Introduzione	69
1.1.	Qualità del vino e lieviti autoctoni	69
1.2.	La cultivar <i>Grillo</i>	71
2.	Materiali e metodi	72
2.1.	Campionamento delle uve e isolamento dei lieviti	72
2.2.	Identificazione molecolare degli isolati	74
2.2.1.	Estrazione del DNA	74
2.2.2.	Amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA	75
2.2.3.	Amplificazione del dominio variabile D1/D2 del gene 26S rRNA	76
2.2.4.	Analisi RAPD-PCR	77
2.2.5.	Analisi delle sequenze interdelta	78
2.2.6.	Sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA	79
2.3.	Selezione tecnologica dei ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
2.3.1.	Test per la produzione di idrogeno solforato (H ₂ S)	80
2.3.2.	Test di resistenza all’etanolo e all’anidride solforosa	81
2.3.3.	Valutazione della capacità fermentativa	82
3.	Risultati	83

3.1.	Conta e isolamento dei lieviti	83
3.2.	Identificazione molecolare dei lieviti presunti non- <i>Saccharomyces</i>	84
3.3.	Identificazione molecolare e strain typing di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
3.4.	Caratterizzazione tecnologica dei ceppi di <i>S. cerevisiae</i>	87
4.	Discussione	88
5.	Tabelle e figure	94
6.	Bibliografia	105

CAPITOLO III: **“La diffusione ambientale di lieviti vinari e di muffe potenzialmente fitopatogene attraverso la migrazione degli uccelli in Sicilia”** 108

Abstract		109
Riassunto		111
1.	Introduzione	114
2.	Materiali e metodi	115
2.1.	Siti di campionamento e analisi degli uccelli	115
2.2.	Isolamento e identificazione dei funghi	117
2.3.	Persistenza sperimentale di un ceppo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> negli uccelli	119
2.4.	Strain typing degli isolati di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
2.5.	Screening tecnologico dei ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
3.	Risultati	120
3.1.	Specie di uccelli catturate	120
3.2.	Isolamento e identificazione dei microrganismi	122
3.3.	Biodiversità e distribuzione delle specie fungine	123
3.4.	Biodiversità dei funghi fra gli uccelli con diverse quantità di grasso sub-cutaneo	124
3.5.	Persistenza sperimentale di un ceppo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> negli uccelli	125
3.6.	Strain typing degli isolati di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125
3.7.	Selezione tecnologica dei ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	126
4.	Discussione	126
5.	Tabelle e figure	138
6.	Bibliografia	146

CAPITOLO IV: **“Ecologia e valutazione dei caratteri tecnologici di batteri lattici isolati durante le vinificazioni dell’uva Grillo nell’areale di produzione del vino Marsala”** 152

Abstract		153
Riassunto		154
1.	Introduzione	155
2.	Materiali e metodi	156
2.1.	Campionamento dei grappoli, mosti e vini	156
2.2.	Analisi chimiche	157
2.3.	Conta e isolamento dei batteri lattici	157
2.4.	Raggruppamento e identificazione dei batteri lattici	158
2.5.	Sensibilità dei batteri lattici al lisozima e alla SO ₂	159
3.	Risultati	159
3.1.	Analisi chimiche	159
3.2.	Conta, isolamento e identificazione dei batteri lattici	160
3.3.	Sviluppo dei batteri lattici in presenza di lisozima e SO ₂	161
4.	Discussione	162
5.	Tabelle	167
6.	Bibliografia	171

CAPITOLO I

**“Introduzione generale: il ruolo dei lieviti e dei batteri lattici
nella produzione dei vini”**

Parte del lavoro riportato in questo capitolo è stato pubblicato sulla
seguinte rivista:

Industrie delle Bevande

*“Metodi molecolari di tipizzazione, identificazione e monitoraggio dei lieviti di
interesse enologico”*

Alessio Allegra, **Nicola Francesca**, Luca Settanni

(2010), 229: 5-14.

1. La microflora spontanea dell'uva

Le uve rappresentano un'importante sorgente di microrganismi, tra cui si trovano anche quelli coinvolti nella fermentazione del mosto d'uva.

Varie ricerche hanno messo in evidenza che sulla superficie dei grappoli la popolazione microbica può raggiungere valori di 10^3 - 10^5 UFC/g. Si tratta di specie diverse di lieviti, alle quali vanno aggiunte numerose specie di batteri lattici ed acetici. Le ricerche in ecologia microbica del vino hanno consentito di riscontrare sui grappoli d'uva e nel mosto la presenza di oltre 200 specie di lieviti. Di queste, *Saccharomyces cerevisiae*, considerato il principale lievito vinario, è risultato poco frequente (< 50 UFC/g) e spesso anche assente dai grappoli o dai singoli acini, mentre i lieviti appartenenti alla specie *Hanseniaspora uvarum* sono spesso i più abbondanti sull'uva (10^4 - 10^5 UFC/g). Questi risultati hanno stimolato numerosi dibattiti, nazionali ed internazionali, circa la reale origine di questo lievito.

La struttura della microflora blastomicetica presente sui grappoli d'uva dipende da numerosi fattori quali la posizione geografica, l'età del vigneto (Parrish e Carroll 1985; Longo *et al.*, 1991; Martini *et al.*, 1980), la tipologia del suolo (Farris *et al.*, 1990), la cultivar, la tecnica di raccolta, la curva di maturazione (Rosini *et al.*, 1982), nonché lo stato sanitario dell'uva (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

Oltre alle specie vinarie di *Saccharomyces sensu stricto* vanno menzionati i lieviti apiculati (generi *Hanseniaspora*, *Saccharomycode*), *Metschnikowia* (in particolare *M. pulcherrima*), *Candida* (in particolare *C. stellata*), *Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Zigosaccharomyces* e *Pichia*.

2. La fermentazione alcolica

La trasformazione del mosto in vino consiste, essenzialmente, nella conversione degli zuccheri (glucosio e fruttosio) in alcol etilico. Questa reazione, che avviene ad opera dei lieviti, comporta anche lo sviluppo di calore, la produzione di anidride carbonica e di molti altri prodotti secondari (che nel loro insieme costituiscono al massimo il 5% del totale), rappresentati principalmente da glicerina, acido succinico, acido lattico, acetoino, il 2,3 butilenglicol e diversi esteri. Inoltre a seconda dell'andamento della fermentazione si può avere la produzione di altre sostanze secondarie, quali acetaldeide, acido acetico, acido piruvico e alcoli superiori, questi ultimi prodotti dall'azione dei lieviti sugli amminoacidi e responsabili di aromi indesiderati nel vino (Usseggio-Tomasset L. 2000).

La prima fase della fermentazione viene detta "tumultuosa", in quanto il mosto "ribolle" a causa dello sviluppo di anidride carbonica e, realizzata la svinatura per separare il vino fiore dalle fecce, inizia la seconda fase, definita "lenta", effettuata travasando il vino in un recipiente di affinamento/conservazione nel quale, con il passare del tempo, si verifica la diminuzione dell'acidità fissa per precipitazione soprattutto di sali dell'acido tartarico (Sicheri, 1986). L'equazione generale della fermentazione alcolica è quella indicata all'inizio del XIX secolo da Gay-Lussac:



La prima parte di questo processo, comprendente l'insieme delle reazioni che portano dagli zuccheri a 6 atomi di carbonio (glucosio e fruttosio) sino ad acido piruvico, viene definita glicolisi, ed è comune sia alla via aerobica (respirazione) che alla via anaerobica (fermentazione). La fase finale, che comprende la trasformazione

dell'acido piruvico in etanolo, è invece unicamente anaerobica e tipica dei lieviti. Il chetoacido piruvico subisce una decarbossilazione con formazione di aldeide acetica la quale è ridotta ad alcol etilico (Usseggio-Tomasset, 2000).

La fermentazione è influenzata da diversi fattori: 1) la temperatura non deve superare i 37 °C per non bloccare l'azione dei lieviti; 2) la concentrazione troppo elevata del mosto può rendere difficile l'inizio della fermentazione; 3) la quantità di alcol etilico prodotto può ridurre o bloccare l'attività dei lieviti; 4) l'acidità eccessiva del mosto può limitare l'attività dei lieviti, ma se è troppo bassa può permettere l'azione negativa dei batteri lattici; 5) lo sviluppo e l'attività dei lieviti dipendono dalla presenza di fattori di crescita dati da carbonio sotto forma soprattutto di zuccheri, mentre la richiesta di azoto viene soddisfatta soprattutto dai sali di ammonio; 5) risultano indispensabili alcune vitamine quali la B1, la B2, la B6 e l'acido pantotenico; 6) l'aerazione iniziale del mosto può essere utile perché i lieviti necessitano di una certa quantità di ossigeno per svilupparsi; 7) la presenza di sostanze anticrittogamiche e di anidride solforosa in eccesso può inibire la fermentazione (Ribereau *et al.*, 1998).

3. I lieviti più importanti dal punto di vista enologico

I lieviti sono funghi unicellulari, appartenenti alle classi Ascomiceti e Deuteromiceti, che si moltiplicano per gemmazione o per scissione (Sicheri, 1986).

Essi, pur essendo un gruppo omogeneo di organismi, sono distribuiti fra le varie suddivisioni in cui sono classificati i funghi e sono piuttosto numerosi:

- Classe: *Ascomycetes*
 Sottoclasse: *Protoascomycetes*
 Ordine: *Endomycetales*
 Famiglia: *Saccharomycetaceae* (possono formare spore)
 Generi: *Saccharomyces*, specie: *cerevisiae* (o *ellipsoideus*),
paradoxus, *pastorianus*, *bayanus* (o *oviformis*).
Schyzosaccharomyces (specie: *pombe*).
Hansenula
Pichia
Hanseniaspora
Saccharomycodes
- Classe: *Deuteromycetes*
 Famiglia: *Criptococcaceae*
 Generi: *Candida*, specie: vini (o *mycoderma*)
Kloeckera, specie: *apiculata*
Torulopsis, specie: *stellata*

La classificazione fatte in passato hanno incluso un numero elevato di specie (fino a 700 diverse specie) (Zambonelli *et al.*, 2000). Tuttavia, quelli che di fatto intervengono in maniera principale o marginale nella fermentazione cosiddetta spontanea sono relativamente pochi, cosicché il quadro microbiologico che ne consegue è piuttosto semplice.

Blastomiceti appartenenti al genere *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulasporea* e *Hansenula* generalmente crescono durante la prima fase della fermentazione, mentre la presenza di *S. cerevisiae* cresce proporzionalmente alla concentrazione di etanolo prodotto (Fleet *et al.*, 1984; Heard e Fleet, 1985; Querol *et al.*, 1994).

I lieviti possono essere suddivisi in sette tipi a seconda della forma, ma, per quanto attiene l'enologia, risultano interessanti solo tre categorie:

a) ellittici, aventi forma di ellisse; per esempio *S. cerevisiae*;

b) apiculati, aventi forma di limone; per esempio *Kloeckera apiculata*;

c) cocchi, aventi forma tondeggiante; per esempio *Torulopsis stellata* (Sicheri, 1986).

Il mosto d'uva è un mezzo nutritivo che contiene in forma utilizzabile tutti gli elementi necessari allo sviluppo di molte specie di lieviti che quindi in esso hanno la possibilità di moltiplicarsi. Esso contiene:

- carbonio, che è utilizzato preferibilmente sotto forma di zuccheri (specialmente esosi): la maggior parte dei lieviti è glucosofila, cioè utilizza di preferenza il glucosio rispetto al fruttosio; sono utilizzabili anche gli alcoli (in particolare mannite, glicerolo e, a volte, l'alcol etilico); specialmente i lieviti apiculati utilizzano, in determinate circostanze, anche gli acidi organici (per lo più malico e citrico);
- azoto, la cui forma più facilmente assimilabile è quella ammoniacale, seguita dalla forma amminoacidica e proteica (alcune specie possono utilizzare anche i nitrati);
- sali minerali, fra i quali sono particolarmente importanti quelli di fosforo, potassio, zolfo e calcio;
- vitamine o fattori di crescita, non necessarie per alcune specie (quali *S. bayanus*, *S. cerevisiae*) che sono auxoautotrofe, possono cioè moltiplicarsi in assenza di qualsiasi vitamina essendo in grado di sintetizzarle; ma le specie di lieviti auxoeterotrofe richiedono uno o più fattori di crescita quali le vitamine B₁, B₂, B₆, PP, biotina, acido pantotenico, acido p-ammino benzoico, mesoinositolo;

- ossigeno, che è indispensabile per la riproduzione;
- elevata concentrazione di acidi organici (ambiente acido), i lieviti fermentano meglio a pH 4 che a pH 3; tuttavia è meglio che il mosto abbia un pH basso per ostacolare lo sviluppo dei batteri (Sicheri, 1986).

L'attività metabolica dei lieviti, oltre che dalla composizione del mosto, è influenzata dalla temperatura che ne condiziona sia la velocità di fermentazione sia la capacità fermentativa. La temperatura che permette la massima velocità di fermentazione è di 30°C circa, ma al di sopra di questa temperatura, la fermentazione rallenta fino ad essere inibita (35°C circa). Alle basse temperature (comunque superiori ai 10-14°C) la fermentazione esaurisce più facilmente tutto lo zucchero e permette di ottenere vini più fini. La temperatura ottimale di vinificazione per i vini rossi è di 22-30°C, mentre per quelli bianchi è di 17-20°C (Sicheri, 1986).

La respirazione e la moltiplicazione dei lieviti è, inoltre, condizionata dalla presenza di ossigeno. In carenza di questo gas si arresta la crescita e la respirazione è sostituita dalla fermentazione; tuttavia all'inizio del processo fermentativo un'aerazione del mosto provoca un'attivazione della fermentazione stessa.

3.1. Il genere *Saccharomyces*

Il genere *Saccharomyces* per un certo tempo è stato il solo nel quale erano compresi tutti i fermenti alcolici; poi, sulla base di numerose caratteristiche, ne sono stati proposti altri, cosicché la classificazione è via via diventata sempre più articolata e complessa.

Il genere *Saccharomyces* comprende i lieviti più vigorosi e alcoltolleranti, quelli che più di tutti gli altri possono essere considerati i lieviti vinari. Ma il titolo di “fermento alcolico” per definizione spetta, senza alcun dubbio, alla specie *S. cerevisiae*, il tipico lievito del pane, della birra e del vino, prodotto industrialmente in grandi quantità che trova impiego nei più differenti settori.

Il genere *Saccharomyces* è molto compatto e ben caratterizzato e, per questo motivo, si potrebbe pensare che i suoi confini siano netti e che la sua suddivisione in specie sia relativamente semplice, ma non è così (Zambonelli *et al.*, 2000).

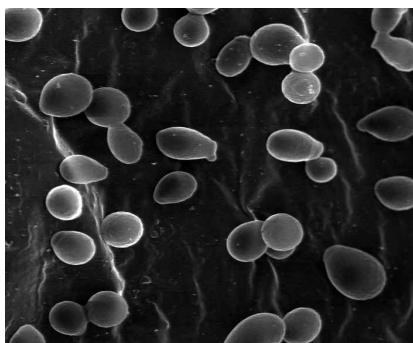
Nel corso degli ultimi 100 anni tale genere è stato oggetto di continue revisioni sotto l'aspetto tassonomico: i suoi confini sono stati spostati con l'annessione di altri generi per poi ritornare sulle posizioni originarie ed il numero di specie si è alternativamente ampliato fino a diverse decine, per poi ridursi fino al minimo di otto. Di conseguenza, ci sono dei nomi di specie che sono stati riconosciuti, poi depennati, poi ricomparsi talvolta anche come varietà di altre specie, oppure con un significato differente da quello che avevano precedentemente, tutto questo è indubbiamente fonte di qualche confusione.

Attualmente, il genere *Saccharomyces* è, sia pure non formalmente, suddiviso in due gruppi, quello dei *Saccharomyces sensu stricto* e quello dei *Saccharomyces sensu lato* (Zambonelli *et al.*, 2000).

I *Saccharomyces* in senso lato sono rappresentati da alcune specie che, ovviamente, hanno tutte le caratteristiche proprie del genere ma che hanno habitat particolari o alcune prerogative particolari e, in generale, scarso vigore fermentativo: non sono, insomma, degli efficienti “fermenti alcolici” (Zambonelli *et al.*, 2000).

Il gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* è formato da 4 specie che si differenziano a due a due per il comportamento verso la temperatura. Le quattro specie sono: *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* dotate di capacità di sviluppo oltre i 37°C e che hanno temperatura ottimale superiore a 30°C; *S. bayanus* e *S. pastorianus* che non si sviluppano oltre i 37°C e che hanno temperatura ottimale inferiore a 30°C (Ummarino *et al.*, 1997).

3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*



È il lievito per definizione, il più vigoroso, il più alcol-tollerante, il più resistente all'anidride solforosa. *S. cerevisiae* è il lievito che produce la maggiore quantità di etanolo, a parità di zucchero fermentato, e la minore quantità complessiva di prodotti secondari e, per questo motivo, è in grado di origine alle fermentazioni alcoliche più pulite. *S. cerevisiae* è il lievito più importante dal punto di vista enologico; esso presenta una forte variabilità per un grande numero di caratteri e questo fatto lo rende molto interessante sia dal punto di vista biochimico che genetico. È il più tipico rappresentante dei lieviti sporigeni ed è singolare il fatto che il suo ceppo tipo, il CBS 1171, sporifichi pochissimo (Zambonelli *et al.*, 2000).

S. cerevisiae è un lievito ootallico, le cui cellule, da sferoidali ad ellittiche sono diploidi e, a seguito di meiosi del nucleo, sono capaci di sporificare, cioè di trasformarsi direttamente in aschi contenenti da 1 a 4 spore.

Nonostante le sue caratteristiche di vigore e di competitività, *S. cerevisiae* è il lievito dotato non di grande diffusione ambientale, e nei mosti d'uva, è generalmente minoritario rispetto ad altre specie (Zambonelli *et al.*, 2000).

3.1.2. *Saccharomyces paradoxus*

E' una specie fenotipicamente molto simile a *S. cerevisiae*, da alcuni considerata la più diffusa in natura. Non se ne conosce l'interesse sotto l'aspetto enologico perché i ceppi disponibili sono pochi e insufficienti per l'esecuzione di uno studio biometrico attendibile (Zambonelli *et al.*, 2000).

3.1.3. *Saccharomyces bayanus*

E' una delle specie tradizionalmente considerate più valide sotto l'aspetto enologico ma la cui definizione è così complessa e contraddittoria da mettere in dubbio la sua esistenza. Fino alla più recente classificazione del 1998, *S. bayanus* (sia come specie che come razza fisiologica) differiva da *S. cerevisiae* unicamente per la sua incapacità di fermentare il galattosio (Zambonelli *et al.*, 2000). Ma la fermentazione degli zuccheri non è un carattere di specie, bensì di ceppo e, per questo motivo, ha perso importanza sotto l'aspetto tassonomico. Resta il fatto che è molto diffusa fra i tecnici del settore enologico la convinzione che fra i ceppi di questo lievito ci siano quelli più vigorosi, più alcol-tolleranti e flocculenti, quelli che di norma portano a termine la fermentazione dei mosti ed i più adatti alla spumantizzazione.

In realtà, il vecchio *S. bayanus* era una miscellanea di ceppi aventi in comune soltanto la capacità di fermentare il galattosio ma molto diversi da numerosi altri

punti di vista. La classificazione attuale ha preso come punto di riferimento il vecchio ceppo tipo CBS 380 che non possiede le caratteristiche di vigore attribuite alla specie ma che si distingue per i suoi punti cardinali di temperatura (T ottimale inferiore a 30°C e non sviluppo sopra i 37°C). Il ceppo CBS 380, inoltre, si distingue per la sua unicità perché trova pochi altri esemplari dotati delle sue stesse caratteristiche, particolarmente di quelle fermentative; inoltre, come il ceppo tipo di *S. cerevisiae*, non sporifica e secondo diversi autori può essere considerato un ibrido interspecifico naturale. Per questi e per altri motivi è stata formulata la proposta di dividere la specie in due gruppi: il primo denominato *gruppo bayanus* comprendente il ceppo tipo ed altri di incerta caratterizzazione; il secondo, molto omogeneo e denominato *gruppo o tipo uvarum*, comprendente ceppi molto comuni nei mosti e con particolari caratteristiche fermentative. I ceppi di *tipo uvarum* sono morfologicamente molto simili a *S. cerevisiae* (Zambonelli *et al.*, 2000).

3.1.4. *Saccharomyces pastorianus*

Sostituisce il vecchio nome di *S. carlsbergensis* attribuito ai ceppi di lieviti della birra utilizzati nelle fermentazioni “lager” fino ad allora incluso nella specie *S. cerevisiae*. Della specie si conosce un numero piuttosto limitato di ceppi, tutti sterili perché incapaci di sporificare o dotati di spore non germinabili. Per questo e per altri motivi, diversi autori dubitano della validità della specie ed ipotizzano che i ceppi che la formano siano in realtà ibridi interspecifici naturali (Zambonelli *et al.*, 2000). A questo lievito è attribuita scarsa importanza enologica.

3.2. I lieviti apiculati

Gli apiculati sono così chiamati perché la loro moltiplicazione avviene sempre per formazione di gemme alle estremità delle cellule.

Gli anelli cicatriziali, che rimangono dopo il distacco delle gemme, provocano l'appuntimento ed il progressivo allungamento degli apici delle cellule le quali assumono la caratteristica forma "apiculata". I più importanti dal punto di vista enologico sono i generi *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes* e *Wicherhamiella*, i lieviti apiculati asporigeni comprendono il genere *Kloeckera* (Zambonelli *et al.*, 2000).

Il lievito apiculato più noto è *Kloeckera apiculata* (oggi *Hanseniaspora uvarum*) che, essendo sempre presente in tutti i mosti ed in gran numero, è il primo a cominciare la fermentazione dei mosti. Esso è tuttavia considerato del tutto negativo perché è poco alcoligeno, si arresta quando la concentrazione di etanolo arriva a 4-5 gradi di alcol e forma quantità alte di acido acetico, tali da compromettere la qualità del vino. E' molto sensibile all'anidride solforosa e può essere facilmente eliminato con l'uso di questo antisettico.

3.3. I lieviti selezionati

Per selezione si intende il reperimento o la costruzione di soggetti idonei allo svolgimento di una determinata funzione. In particolare, nel settore enologico, vengono definiti "selezionati" quei lieviti che danno origine a fermentazione dei mosti o dei vini con risultati prevedibili e programmabili. Le specie che vengono

prese in considerazione al fine della selezione sono quelle del gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto*, principalmente *S. cerevisiae* (Zambonelli *et al.*, 2000). L'attenzione di alcuni ricercatori si è rivolta anche a *Torulaspota delbrueckii*, ad alcune specie del genere *Schizosaccharomyces*. In particolare per la prima specie, i risultati ottenuti sono stati incoraggianti e tali da consigliare la prosecuzione degli studi.

La fermentazione naturale dei mosti, sia in presenza che in assenza di anidride solforosa può dare origine ad inconvenienti che riguardano sia il suo andamento che la qualità del fermentato. Questo accade perché, a causa della sua scarsa diffusione ambientale, *S. cerevisiae* è presente nei mosti in numero così limitato da essere sopraffatto da altri lieviti o da non essere in grado di provocare una rapida fermentazione (Zambonelli *et al.*, 2000).

Il modo per mettere rimedio a questo stato di cose è molto semplice e si basa su questo principio: se le cellule di *S. cerevisiae* sono poche rispetto a quelle di altre specie, è sufficiente aggiungerle in numero tale da ribaltare il rapporto iniziale di presenza.

La semplice aggiunta di una qualsiasi coltura di *S. cerevisiae* è di per sé già sufficiente a migliorare i risultati fermentativi; in passato, anche il lievito per panificazione è stato consigliato come rimedio efficace in mancanza di altre colture. Tuttavia, è evidente che l'impiego di una coltura appositamente selezionata è indubbiamente preferibile.

4. Criteri di selezione

E' noto da molto tempo che le colture selezionate devono essere in possesso di caratteristiche di vigore fermentativo, alcol-tolleranza e resistenza all'anidride solforosa tali da originare fermentazioni rapide e complete. Ma il problema che per lungo tempo è rimasto irrisolto è legato alla qualità conferita al vino dal lievito agente della fermentazione. Tutto questo per la difficoltà di definire esattamente il concetto di qualità ed esprimerlo in termini oggettivi e, di conseguenza, per la difficoltà di precisare che cosa dovessero fare i lieviti per migliorare la qualità dei vini.

Uno dei criteri di selezione molto seguiti in passato (ed anche oggi) consiste nel prendere in considerazione i vini più pregiati, di alta qualità riconosciuta, di isolare i lieviti agenti della loro fermentazione ipotizzandone un diretto intervento al conferimento dell'alta qualità (Zambonelli *et al.*, 2000). Si tratta di un criterio ben poco razionale perché le selezioni non possono basarsi sull'origine più o meno nobile dei soggetti ma sui dati obiettivi: tutte le selezioni devono essere eseguite in funzione di caratteri ben definiti, noti e misurabili.

Tutte le selezioni sono eseguite in funzione di caratteri (o di prestazioni produttive) 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 individuati e la cui frequenza o entità sono state determinate per mezzo di studi biometrici (Zambonelli *et al.*, 2000). I caratteri enologici possono essere suddivisi in "tecnologici" e "di qualità".

Caratteri tecnologici. Sono quelli che influiscono sull'andamento della fermentazione e la cui conoscenza permette di programmarla. Noti da molto tempo, hanno costituito la base delle prime selezioni. I diversi caratteri tecnologici vengono suddivisi in:

- Caratteri di competitività (potere fermentativo o alcol-tolleranza, vigore fermentativo, resistenza all'anidride solforosa).
- Tipo di sviluppo (a cellule disperse o polverulento, flocculento, a catene di cellule o aggregati, capacità schiumogena, potere filmogeno o carattere flor).
- Sviluppo a basse temperature e ad alte temperature.
- Carattere killer.

Dei diversi caratteri quelli che più interessano sono il potere fermentativo, il vigore fermentativo e la resistenza all'anidride solforosa.

Il potere fermentativo è in diretto rapporto con l'alcol-tolleranza ed esprime la quantità massima di etanolo che un lievito può formare per fermentazione di un mezzo (quale il mosto) contenente zucchero in eccesso (Zambonelli *et al.*, 2000).

Il carattere può essere determinato impiegando 100 ml di mosto d'uva, arricchito di glucosio fino al 30% (o più), in beuta chiusa con una trappola ad acido solforico che trattiene l'umidità. Durante la fermentazione si forma anidride carbonica che, svolgendosi, provoca un calo in peso di tutto il sistema. L'andamento della fermentazione può essere seguito con pesate quotidiane fino al momento in cui il peso rimane costante. Il calo in peso complessivo dà già un'idea esatta dell'intensità del carattere che poi trova conferma della determinazione dell'etanolo prodotto. L'inibizione dello sviluppo e l'arresto della fermentazione sono una conseguenza dell'accumulo di etanolo all'interno delle cellule.

S. cerevisiae è il lievito dotato di maggiore alcol-tolleranza in assoluto. Il carattere, espresso in termini di volumi di etanolo in 100 ml, varia da un minimo di 8 fino ad un massimo di 18.

Il vigore fermentativo esprime la prontezza con cui un ceppo dà inizio alla fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine (Zambonelli *et al.*, 2000). Ciascun ceppo di *S. cerevisiae* si moltiplica con un proprio tempo di generazione, cosicché lo sviluppo di ceppi differenti, a parità di condizioni, non avviene mai in modo sincrono. Il vigore fermentativo è carattere la cui espressione non può essere messa in rapporto con una particolare reazione enzimatica o con un particolare aspetto del metabolismo cellulare, ma può essere determinato solo per comparazione fra ceppi (Zambonelli *et al.*, 2000).

L'anidride solforosa è un antisettico la cui azione sulle cellule microbiche è molto complessa. *S. cerevisiae* è lievito che mostra una grande varietà di comportamento verso l'anidride solforosa. In presenza di 100 mg per litro e con un valore di pH = 3, circa il 30% dei ceppi sono in grado di dare origine ad una fermentazione il cui andamento non risente (o risente poco) della presenza del composto, mentre circa altrettanti sono inibiti (Zambonelli *et al.*, 2000). Il carattere è di grande importanza tecnologica e non è in rapporto né con il potere fermentativo né con il vigore fermentativo.

Caratteri di qualità. I lieviti possono influire sulla composizione dei vini con due differenti modalità:

- per la capacità o l'incapacità di produrre, durante lo sviluppo e la fermentazione, quantità più o meno elevate, determinati composti che agiscono sulla qualità dei vini;
- per la capacità di agire su alcune sostanze dei mosti provocando quindi cambiamenti nella composizione chimica.

I caratteri di qualità che possiamo riscontrare sono:

- produzione di glicerolo, acido succinico, acido acetico, aldeide acetica, acetoino, alcoli superiori, composti dello zolfo (acido solfidrico e anidride solforosa);
- azione su acido malico (demolizione e sintesi);
- attività enzimatiche (attività β -glucosidica, esterasica, proteolitica);
- produzione di polisaccaridi, ammine biogene, urea.

5. Funghi fitopatogeni e qualità del vino

Lo stato fitosanitario delle uve, influenza le caratteristiche qualitative del vino. In letteratura vengono citate numerose specie fungine fitopatogene della vite. Alcuni agenti di deperimento, come il Mal dell'Esca (causato da *Phaeomoniella clamidospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*), i cancri di *Botryosphaeraceae*, *Eutypa lata*, i marciumi radicali di *Armillaria mellea* possono, indirettamente, influire negativamente sulla produzione vinaria, in quanto la pianta nel corso dell'invasione di questi patogeni, diventa più sensibile all'attacco di altri fitopatogeni (Mugnai *et al*, 1999; Burruano *et al.*, 2008; Larigno *et al*, 1997; Gubler

et al., 2004). Tra i principali funghi, che vengono citati come patogeni obbligati, un ruolo chiave è assunto dalla *Plasmopara viticola*, agente della peronospora della vite, in grado di colpire foglie, tralci e grappoli, e causare dei rilevanti danni economici. Una certa importanza rivestono anche le muffe che colpiscono il grappolo, le quali intervengono direttamente nella diminuzione della qualità del prodotto. Tra questi funghi, in ordine di importanza vengono citati in letteratura, *Erysiphe necator* (oidio della vite), *Botrytis cinerea* (muffa grigia) e funghi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*, che sono definite “muffe opportuniste” le quali a seconda dello stato fitosanitario della pianta e delle condizioni climatiche provocano i così detti “marciumi secondari” dei grappoli. L’incidenza di questa sindrome, solitamente non è elevata, ma il contenimento di tale specie è molto importante, in quanto numerose di esse sono potenziali produttori di micotossine, in particolare producono una sostanza nota come ocratossina A (OTA) che ad elevate concentrazioni nel vino, può provocare tumori al fegato (Spadaro *et al.*, 2010).

6. Metodi per l’identificazione dei lieviti vinari

Il processo di rilevamento, differenziazione ed identificazione dei microrganismi può essere effettuato mediante diversi metodi, essenzialmente basati su osservazioni fenotipiche e/o genotipiche. In generale, le tecniche fenotipiche studiano i caratteri morfologici, fisiologici e biochimici che possono essere facilmente soggetti a misurazioni. Tali tecniche sono conosciute come metodologie “tradizionali”, le quali costituiscono una parte fondamentale del riconoscimento microbico, ma che da sole risultano essere poco attendibili o addirittura inaffidabili (Settanni *et al.*, 2005) Per

superare i limiti dei metodi fenotipici, negli ultimi anni, l'identificazione microbica è per lo più basata sui metodi genotipici che sfruttano le informazioni ricavabili dagli acidi nucleici. Questi ultimi metodi, noti come “metodi molecolari”, sono applicati in maniera routinaria per distinguere tra vari isolati microbici e per l'identificazione dei diversi ceppi a livello di specie.

Da un punto di vista ecologico, l'insieme delle informazioni relative alle caratteristiche fenotipiche di un microrganismo riveste un ruolo tutt'altro che trascurabile, in quanto ogni conclusione tratta dall'esame del genotipo deve mostrare una certa concordanza con le osservazioni fenotipiche, soprattutto quando il riconoscimento microbico è preliminare alla selezione di ceppi con determinate attitudini metaboliche. Quindi, la combinazione dei dati genotipici con quelli fenotipici, fornisce un'identificazione completa, oltre che affidabile ed univoca. Quest'ultima strategia combinata rappresenta l'approccio “polifasico” per l'identificazione microbica (Rosselló-Mora e Amann, 2001).

Le tecniche molecolari, benché non necessariamente dipendenti dalla “reazione a catena della polimerasi” (PCR), spesso utilizzano l'amplificazione di specifici frammenti di DNA per distinguere e riconoscere i microrganismi. L'applicazione della maggior parte di questi metodi richiede la coltivazione dei microrganismi in coltura pura e non può prescindere dall'isolamento degli stessi dalle matrici complesse di partenza. Questo limite può essere facilmente superato impiegando i metodi molecolari “coltura-indipendenti”, i quali studiano il DNA o l'RNA totale estratto dall'ecosistema in oggetto. Tale approccio costituisce la “microbial ecology imaging” ossia una fotografia istantanea della popolazione microbica in un dato

momento e permette di superare i problemi della coltivabilità dei microrganismi. Tra le matrici complesse oggetto di studi microbiologici, quelle alimentari, in particolare quelle enologiche, rivestono un ruolo importante, sia per le implicazioni economiche che per quelle igienico-sanitarie.

La conoscenza degli agenti di fermentazione alcolica è fondamentale per la pianificazione della produzione di vini di alta qualità ed il processo di identificazione è preliminare a qualunque indagine sulle attitudini tecnologiche dei lieviti di interesse vinario. È quindi essenziale conoscere i metodi molecolari “coltura-dipendenti” utilizzati per la differenziazione ed identificazione dei lieviti enologici, così come i metodi molecolari “coltura-indipendenti” per il rilevamento degli stessi durante l’intero processo di vinificazione.

6.1. Strategie molecolari

In seguito all’avvento dei metodi genotipici, le conoscenze sulla diversità microbica degli ecosistemi enologici è notevolmente migliorata. Come precedentemente accennato, i metodi molecolari per lo studio delle comunità microbiche sono disponibili per approcci “coltura-dipendenti” e “coltura-indipendenti”. Entrambe le strategie risultano essere importanti nello studio dell’ecologia microbica del vino, le prime perché permettono di indagare e approfondire le conoscenze sulla complessità tassonomica delle popolazioni e le seconde perché chiariscono in tempi abbastanza limitati i problemi relativi alla composizione in termini di specie, siano esse coltivabili o meno.

In generale, la ricerca della presenza, la quantificazione del numero ed il riconoscimento del tipo dei microrganismi nel mosto o nel vino è di particolare importanza e si distinguono tre maggiori applicazioni di tali indagini: l'identificazione dei microrganismi starter; la determinazione del numero totale dei microrganismi; il rilevamento di particolari ceppi e/o biotipi. Inoltre, la qualità e la garanzia sensoriale risultano essere rilevanti nelle produzioni vinarie. I consumatori sono sempre più critici nei confronti di questo prodotto e per questo motivo, anche il rilevamento dei microrganismi indesiderati in quanto alterativi o patogeni è determinato ai fini dell'ottenimento di un prodotto di qualità.

Le tecniche coltura-dipendenti prevedono l'isolamento dei lieviti; per questo motivo si effettua generalmente, una conta in piastra preliminare ("conta vitale"). Questa tecnica, oltre ad essere caratterizzata da un forte limite dovuto alla coltivabilità dei lieviti comporta, inevitabilmente, una stima in difetto delle popolazioni sottodominanti, quelle cioè presenti e che hanno un ruolo metabolico definito, ma che si attestano a livelli di concentrazione inferiori a quelli degli organismi dominanti. Questo è un limite insito nel metodo della conta in piastra in quanto i microrganismi non sono rilevabili, a meno che non sia disponibile un terreno specifico per il gruppo sottodominante.

Il vantaggio della metodologia coltura-dipendente è quello di poter allestire una ceppoteca specifica per ciascun tipo di matrice vinaria. I metodi colturali permettono l'identificazione microbica a livello di specie e la tipizzazione a livello di ceppo. Quest'ultimo aspetto è molto importante poiché, a livello intraspecifico, le differenze

nelle caratteristiche fenotipiche si riflettono nel genotipo, rendendo così possibile il riconoscimento ed il rilevamento dei soli ceppi interessanti.

I metodi genotipici possono essere complementari o alternativi ai metodi tradizionali di differenziazione ed identificazione; essi, infatti, riducono notevolmente la soggettività nell'interpretazione dei dati morfologici e biologici. Nella stragrande maggioranza dei casi, i metodi genotipici sono basati sulla molecola del DNA genomico, la quale non varia durante il ciclo vitale di un dato microrganismo, a patto che non venga sottoposto a stress ambientali nel lungo termine, e per questo motivo i metodi molecolari sono generalmente applicabili (Settanni e Corsetti, 2007).

Le metodologie coltura-dipendenti genotipiche, siano esse volte alla tipizzazione o all'identificazione, si distinguono in tecniche di prima e seconda generazione (Rosselló-Mora e Amann, 2001). La differenza è relativa all'uso della reazione a catena della polimerasi (PCR): nei metodi di prima generazione il DNA viene analizzato dopo il taglio con enzimi di restrizione, mentre nel secondo caso, qualunque analisi del DNA prevede l'amplificazione mediante PCR. In entrambi i casi, comunque, si fa uso di un gel di agarosio per evidenziare i polimorfismi tipici per ciascun ceppo mediante elettroforesi.

L'applicazione delle varie tipologie di tecniche coltura-dipendente genotipiche ha permesso di acquisire nuovi elementi filogenetici sui gruppi tassonomici (Ratòn, 2004) e approfondire così le conoscenze sulle interazioni e le comunità dei lieviti, dai grappoli d'uva fino al vino.

6.2. Tipizzazione dei lieviti enologici

6.2.1. Metodi basati sulla restrizione del DNA

È importante ricordare che, soprattutto negli anni passati, le tecniche di molecular typing venivano usate anche per l'identificazione a livello di specie mediante comparazione con ceppi tipo o ceppi identificati in precedenza, in quanto alcune bande possono essere ritenute tipiche di una data specie; oggi, tale tendenza è cambiata e questi metodi sono usati a tale scopo solo in approcci polifasici basati su più metodi.

L'analisi "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) prevede l'impiego di endonucleasi che tagliano l'intero genoma e generano dei profili specifici per ciascun ceppo. L'esame di tali profili permette la differenziazione degli isolati. Spesso però, l'elevato numero di prodotti di restrizione del DNA genomico può rendere difficile la distinzione dei ceppi, mentre risultati migliori si possono ottenere analizzando soltanto il DNA mitocondriale (Querol *et al.*, 1992).

L'analisi mtDNA-RFLP è una delle tecniche molecolari a più ampia diffusione per la valutazione delle differenze tra i lieviti di interesse enologico. Già nel 1992, Querol e collaboratori hanno messo a punto un metodo di analisi dei profili di restrizione del DNA mitocondriale che ha reso più semplice la caratterizzazione dei ceppi di *S. cerevisiae*. A questo proposito, si impiegano enzimi di restrizione che riconoscono 4 o 5 basi nucleotidiche contenenti GC. Essi generano un numero discreto di frammenti sul gel di elettroforesi, in quanto il DNA mitocondriale dei lieviti ha un minore contenuto in CG rispetto al DNA nucleare. Tale tecnica risulta essere caratterizzata da elevata rapidità di esecuzione e per questo motivo, è stata applicata

alla risoluzione di diverse problematiche nel settore vinario, soprattutto nella differenziazione di ceppi di *S. cerevisiae* provenienti da diverse zone geografiche (Lopes *et al.*, 2002; Schuller *et al.*, 2005; Barrajon *et al.*, 2009). Schuller e collaboratori (2005) hanno impiegato l'enzima *Hinfl* come marcatore genetico per distinguere 1650 isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, isolati in tre vigneti siti nel nord est del Portogallo. L'applicazione della metodologia in esame ha permesso la rilevazione di 297 diversi profili di restrizione, corrispondenti ad altrettanti ceppi. Il lavoro è risultato interessante perché ha permesso di valutare l'ampia distribuzione temporale e geografica di 17 ceppi di *S. cerevisiae*; in particolare, il ceppo ACP10 si caratterizzava per la stabilità in tutto il territorio oggetto di studio. Inoltre, l'analisi mtDNA-RFLP ha reso possibile la dimostrazione che alcuni ceppi commerciali possono essere soppiantati da lieviti indigeni durante il processo di fermentazione (Barrajon *et al.*, 2009), che è possibile monitorare un ceppo starter durante l'intero processo di fermentazione (Cocolin *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2007) e che si possono facilmente riconoscere i ceppi di lievito responsabili della fioretta (Castrejon *et al.*, 2002).

Interessanti applicazioni della tecnica mtDNA-RFLP hanno riguardato la differenziazione dei ceppi ad uso industriale ottenuti attraverso opportuni incroci (Marullo *et al.*, 2007). Riguardo quest'ultimo aspetto, infatti, Solieri e collaboratori (2008), al fine di ottenere ibridi con le caratteristiche fermentative migliori, hanno incrociato ceppi di *S. cerevisiae* con *S. uvarum*. Gli ibridi ottenuti, tipizzati mediante questa metodologia, hanno mostrato una eredità uniparentale poichè caratterizzati dello stesso mtDNA.

Un'altra tecnica molto utile per la tipizzazione microbica è rappresentata dalla "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE). A differenza della RFLP, questa tecnica impiega enzimi di restrizione che riconoscono siti di taglio più rari nel DNA permettendo, così, la generazione di un numero più contenuto di frammenti. Gli impulsi elettrici a corrente alternata invertono la direzione di orientamento dei diversi frammenti. Essenzialmente, i campi elettrici sono applicati al gel alternativamente da differenti angoli così che la migrazione di una molecola dipenda dalla velocità con cui essa cambia la direzione di movimento consentendo così la separazione delle molecole di DNA in base al peso molecolare. L'intervallo di grandezza delle molecole che può essere separato dipende dalla durata dell'impulso: brevi impulsi separano molecole piccole, lunghi impulsi quelle più grandi. Tale metodo permette, quindi, di separare bene anche i frammenti ad alto peso molecolare, rendendo così più efficace il processo di tipizzazione.

In campo enologico, la PFGE è stata utilizzata fin dal 1995 per diversi studi che hanno messo in evidenza l'esistenza di un importante polimorfismo cromosomico in lieviti vinari della stessa specie (Deák, 1995). Oggi questa metodica è stata più volte utilizzata e associata ad altre tecniche per caratterizzare la diversità genetica di microrganismi vinari come *Torulaspora delbrueckii*, individuato come possibile starter fermentativo (Renault *et al.*, 2009), oltre che per ceppi di *Brettanomyces* spp. (Oelofse *et al.*, 2009) e di *S. cerevisiae* all'interno di un vigneto (Vilanova *et al.* 2007, Schuller *et al.*, 2007). A tal proposito, Schuller *et al.* (2007) hanno isolato ceppi commerciali di *S. cerevisiae* in fermentazioni spontanee di uve raccolte in prossimità di alcune cantine, ipotizzando un adattamento di tali ceppi alle condizioni

ambientali. La PFGE è stata anche impiegata per caratterizzare gli ecosistemi blastomicetici sulle superfici delle botti utilizzate per la vinificazione (Renout *et al.*, 2006). Lo studio ha rilevato che, in generale, il legno delle botti rappresenta una nicchia ecologica per batteri e funghi, in quanto, sono stati distinti diversi ceppi di microrganismi pro-tecnologici, quali *S. cerevisiae* ed *Oenococcus oeni*, ed alterativi, quali *Brettanomyces* spp. e *Gluconobacter* spp..

Oggi gli studiosi, attraverso i metodi di prima generazione applicati alla tipizzazione, mirano allo sviluppo di strategie per la conservazione della biodiversità e delle risorse genetiche di un territorio (Schuller *et al.*, 2005; Cappello *et al.*, 2004) e, allo stesso tempo, alla caratterizzazione di ceppi indigeni da impiegare durante la fermentazione per esaltare le caratteristiche territoriali (Nikolau *et al.*, 2007; Cappello *et al.*, 2004).

In diversi studi, le tecniche appena descritte sono state impiegate in combinazione per evidenziare meglio le differenze intraspecifiche tra gli isolati (Schuller *et al.*, 2007; Renout *et al.*, 2006). Spesso però, entrambe le metodologie mostrano gli stessi risultati e si preferisce utilizzare la RFLP perché più veloce e meno laboriosa della PFGE (Vilanova *et al.*, 2007).

6.2.2. Metodi basati sulla PCR

I metodi di seconda generazione comprendono tutte le analisi che hanno come target gli acidi nucleici, in particolare il DNA. In campo enologico, tali tecniche sono spesso impiegate per la valutazione dei polimorfismi genetici dei lieviti. La tecnica più utilizzata a questo proposito è la “Randomly Amplified Polymorphic DNA”

(RAPD)-PCR, la quale prevede l'impiego di primer aspecifici con sequenza nucleotidica di lunghezza compresa, generalmente, tra le 8 e le 12 basi e basse temperature di appaiamento. Quest'ultime permettono l'amplificazione casuale del DNA genomico. Dato che il numero e la posizione dei siti nucleotidici varia per i differenti ceppi, gli ampliconi così ottenuti sono caratteristici di un dato ceppo (Alfonso *et al.*, 2000; Paffetti *et al.*, 1995) e l'esame dei vari profili rende possibile il monitoraggio sia delle dinamiche di popolazione sia della dominanza di ceppi all'interno di un ecosistema (Williams *et al.*, 1990). In seguito al basso "rigore" dell'amplificazione, si può osservare a volte una certa variabilità dei profili RAPD, quindi, nel caso in cui la RAPD-PCR sia utilizzata come unica tecnica per la tipizzazione, è suggerito l'uso di almeno tre primer.

La RAPD rappresenta una delle più rapide metodologie di differenziazione di ceppi microbici e per questo motivo è spesso utilizzata in modo routinario per il raggruppamento dei vari isolati da sottoporre a caratterizzazione fisiologica e tecnologica. In campo enologico, Francesca e collaboratori (2010) hanno provveduto all'isolamento di 124 lieviti da diversi ambienti e matrici vinarie, rappresentati da grappoli di uva e mosti, foglie e corteccia di vite, terreno ed erba delle vigne ed insetti ed uccelli frequentatori dei vigneti. Dopo la differenziazione mediante RAPD, fra gli isolati sono stati riconosciuti 44 diversi ceppi appartenenti ad un totale di 10 specie. Alcuni autori (Fernandez-Espinar *et al.*, 2003) hanno utilizzato i differenti profili generati dopo amplificazione con sei primer a dieci nucleotidi per distinguere 58 ceppi appartenenti alle specie del complesso *Saccharomyces sensu stricto*.

La tecnica RAPD può essere facilmente applicata, con buoni risultati, su un elevato numero di isolati appartenenti alla stessa specie. La maggior parte delle volte, la specie in questione è di elevato significato tecnologico come *S. cerevisiae* (Sebastiani *et al.*, 2004) che rappresenta il principale agente della fermentazione alcolica. Spesso, però, anche specie quali *Dekkera bruxellensis* e *Pichia guilliermondii* sono interessate da questo processo in quanto costituiscono lieviti alterativi molto rilevanti da un punto di vista economico (Martorell *et al.*, 2006). A tal proposito, Lopes e collaboratori (2009) in uno studio condotto in Patagonia hanno utilizzato la tecnica sopra citata per caratterizzare i ceppi di *P. guilliermondii* responsabili della produzione di alte concentrazioni di fenolo volatile durante la fermentazione.

Benché spesso ritenuta essere una tecnica caratterizzata da bassa ripetibilità, Martinez *et al.* (2007) hanno dimostrato che la RAPD risulta essere più efficace della tecnica mtDNA RFLP e della cariotipizzazione elettroforetica nel determinare la correlazione tra polimorfismo genetico ed origine geografica dei lieviti vinari. Gli autori hanno inoltre ritenuto che tale tecnica potrebbe essere utile per valutare l'evoluzione dei lieviti autoctoni e la reazione degli stessi ad una possibile introduzione di lieviti commerciali. Questa metodologia è stata adottata per esaminare la biodiversità di 396 ceppi di *S. cerevisiae* (Romano *et al.*, 2008) con l'ausilio del primer M13 (Stendid *et al.*, 1994) per la produzione di un vino dolce italiano. In questo modo si è valutato l'andamento di un ceppo commerciale durante la fermentazione alcolica. Lo stesso primer è stato utilizzato per la caratterizzazione di 80 ceppi di *S. cerevisiae* selvatici, isolati da uve di varietà diverse. Tale studio ha

rilevato un elevato polimorfismo fra i ceppi, i quali sono stati utilizzati successivamente, per valutare la qualità fermentativa. La tecnica è spesso impiegata al fine di rilevare preziose proprietà enologiche da ceppi di lieviti autoctoni di un dato territorio (Tofalo *et al.*, 2007; Nikolau *et al.*, 2007; Lopandic *et al.*, 2008).

I vantaggi che contraddistinguono la RAPD sono senza dubbio la rapidità e la facile applicazione.

Nel caso di lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, altre tecniche sono ritenute utili alla differenziazione a livello di ceppo, in particolare il metodo basato sui microsatelliti (Marinangeli *et al.*, 2004) ed il metodo interdelta (Legras e Krast, 2003). La prima metodologia, conosciuta anche come “simple sequence repeats” (SSR) prende in esame sequenze costituite da unità corte (dinucleotidi, trinucleotidi e tetranucleotidi) ripetute. Tali sequenze sono molto frequenti nel DNA degli organismi superiori e sono maggiormente distribuite nelle regioni non codificanti del DNA stesso. L’interesse verso queste molecole target è dovuto all’elevato polimorfismo nell’ambito della stessa specie. A questo proposito, Legras e collaboratori (2005) hanno analizzato e comparato il grado di polimorfismo di ben 41 diversi loci microsatelliti nel genoma di *S. cerevisiae*.

L’analisi del polimorfismo dei microsatelliti è un metodo altamente riproducibile perché sono utilizzati primer specifici ed alte temperature di annealing per l’amplificazione. Vaudano e Garcia-Moruno (2008) hanno messo a punto una tecnica basata sulla PCR-multiplex di tre loci microsatellitari (SC8132X, YOR267C e SCPTS7) altamente polimorfici. L’amplificazione simultanea di questi tre loci ha generato prodotti di amplificazione facilmente separabili mediante elettroforesi su

gel di agarosio e poliacrilamide. Recentemente, diversi sono gli studi basati su analisi PCR-multiplex microsatellitare che hanno differenziato un gran numero di ceppi di lievito sia indigeni che commerciali (Schuller *et al.*, 2004, Legras *et al.*, 2005, Vaudano e Garcia-Moruno, 2008). Il potere discriminatorio di questa tecnica, assieme alla sua alta affidabilità ed al basso costo, fa sì che esso sia uno dei metodi attualmente più utilizzato per la distinzione intraspecifica di *S. cerevisiae* (Vaudano e Garcia-Moruno, 2008).

Il metodo interdelta, invece, sfrutta la diversa localizzazione cromosomica degli elementi delta. Tali elementi fiancheggiano i retrotrasposoni TY1 and TY2 dei lieviti, ma possono anche ritrovarsi separati da essi a costituire gli elementi delta “solo”. Nel genoma del ceppo *S. cerevisiae* S288C sono stati descritti circa 300 elementi delta e, per questo motivo, costituiscono dei buoni target per la valutazione dei polimorfismi cellulari (Lavalley *et al.*, 1994). Infatti, la posizione e/o il numero degli elementi delta varia per i differenti ceppi, quindi, i prodotti generati dall’amplificazione saranno differenti a seconda dei ceppi (Ness *et al.*, 1993). Fino a poco tempo fa, tale metodo era ritenuto meno discriminatorio, quantunque più veloce ed economico, della PFGE (Veizinhel *et al.*, 1994). Tuttavia, nel 2003 Legras e Karst hanno ottimizzato questa metodologia e, recentemente, è stata riportata in auge (Charpentier *et al.*, 2009).

6.3. Identificazione dei lieviti enologici

6.3.1. Metodi basati sulla restrizione del DNA

L'identificazione genetica dei lieviti può essere effettuata in vario modo, spesso più tecniche sono utilizzate assieme. Una delle tecniche applicate a tale scopo, soprattutto negli anni passati, è l'analisi del cariotipo. Tale analisi è condotta mediante PFGE. Esteve-Zarzoso e collaboratori (2001) hanno utilizzato tale tecnica identificando diverse specie di lieviti apiculati e, in particolare, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. uvarum*, *H. valbyensis*, *H. occidentalis*, *H. osmophila* e *H. vineae*. I ceppi di *Hanseniaspora* spp. sono stati dapprima classificati in due gruppi principali e, successivamente, nelle diverse specie in base al numero e alla posizione delle bande ottenute nel gel, in seguito alla separazione degli interi cromosomi. Questo tipo di analisi ha, inoltre, permesso l'identificazione di un ceppo indigeno di *S. cerevisiae* ed uno di *S. uvarum* con elevate prestazioni enologiche. Lo studio condotto da Tosi e collaboratori (2009) ha permesso di identificare, durante le microvinificazioni del vino "Amarone", diversi ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae* che mostravano un cariotipo caratterizzato da 225 e 365 kb. Altri studi scientifici hanno impiegato queste analisi per acquisire le dinamiche dei ceppi di *S. cerevisiae* durante le fermentazioni spontanee di vino Malvasia (Jemec *et al.*, 2001). La sperimentazione è stata utile per l'identificazione dei cariotipi presenti durante le diverse fasi della fermentazione: all'inizio della fermentazione dominava il cariotipo L1 seguito poi dal cariotipo L4 ed ancora dal modello L12 (Jemec *et al.*, 2001).

L'identificazione mediante metodi di prima generazione permette, non solo di determinare le dinamiche delle popolazioni di *S. cerevisiae* durante la fermentazione,

ma è anche un utile strumento per l'identificazione e la separazione di ceppi di lievito non ricombinanti o ibridi interspecifici (Antunovics *et al.*, 2005). Altre indagini, hanno messo in evidenza la segregazione meiotica nelle colonie di *S. cerevisiae* (Spiczki *et al.*, 2004) ed il rischio legato ad un elevato grado di instabilità genetica che può compromettere l'esito finale della fermentazione.

6.3.2. Metodi basati sulla PCR

L'analisi dei geni RNA ribosomiali comprende diverse tecniche e consiste nell'esame dei seguenti frammenti: gene 18S rRNA, gene 5.8S rRNA, circondato da 2 frammenti nucleotidici trascritti (ITS1 e ITS2) (White *et al.*, 1990), gene 26S rRNA, contenente i domini D1/D2, gene 5S rRNA, compreso tra due sequenze di DNA non trascritte (NTS1 e NTS2) (Musters *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1992) e dal gene 18S rRNA. Le regioni ITS che includono il gene conservato codificante per la subunità 5.8S rRNA e le due regioni spaziatriche interne, ITS1 e ITS2, non codificanti e variabili, mostrano un'alta variabilità interspecifica ed una bassa mobilità intraspecifica (Granchi *et al.*, 1999). Le sequenze altamente conservate dei geni rRNA fiancheggiando le regioni ITS permettono l'utilizzo di primer specifici. Tali frammenti di DNA consentono, quindi, l'identificazione a livello di specie mediante l'impiego di primer specie-specifici o la differenziazione a livello di ceppo (fingerprinting) quando l'amplicone viene digerito con enzimi di restrizione.

In generale, la metodologia più comune per l'identificazione dei lieviti vinari prevede l'amplificazione dei geni rRNA e la successiva digestione con gli enzimi di

restrizione *CfoI*, *HinfI*, *HaeIII* e *DdeI*. I frammenti generati sono caratteristici di una sola specie (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Il risultato è confermato dal sequenziamento del gene 5.8S-ITS o della regione D1/D2 del gene 26S rRNA e dal confronto delle sequenze in banca dati. Quest'ultima tecnica ha permesso di valutare e di caratterizzare i lieviti non-*Saccharomyces* durante il processo di fermentazione (Baleiras Couto *et al.*, 2005). La disponibilità di dati presenti nel WU-BLAST2 ha permesso, inoltre, di comparare le sequenze D1/D2 di lieviti ancora sconosciuti e di identificarli (Carrascosa *et al.*, 2005).

Gli ITS tra i geni rRNA sono stati spesso utilizzati per l'identificazione delle specie di lievito dimostrando l'utilità di questi target molecolari per la descrizione veloce della composizione di specie nell'ecologia dei lieviti. L'analisi dei geni ribosomiali è stata utilizzata in recenti studi scientifici anche per identificare le specie di lieviti dominanti negli ambienti delle vigne e durante tutta la fase della lavorazione (Sabate *et al.*, 2002). In questo lavoro, gli autori hanno riscontrato nel terreno la dominanza di *Filobasidium capsuligenum* per circa il 60%, sui grappoli le colonie di lieviti più ricorrenti erano differenti ed infine, nei tini in fermentazione, la specie più isolata (circa il 76%) era *Candida sorbosa*.

I ceppi di *S. cerevisiae* isolati erano già stati identificati dallo stesso tino in precedenti annate di fermentazione (Sabate *et al.*, 2002). Studi orientati alla distribuzione geografica dei lieviti hanno evidenziato che la composizione delle popolazioni dei lieviti enologici può mantenersi costante in annate successive (Pramateftaki *et al.*, 2000).

6.4. Monitoraggio dei lieviti enologici

I metodi coltura-indipendenti sono stati sviluppati per superare le limitazioni dei metodi coltura-dipendenti per la descrizione delle comunità microbiche complesse (Vaughan *et al.*, 2002). Il metodo più utilizzato a tal proposito è basato sulla PCR ed è noto come “PCR-denaturing gradient gel electrophoresis” (PCR-DGGE) introdotto nel 1993 da Muyzer e collaboratori. Questa tecnica permette la separazione dei frammenti di PCR dello stesso peso molecolare, ma con diversa sequenza nucleotidica (Muyzer, 1999). Essa prevede l’amplificazione del DNA bersaglio mediante PCR seguita, successivamente, da un’elettroforesi degli ampliconi in gel di poliacrilamide in presenza di agenti denaturanti chimici (urea e formamide). I primer impiegati per la PCR amplificano, in genere, porzioni dei geni RNA ribosomiali. Uno dei due contiene all’estremità terminale 5’ una sequenza di 40 bp di guanina e citosina, denominata GC clamp. Quest’ultima diviene parte integrante dell’amplicone e svolge un ruolo importante nel corso della DGGE. Gli ampliconi vanno incontro alla denaturazione durante la corsa, la quale provoca un cambiamento nella conformazione molecolare e ne rallenta la velocità di migrazione sul gel. La concentrazione di agenti denaturanti che determinano l’apertura della doppia elica varia in funzione della sequenza nucleotidica. Il GC clamp ha un’elevatissima energia di legame (Myers *et al.*, 1985) ed ha il compito di impedire che la denaturazione dell’amplicone sia completa. In questo modo i vari ampliconi si arresteranno in posizioni diverse del gel. L’identificazione dei microrganismi avviene per confronto diretto con i ceppi noti, oppure per confronto tra le sequenze ottenute e quelle di riferimento presenti in banca dati.

Negli ultimi anni la PCR-DGGE è comunemente applicata sia per determinare la composizione speciografica dei lieviti che per valutare la biodiversità dei lieviti che intervengono nel corso di fermentazioni spontanee o inoculate (Cocolin *et al.*, 2001). Tale tecnica è stata utilizzata da Renouf *et al.* (2007) per valutare l'evoluzione delle popolazioni di batteri e di lieviti di vini Bordeaux dall'uva fino alla bottiglia. Nel 2006, Renouf e collaboratori, hanno pubblicato un articolo sull'identificazione delle popolazioni microbiche presenti sulla superficie delle barrique prima e dopo il travaso. La stessa tecnica è stata utilizzata anche come strumento molecolare per valutare la biodiversità e monitorare le dinamiche di popolazioni blastomicetiche negli ambienti vinari (Francesca *et al.*, 2010) e durante la produzione di vino (Francesca *et al.*, 2010; Urso *et al.*, 2008). La DGGE è risultata particolarmente utile anche per la valutazione degli effetti di vari interventi tecnologici (Andorra *et al.*, 2008) e per registrare l'interazione tra *S. cerevisiae* e *Brettanomyces bruxellensis* a fine fermentazione (Renouf *et al.*, 2007). La tecnica in questione ha, infatti, reso possibile la determinazione dell'adattamento di *B. bruxellensis* nella comunità dei lieviti. Negli ultimi anni, alcuni ceppi di questa specie sono stati studiati ed identificati perchè presentano ottime qualità enologiche sia in termini di quantità di fenoli volatili presenti (Oelofse *et al.*, 2009), sia in termini di resistenza ad elevate concentrazioni di alcol che a ridotte limitazioni zuccherine (Renouf *et al.*, 2007). La metodologia PCR-DGGE è risultata meno utile per determinare l'ecologia dei lieviti quando le loro concentrazioni sono basse. Prakitchaiwattana e collaboratori (2004) hanno dimostrato che alcune specie dei generi *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* e *Cryptococcus* sono state rilevate anche se presenti a concentrazioni di circa 10^4

UFC/g. Al contrario, quando le uve erano mature o danneggiate, sono state identificate altre specie (*Metschnikowia* spp. e *Hanseniaspora* spp.).

La tecnica “fluorescence in situ hybridization” (FISH) permette di analizzare popolazioni microbiche attraverso l’impiego di sonde oligonucleotidiche fluorescenti specie-specifiche. Queste si legano al segmento complementare del DNA delle cellule bersaglio, le quali sono, successivamente, osservate al microscopio ad epifluorescenza. Xufre e collaboratori (2006) hanno analizzato le popolazioni dei lieviti *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* isolati da vini mediante l’impiego di sonde oligonucleotidiche marcate con fluoresceina ibridando i domini D1/D2 della regione 26S rRNA. Tali domini costituiscono un’ottima base per le sonde FISH grazie all’elevato grado di variazioni di sequenze interspecifiche. Negli ultimi dieci anni, la tecnica FISH è stata impiegata sempre più frequentemente per il rilevamento e l’identificazione diretta dei microrganismi in quanto essa combina la visualizzazione diretta con l’affidabilità dei metodi molecolari (Xufre *et al.*, 2006).

6.5. Applicabilità dei metodi molecolari per la caratterizzazione dei lieviti enologici

Nell’ultimo ventennio, gli studi delle comunità microbiche sono realizzati principalmente mediante l’ausilio di metodi molecolari. Molti dei recenti sviluppi nelle dinamiche di popolazioni e di evoluzione di specie e ceppi in un dato ambiente sono stati resi possibili grazie a nuove applicazioni della PCR. Da un punto di vista ecologico, tali metodologie sono di estrema utilità per la comprensione della

biodiversità e dei cambi speciografici. Essi sono, quindi, fondamentali per la pianificazione di strategie di interventi con determinati lieviti per specifiche funzioni. In ambito vinario, le varie metodologie molecolari sono state applicate con successo allo studio delle comunità blastomicetiche durante le varie fasi della trasformazione, al riconoscimento dei ceppi responsabili dei difetti del vino, alla verifica della persistenza dei ceppi starter inoculati ed alla distribuzione geografica di taluni ceppi. In futuro, si prevede l'applicazione delle strategie molecolari anche alla piccole produzioni ed alle produzioni di nicchia per le quali l'alta qualità e la tipicità possono essere garantite solo attraverso un controllo accurato dei ceppi impiegati in fermentazione.

7. I batteri lattici

7.1. Origine dei batteri lattici nel settore viticolo

Il gruppo dei batteri lattici (BL) include diversi generi, a loro volta raggruppabili sulla base di diversi caratteri morfologici, fisiologici e biochimici. I BL sono batteri Gram positivi, non sporigeni, immobili e microaerofili, cioè sviluppano a basse concentrazioni di ossigeno. Sono privi di catalasi, di nitrato riduttasi e di citocromo ossidasi, infatti non hanno catena respiratoria e il loro metabolismo è fermentativo. Si possono definire quindi microrganismi eterotrofi e chemiorganotrofi, adattati a vivere su substrati complessi e che necessitano non solo di carboidrati come fonte di energia, ma anche di aminoacidi, nucleotidi e vitamine. Il principale prodotto metabolico dalla fermentazione dei carboidrati è l'acido lattico. Per questo tollerano bene un'elevata acidità, dato che alcune specie crescono anche a pH = 3.

Data la loro importanza, alcuni studiosi hanno indagato sull'origine o la fonte dei batteri lattici nel processo di vinificazione.

Il succo d'uva appena estratto, in genere contiene diverse specie di *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* presenti ad una concentrazione di circa 10^2 - 10^3 UFC/ml (Costello *et al.*, 1983; Pardo e Zuniga, 1992; Fugelsang, 1997). Si ritiene che questi batteri provengono dalla superficie delle uve o come contaminanti delle attrezzature di cantina utilizzate nel processo di vinificazione. Alcune specie di BL sono stati isolati da diverse varietà di uve raccolte da vigneti in Spagna (Sieiro *et al.*, 1990; Suarez *et al.*, 1994), in Francia (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983) e in Germania (Weiller e Rädler, 1970). Nello specifico sono stati isolati *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc dextranicum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Sorprendentemente, in letteratura, non viene riportato alcuna pubblicazione che afferma la presenza di *Oenococcus oeni* associato a grappoli, principale specie responsabile della fermentazione malolattica dei vini.

Studi condotti in Australia su varietà a bacca rossa (Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Nero, Shiraz e Tyrian) e tre varietà di uve a bacca bianca (Chardonnay, Sauvignon Blanc e Semillon), hanno confermato la presenza di BL sulle uve (Bae *et al.*, 2005). I grappoli danneggiati hanno restituito un maggior numero di BL rispetto a quelli integri e le frequenze d'isolamento sono risultate maggiori su uve a bacca bianca rispetto a quelle a bacca rossa (Yanagida *et al.*, 2008). I ceppi isolati appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* ed *Enterococcus* e le specie maggiormente riscontrate sui grappoli sono state: *Lactobacillus lindneri*,

Enterococcus durans, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus Kunkeei*, mentre non è stata rilevata la presenza di *Oenococcus oeni* (Bae *et al.*, 2006).

Inoltre, sono stati effettuati isolamenti di BL da uve “Koshu” in Giappone (Yanagida *et al.*, 2008) riscontrando solo alcune delle specie (*Lc. lactis*, *Lb. plantarum* e *W. paramesenteroides*) identificate in Australia.

7.2. Classificazione dei batteri lattici presenti nei mosti e nei vini

I BL presenti nei mosti e nei vini appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Per la classificazione si ricorre, oltre che a caratteri morfologici, anche a proprietà fisiologiche come il carattere omofermentante o eterofermentante. I batteri omofermentanti producono più dell’85% di acido lattico a partire da glucosio; gli eterofermentanti producono acido lattico, anidride carbonica, alcol e acido acetico. Tra i cocchi, i batteri del genere *Pediococcus* sono omofermentanti e quelli del genere *Leuconostoc* eterofermentanti. I lattobacilli possono essere divisi in tre gruppi:

1. omofermentanti stretti (*Lb. mali*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*);
2. eterofermentanti facoltativi (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. paracasei*, *O. oeni*);
3. eterofermentanti obbligati (*Lb. brevis*; *Lb. hilgardii*, *Lb. fermentum*, *Lb. fructivorans*, *Lb. buchneri*);

Gli omofermentanti non fermentano i pentosi e producono due molecole di acido lattico da una di glucosio, gli eterofermentanti facoltativi producono acido lattico da glucosio, ma sono in grado di fermentare i pentosi generando acido lattico e acido

acetico. Infine gli eterofermentanti obbligati, a causa della mancanza della fruttosio-1,6-difosfato aldolasi, generano sia dal glucosio che dai pentosi, acido lattico, acido acetico, anidride carbonica ed etanolo. In genere si ritiene che sia assente attività catalasica.

La descrizione dei tre generi di batteri lattici presenti nel vino è la seguente:

Genere *Leuconostoc*. I BL appartenenti a tale genere sono caratterizzati da cellule sferiche o poco allungate, riunite in coppie o piccole catenelle, di diametro compreso fra 0,5-0,7 μm , lunghezza da 0,7 a 1,2 μm , non mobili, assenza di sporulazione; sono batteri anaerobi facoltativi, mesofili e chemiorganotrofi ovvero necessità di un glucide fermentescibile nel mezzo; dalla degradazione del glucosio, attraverso la fermentazione eterolattica formano acido D-(-)-lattico, anidride carbonica ed etanolo. L'arginina è idrolizzata da *Oenococcus oeni*, il test è negativo per altri *Leuconostoc*. Inoltre il contenuto in G + C di questa specie ha un valore di 37-39 (moli%).

Genere *Pediococcus*. Le specie del genere *Pediococcus* hanno cellule sferiche, mai allungate, da 1 a 2 μm di diametro, disposte in coppie o in tetradi in seguito alla divisione che avviene su due piani ortogonali e pertanto non formano catenelle. Sono microrganismi mesofili, anaerobi facoltativi, chemiorganotrofi ossia necessitano di un glucide fermentescibile nel mezzo; inoltre, sono produttori di acido D-L o L-lattico, senza produzione di anidride carbonica. Il contenuto in G + C ha un valore che varia da 34 a 42 (moli %).

Genere *Lactobacillus*. I BL del genere *Lactobacillus* presentano cellule allungate regolari di 0,5–1,2 μm per 1,0–10 μm , sovente lunghi bastoncini. Alcuni tuttavia sono molto corti simili a *Leuconostoc* spp., accoppiati o in piccole catenelle, non

presentano sporulazione e sono non mobili. Sono microrganismi mesofili, anaerobi facoltativi, chemiorganotrofi cioè necessitano di un glucide fermentescibile nel mezzo. Almeno la metà dei prodotti del metabolismo del glucosio è costituito da acido lattico (il metabolismo omofermentativo genera quest'unica molecola); il metabolismo eterofermentativo conduce alla produzione anche di acido acetico, etanolo e anidride carbonica; il contenuto in G + C va dal 36 al 47%.

7.3. Ruolo dei batteri lattici in enologia

I batteri lattici svolgono un ruolo fondamentale per l'elaborazione dei vini (Renouf *et al.*, 2005) soprattutto mediante la fermentazione malolattica (FML) che si verifica in vinificazione generalmente dopo la fermentazione alcolica.

La reazione di trasformazione dell'acido L-malico in acido L-lattico è una decarbossilazione diretta, cioè senza un intermedio che possa seguire altre vie metaboliche. La FML è poco esoergonica, tuttavia costituisce indirettamente una fonte di energia reale per le cellule. L'enzima responsabile di tale reazione, detto appunto enzima malolattico, è stato purificato per la prima volta in *Lb. plantarum*.

Oenococcus oeni (sinonimo) di *Leuconostoc oenos*, è la principale specie responsabile della FML anche se altri batteri lattici, come *Lb. plantarum* e *Ln. mesenteroides*, possono effettuare tale reazione. L'attività dei BL nel vino può esplicarsi anche attraverso la rimozione dell'ocratossina A (Del Prete *et al.*, 2007), mediante il metabolismo del diacetile (Nielsen e Richelieu, 1999) e dell'acetaldeide (Jussier *et al.*, 2006). La FML influisce sull'acidità, sul sapore e sulla stabilità microbiologica del vino (Lonvaud-Funel, 1999).

Nei climi caldi, la FML è spesso sgradita perché può portare a vini piatti, privi del nerbo acido che contrasta la grande maturità del frutto. Il clima caldo favorisce fermentazioni spontanee e incontrollate; devono essere quindi adottati accorgimenti al fine di evitare la FML e l'attacco degli acidi citrico e tartarico, della glicerina e degli zuccheri, per non incorrere, rispettivamente, nelle ben note e gravi alterazioni del girato, amaro, filante e spunto lattico o acetico.

Molte specie di batteri lattici, sia omofermentanti che eterofermentanti, sono in grado di degradare l'acido citrico. Tra le specie più comunemente riscontrate nel vino, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *O. oenos* e *Ln. mesenteroides* utilizzano rapidamente l'acido citrico presente nel mezzo. Al pH enologico l'acido citrico indissociato permea liberamente attraverso le membrane batteriche, senza necessità di trasportatori specifici. Le specie che non riescono a degradare questo substrato sono quindi carenti almeno del primo enzima della via metabolica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Una volta entrato nella cellula l'acido citrico è scisso dalla citrato liasi in una molecola di ossalacetato e in una di acetato. L'enzima è sintetizzato nei mezzi poco zuccherini ove sia presente acido citrico, il glucosio infatti agisce da repressore. In *O. oeni*, l'ossalacetato viene successivamente decarbossilato a piruvato che a sua può essere coinvolta in numerose altre vie metaboliche. Il piruvato è pienamente coinvolto nella formazione di diacetile, acetoino e 2,3-butandiolo, tra i quali il primo è particolarmente rilevante per il carattere del vino. Questa molecola è responsabile dell'aroma di burro ed ha una bassa soglia olfattiva. Le altre due molecole, che si originano dal diacetile, hanno soglie olfattive elevate, dimostrandosi spesso non influenti sul bouquet del vino (Lounvaud-Funel *et al.*, 1999).

Per il diacetile sono state proposte due vie di sintesi. Nella prima il diacetile si origina dalla reazione fra una molecola di acetil-COA e l'etanale-TTP. Nella seconda si forma acetoino da due molecole di piruvato, in seguito l'acetoino stesso genera acetile, grazie ad un'ossidazione. Questa via è aerobica. Oltre a sostanze acetoniche, le molecole di piruvato possono generare lattato, etanolo, acidi grassi e lipidi (Lounvaud-Funel *et al.*, 1999). I prodotti finali del metabolismo dell'acido citrico possono essere quindi diversi ma certamente si ha un'elevata produzione di acido acetico.

L'acido tartarico può essere degradato dai batteri lattici (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis*) generando l'alterazione del "girato", già descritta da Pasteur nel XIX secolo. L'acido tartarico è essenziale per l'equilibrio gustativo del vino e la sua scomparsa porta a vini piatti e stucchevoli. Il prodotto della reazione è l'acido acetico, che a sua volta compromette irreparabilmente la qualità complessiva del vino. Questa alterazione può essere prevenuta con la normale igiene di cantina e con adeguate dosi di anidride solforosa. I vini con elevati valori di acidità totale e bassi pH sono meno sensibili all'attacco di batteri che possono metabolizzare l'acido tartarico. Il carattere non riguarda una specie sola ma sono coinvolti ceppi di più specie. Per altro il numero di questi ceppi, sul totale dei batteri presenti solitamente in cantina, è piuttosto basso.

La degradazione del glicerolo è ritenuta dannosa per il prodotto finito, sia per le sue buone caratteristiche organolettiche, sia per i prodotti di questo metabolismo. Alcuni ceppi batterici (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*), convertono il glicerolo in precursori dell'acreolina, molecola che combinandosi con i tannini genera l'alterazione conosciuta come "amaro dei vini". Come nel caso del girato, alcuni ceppi di varie

specie sono portatori del difetto ma la loro incidenza sulla popolazione totale è bassa. Il glicerolo può essere anche degradato a piruvato e da qui ad acetato e a sostanze acetoniche, come prima descritto. Questa via è però scarsamente utilizzata nei vini. La degradazione del glicerolo è quindi generalmente limitata, tranne che nel caso dell'alterazione dell'amaro prima descritta.

Gli amminoacidi sono utilizzati dalle cellule batteriche per la produzione di molte sostanze fra cui ammine, acidi, alcoli e aldeidi, con importanti ripercussioni sulla qualità e sulla salubrità del vino (Liu *et al.*, 2002). In particolare, alcuni amminoacidi, tra cui l'istidina, possono essere degradati generando ammine biogene come l'istamina, sostanze tossiche e ritenute fattori di rischio per l'insorgenza di malattie tumorali. Oggi è ormai chiaro che anche ceppi selezionati di *O. oeni* sono in grado di produrre tali sostanze, mentre per molto tempo si è ritenuto che solo i pediococchi indigeni fossero responsabili di tale sgradito metabolismo. L'aumento di tali sostanze avviene in particolare alla fine della fermentazione malolattica, probabilmente a causa della scarsità di substrati energetici ormai presenti nel mezzo che spinge i batteri ad utilizzare gli amminoacidi per produrre energia (Leitao *et al.*, 2005). È ovvio che la produzione di ammine biogene aumenta con la disponibilità nel mezzo di amminoacidi o peptidi. A questo proposito deve essere posta particolare attenzione alle dosi di amminoacidi presenti nel vino. L'arginina è l'amminoacido più rapidamente degradato fra quelli presenti nei mosti d'uva e quest'attività è stata osservata anche in *O. oeni*. La via utilizzata è quella dell'arginina deamminasi che porta alla produzione stechiometrica di ornitina e ammonio. Tuttavia una piccola quantità di citrullina è liberata nel mezzo, fungendo da precursore per la sintesi di

etilcarbammato, un'altra sostanza ritenuta cancerogena (Le jaune *et al.*, 1995). La presenza di *Pediococcus* spp. durante la fermentazione dei mosti è stata spesso rilevata (Weiller e Rädler, 1970; Beneduce *et al.*, 2004). In particolare, i ceppi della specie *P. parvulus*, *P. damnosus* e *P. inopinatus* sono stati isolati da mosti di uve e da vini (Peynaud e Domercq, 1967; Weiller e Rädler, 1970; Edwards e Jensen, 1992; Rodas *et al.*, 2003; Beneduce *et al.*, 2004). I I pediococchi, anche se possono essere coinvolti nella FML del vino, sono indesiderati poichè spesso sono responsabili della formazione di composti metabolici, come diacetile e acetoino, che, in certe concentrazioni hanno un impatto negativo sulla qualità del prodotto finito.

Anche l'alterazione del vino, conosciuta come "filante" o "grasso", è attribuibile ai BL a causa di un'eccessiva sintesi di polisaccaridi esocellulari. Isolamenti effettuati negli anni '80 hanno dimostrato che *Pediococcus damnosus* è la principale specie responsabile di quest'alterazione (Lounvaud, 2002;). Il polisaccaride prodotto è un glucano, omopolimero del glucosio con struttura ramificata, inerte agli enzimi oggi utilizzati in enologia. L'esame visivo del vino è l'unica osservazione efficace per stabilirne l'alterazione. I ceppi alterativi di *P. damnosus*, rispetto a quelli "non filanti", presentano una capsula intorno alla parete cellulare visibile al microscopio ottico e generano veri filamenti se le colonie sono pizzicate con un'ansa. Le cellule manifestano una maggiore adattabilità a condizioni avverse del vino e in particolare ad elevati titoli alcolimetrici e a dosi massicce di SO₂. L'alterazione si manifesta in particolare quando la concentrazione batterica raggiunge le 10⁷ UFC/ml o quando la crescita avviene in presenza di glucosio. Fruttosio e pentosi, al contrario, non permettono la sintesi del polisaccaride (Llaubères *et al.*, 1990). L'alterazione può

manifestarsi in vasca ma anche parecchi mesi dopo l'imbottigliamento. Questo concorda con l'osservazione che i ceppi sviluppano nella forma più adatta a sopravvivere in un mezzo povero come il vino. In particolare è stato osservato che carenze di glucosio e di azoto favoriscono la produzione di polisaccaridi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Il carattere filante è portato su un plasmide ormai noto che i ceppi filanti tendono a perdere facilmente se trasferiti su un mezzo di cultura privo di etanolo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Se i trattamenti enzimatici per eliminare questo difetto risultano inutili, nei vini ancora in vasca una vigorosa solfitazione, con dosi di SO₂ libera di almeno 30 mg/L, ed un'accurata filtrazione sterilizzante garantiscono l'eliminazione dei batteri lattici. Contemporaneamente un'azione meccanica per sbattimento è efficace nel diminuire la viscosità del vino. L'alterazione del filante non causa solitamente alcun altro difetto sensoriale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

7.4. Fattori influenzanti l'attività dei batteri lattici nel vino

Il clima prevendemmiale e lo stato sanitario delle uve influenzano la carica iniziale, che generalmente risulta più scarsa in annate secche e su uve in buono stato sanitario. In ogni caso, in fase di vendemmia avviene una rapida colonizzazione sia dei mosti che della cantina da parte dei batteri e dei lieviti, ma le condizioni di vinificazione sono tali da non consentirne lo sviluppo durante la fermentazione alcolica. La composizione del mezzo ricco di zuccheri, di amminoacidi, di vitamine sarebbe idoneo alla crescita dei batteri lattici, ma nella "competizione" tra lieviti e batteri sono i primi a vincere in quanto capaci di adattarsi meglio all'ambiente di crescita

(Lonvaud, 2002). In particolare la solfitazione alla pigiatura, l'aumento della concentrazione alcolica e la rapida crescita dei lieviti fanno regredire la popolazione batterica fino a 10^2 - 10^3 UFC/ml (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). E' stato osservato che le specie di batteri lattici potenzialmente dannose possono rimanere latenti a concentrazioni inferiori a 10^2 UFC/ml anche per parecchi mesi causando poi, una volta che le condizioni ambientali lo permettano, le alterazioni di cui si è accennato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Il mezzo "occupato" dalla popolazione dei lieviti in fermentazione diventa quindi più ostile ai batteri. La varietà iniziale di specie e di ceppi diminuisce e la popolazione regredisce fino alla fine della fermentazione alcolica. A questo punto il vino ospita, oltre alla popolazione di lieviti in fase di declino e di autolisi, una popolazione di batteri lattici debole ma resistente ai numerosi fattori selettivi comparsi durante la fermentazione alcolica. La composizione del mezzo continua a cambiare perché, nonostante l'arresto della fermentazione alcolica, esistono altri fenomeni biochimici, quali l'autolisi dei lieviti che libera fattori di crescita e sostanze nutritive per i batteri lattici. Da parte loro i batteri, per azione delle proteasi e delle glucanasi, contribuiscono alla trasformazione del materiale cellulare di origine micetica in substrati assimilabili. Un insieme di fenomeni favorisce, quindi, la crescita dei batteri fino a quando la popolazione non arriva a 10^6 UFC/ml (Lonvaud, 2002). Questa fase di latenza ha durata molto variabile: può non essere osservata affatto o durare alcuni mesi, secondo le condizioni ambientali del vino.

Il pH del vino è certamente il fattore più importante e poco modificabile in grado di controllare l'attività dei BL. Il suo valore, nel vino, dipende essenzialmente dal tipo e

dalla quantità di acidi prodotti dalla pianta e quindi dal grado di maturazione dell'uva che a sua volta è legata all'andamento stagionale. Pur dipendendo fortemente sia dal clima che dal grado di maturazione delle uve, i valori di pH nei mosti italiani vanno da un valore di pH = 3-3,2 (nord Italia) fino a pH = 3,8-4.0 (sud Italia).

Il pH svolge un'azione selettiva nei confronti dei ceppi di batteri; in particolare al di sopra di pH 3,5 si possono sviluppare, oltre ad *O. oeni*, vari lattobacilli e pediococchi; *O. oeni* è comunque la specie di BL più resistente a bassi valori di pH, pur trovandosi in difficoltà se il valore di pH scende al di sotto di 3 (Rosi *et al.*, 2003). Vini con pH elevati presentano quindi una flora batterica più ricca e differenziata ma che può contenere ceppi responsabili di alterazioni sia in fase post-fermentativa che in fase di affinamento. Il pH elevato favorisce infatti la sopravvivenza di molte specie LAB, alcune delle quali dannose per il vino (Luonvaud, 2002). Il pH influisce anche sulla prontezza della FML e sul suo regolare andamento (Bousbouras e Kunkee, 1971), oltre che sulla scelta della via metabolica attraverso cui il microrganismo si procura energia. Al di sopra di pH=4 *O. oeni* degraderà preferibilmente glucosio e citrato con sviluppo di elevata acidità volatile. Infine, è interessante ricordare che il valore del pH influisce anche sull'attività antisettica dell'anidride solforosa: essa svolge infatti la sua funzione sotto forma molecolare e questa aumenta proporzionalmente con l'abbassarsi del pH. Particolare cura andrà rivolta a mosti con pH elevati dove si avrà una rapida crescita di specie indigene e potenzialmente dannose (Luonvaud, 2002): in questi casi un'adeguata solfitazione risulta fondamentale.

La temperatura influenza il tasso di crescita dei LAB nel vino. *O. oeni*, in condizioni di laboratorio ha una temperatura ottimale di crescita compresa tra 27 e 30 °C, ma nel vino a causa della presenza di etanolo, l'optimum di temperatura scende a valori di 20-23 °C. Queste variazioni sono correlabili alla capacità di far variare la composizione della membrana, adattandola alle diverse fasi della crescita o alla presenza nel mezzo di fattori limitanti. Uno degli effetti meglio conosciuti sulla composizione della membrana è quello della temperatura: a basse temperature, per compensare l'aumento di rigidità, si ha una diminuzione della lunghezza delle catene, un aumento delle insaturazioni e degli acidi grassi a catena ramificata. Con l'aumento della temperatura si manifestano fenomeni esattamente opposti. La crescita dei pediococchi e dei lattobacilli risulta favorita da temperature prossime a 25 °C.

Nella pratica, dopo la pigiatura, un raffreddamento del mosto facilita le chiarificazioni con possibilità di eliminare una maggiore quota di batteri lattici. Terminata la fermentazione alcolica, una rapida discesa della temperatura sotto i 10 - 15°C, se accoppiata a filtrazioni e solfitazione, può garantire la stabilità del vino fino all'imbottigliamento.

L'etanolo, quando è presente a concentrazioni intorno ai 10 gradi alcolici, ha un effetto tossico accertato sui batteri lattici, anche se la sensibilità a tale composto è molto variabile a seconda della specie e dei singoli ceppi. L'etanolo è in grado di provocare un aumento della permeabilità della membrana citoplasmatica (Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000) causando un eccessivo flusso di protoni verso l'interno della cellula con perdita di materiale intercellulare. D'altro canto, è ormai assodato che le cellule batteriche hanno la capacità di adattarsi alla presenza dell'etanolo e più in

generale all'ambiente del vino. In generale, i pediococchi e i lattobacilli mostrano una maggiore tolleranza rispetto a *O. oeni* e si sviluppano nel vino anche in presenza del 13% (v/v) di etanolo. Non è raro, quindi, rintracciare batteri lattici anche in vini ad alta gradazione, liquorosi e non. Infatti, ceppi appartenenti alle specie *Lb. fructivorans*, *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii*, sono stati isolati anche da vini liquorosi, contenenti fino a 20 gradi alcolici. Alcuni ceppi responsabili dell'alterazione detta "filante", manifestano meglio di altri questa capacità, grazie alla capsula polisaccaridica che li avvolge. Esperimenti condotti hanno dimostrato che cellule cresciute all'8% di alcol mostrano un adattamento allo stress da etanolo di tre volte superiore ad un testimone qualora poste in un ambiente con 10% di alcol e pH 3,5.

Passando all'influenza dei composti fenolici sulla microflora lattica, è ormai accertato che alcuni di essi siano inibitori della crescita dei BL, mentre altri stimolino l'attività di tali batteri. Si ritiene che i tannini enologici, gli antociani condensati, gli acidi fenolici, l'acido vanillico, le procianidine dei semi e gli ellagitannini derivati dalle querce svolgano un'azione antibatterica. D'altra parte, l'acido gallico e gli antociani liberi avrebbero invece un'azione stimolante sull'attività batterica. Per esempio, *Lb. hilgardii*, coltivato in mezzo contenente acido gallico e catechine, in concentrazioni pari a quelle presenti nei vini, ha mostrato una più rapida crescita nonché un aumento della relativa carica microbica. Ciò è attribuibile alla capacità di tali ceppi di metabolizzare questi composti durante la fase di crescita utilizzandoli come ulteriore fonte di energia (Alberto *et al.*, 2001).

D'altro canto, concentrazioni più elevate di tali composti determinano un effetto negativo sullo sviluppo batterico. *O. oeni*, sembra essere più sensibile alle

inattivazione da composti fenolici rispetto a *Lb. hilgardii* (Campos *et al.*, 2003). Gli acidi idrossicinnamici liberi sembrano influenzare negativamente la crescita di alcune specie di lattobacilli, tra cui *Lb. plantarum*. L'acido ferulico sembra essere più efficace dell'acido p-cumarico, anche se alcune specie sono più sensibili di altre.

Alcuni studi riportati in letteratura dimostrano che, in termini di crescita media, l'attività antimicrobica di diversi composti fenolici ottenuti da prodotti enologici ottenuti dai vinaccioli (Papadopoulou *et al.*, 2005) o più in generale dai vini (Baydar *et al.*, 2004) possono inibire la crescita di alcuni batteri patogeni. Gli estratti fenolici, contenenti principalmente acidi fenolici, hanno mostrato maggiore attività contro la crescita di batteri rispetto ai lieviti.

L'anidride solforosa è il più comune antisettico utilizzato in enologia. Un uso oculato di tale prodotto garantisce, oltre alla stabilità microbiologica, la protezione dall'ossidazione dei mosti e dei vini e l'estrazione di pigmenti dalla buccia dell'acino durante la macerazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Il meccanismo di azione è stato studiato nei lieviti ma si suppone sia del tutto simile nei batteri. La molecola, nella forma non dissociata, entra per diffusione nel citoplasma dove si dissocia a causa del pH più elevato e quindi reagisce con molecole essenziali come proteine enzimatiche, vitamine e coenzimi, a livello dei ponti disolfuro, generando l'arresto della crescita e la morte cellulare (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Oltre l'effetto sulla crescita cellulare, l'SO₂ inibisce l'attività dell'enzima malolattico. Altre forme con proprietà antisettiche sono l'aldeide bisolfito, l'SO₂ legata con i composti carbonilici e lo ione completamente dissociato.

I batteri lattici, dal canto loro, possono sviluppare una resistenza all'anidride solforosa, soprattutto se pre-coltivati in terreni con leggere dosi di anidride solforosa che faciliterebbero la trascrizione dei geni portatori della resistenza. Inoltre, è stato osservato che le dosi di SO₂ presenti nel vino hanno spesso un'azione batteriostatica e non battericida, giustificando così la presenza di FML tardive riscontrate, anche dopo mesi, in bottiglia.

L'attività dei BL può essere influenzata anche dalla presenza e/o relazioni con altri microrganismi presenti nel mezzo di crescita. È stato osservato che le specie di batteri lattici potenzialmente dannose possono rimanere latenti (10² UFC/ml) anche per parecchi mesi causando poi, una volta che le condizioni ambientali lo permettano, le alterazioni sopra descritte (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Il mezzo "occupato" dalla popolazione dei lieviti in fermentazione, diventa quindi più ostile ai batteri. La varietà iniziale di specie e di ceppi diminuisce e la popolazione regredisce fino alla fine della fermentazione alcolica (FA). A questo punto il vino ospita, oltre alla popolazione di lieviti in fase di declino e di autolisi, una popolazione di batteri lattici debole, ma selezionata per la tolleranza a numerosi fattori selettivi comparsi durante la FA. La composizione del mezzo continua a cambiare perché, nonostante l'arresto della FA, esistono altri fenomeni biochimici importanti, come l'autolisi dei lieviti, in grado di liberare fattori di crescita e sostanze nutritive per i BL. Da parte loro, i batteri, per azione delle proteasi e delle glucanasi, contribuiscono alla trasformazione del materiale cellulare di origine micetica in substrati assimilabili. Alla fine della fermentazione alcolica, l'autolisi dei lieviti è quindi accelerata dai batteri, la cui crescita è a sua volta stimolata dagli autolisati. Questi fenomeni si

amplificano e conducono, infine, ad una rapida diminuzione dell'attività e della vitalità dei lieviti. Tutto ciò concorre al rallentamento o persino all'arresto della fermentazione alcolica. I batteri probabilmente producono anche inibitori del lievito. Infatti, mosti d'uva precoltivati con batteri, cocchi o bacilli, omofermentativi o eterofermentativi, sono meno fermentescibili da parte del lievito del mosto testimone. I vini ottenuti contengono diverse decine di g/L di zuccheri non fermentati. Tuttavia deve essere sottolineato il ruolo di *Lb. plantarum*, in grado di inibire non soltanto i batteri ma anche i lieviti del genere *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Schizosaccharomyces*. La sostanza inibitrice è una proteina extracellulare stabile, ma inattivata dal calore. Un insieme di fenomeni, quindi, favorisce la crescita dei batteri fino a quando la popolazione non arriva a 10^6 UFC/ml (Lonvaud, 2002). Questa fase di latenza ha durata molto variabile: può non essere osservata affatto o durare alcuni mesi, secondo le condizioni di temperatura del vino. Oltre alle interazioni fra i lieviti e i batteri, è utile considerare anche le interazioni fra i vari ceppi di BL. Osservazioni compiute nell'industria casearia hanno messo in evidenza l'attività battericida o batteriostatica di vari composti prodotti dalle cellule batteriche. Si tratta o di piccole molecole come perossido d'idrogeno e di acidi organici o di vere e proprie batteriocine più complesse che, in molti casi sono state anche isolate. Un ruolo, importante, in grado di controllare la fermentazione malolattica è svolto dalle batteriocine, che sono piccoli polipeptidi, prodotti da alcuni BL, inibenti altri batteri. La nisina è un esempio di questi composti ed è stata usata per inibire la fermentazione malolattica e eliminare completamente i BL nei vini e

nei mosti. Fino ad oggi pochi studi sono stati effettuati sulle batteriocine prodotte dai BL di origine enologica.

Oltre alla produzione di acido lattico, alcuni ceppi di *P. acidilactici* producono composti antibatterici tra cui batteriocine (Albano *et al.*, 2007); *Leuconostoc mesenteroides* sub. *cremoris* risulta avere un'elevata produzione di batteriocine.

Muffe e batteri acetici possono produrre, analogamente ai lieviti, acidi grassi e polisaccaridi con effetti simili nell'attivare o bloccare la FML. Il loro effetto è però modesto nella maggior parte delle produzioni enologiche.

7.5. Effetto del “lisozima” sullo sviluppo dei batteri lattici nel vino

Il lisozima è dotato di una attività muramidasi che provoca la disgregazione della struttura della parete cellulare dei batteri Gram positivi, quali sono i batteri lattici. Largamente impiegato nell'industria casearia già dal 1985, all'inizio degli anni 90 è divenuto oggetto di ricerche anche nel campo enologico. A differenza dell'anidride solforosa, il lisozima non è in grado di svolgere un'attività anti-ossidativa e antiossidante, perciò il suo impiego in vinificazioni è alquanto ridotto. L'impiego di lisozima deve essere oculato ed associato all'utilizzo di ulteriori tecniche in grado di contenere l'aspetto ossidativo e preservare la frazione polifenolica del vino, che rappresenta una parte preponderante del patrimonio organolettico ed antiossidante del prodotto finito. Il pH riveste una certa importanza per il lisozima, in quanto una bassa acidità ne aumenta l'efficacia. La componente polifenolica interferisce, invece, negativamente sull'attività del lisozima, per cui nei vini rossi la sua azione è meno duratura rispetto a quella espressa nei vini bianchi, in seguito alla nota capacità delle

molecole polifenoliche di coordinarsi alle proteine, come il lisozima. In particolare Bartowsky e collaboratori (2004), hanno addizionato 150-300 mg/L di lisozima ad un vino bianco “Riesling” registrando, dopo sei mesi dall’aggiunta, un’attività residua dell’enzima di circa l’80%. Diversamente, nei vini rossi “Cabernet Sauvignon” e “Shiraz” l’attività del lisozima è risultata nulla già dopo due giorni dalla sua aggiunta. Recentemente Tirelli e De Noni (2007) hanno sottolineato l’instabilità del lisozima impiegato nei vini rossi giovani, nutrendo, di conseguenza, dubbi sulla sua efficacia nel controllare la fermentazione malolattica. Altri studi sono stati effettuati per valutare gli effetti del lisozima sulla composizione chimica e sensoriale dei vini (Bartowsky *et al.*, 2004)

Nei vini rossi addizionati con lisozima, rispetto a quelli non trattati, è stata evidenziata una riduzione dell’intensità del colore ed una diminuzione quantitativa della frazione polifenolica. Nei vini bianchi, il lisozima non ha prodotto variazioni della composizione chimica e sensoriale.

Inoltre, è stata testata, *in vitro*, la sensibilità (o resistenza) di alcuni ceppi di BL al lisozima, isolati da differenti specie di uve, da succo o da vino, ricorrendo all’impiego di mezzi colturali sintetici e mosti (con e senza bucce) addizionati di diverse quantità dell’enzima (Delfini *et al.*, 2004)

I risultati hanno dimostrato che, sul terreno di coltura sintetico, i lattobacilli e i pediococchi hanno una resistenza al lisozima maggiore rispetto ad *O. oeni*. Nello specifico numerosi ceppi di *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. plantarum* e *Lb. sakei* ed un ceppo di *P. parvulus* hanno mostrato, dopo cinque giorni di incubazione, una crescita medio-alta su mezzo sintetico addizionato di

lisozima in quantità pari a 50, 100, 200 e 500 mg/L. Relativamente alla specie *O. oeni*, solo il 33% dei ceppi ha mostrato crescita, dopo cinque giorni di incubazione, in presenza di 100 mg/L di lisozima. Di questi il 32% dei ceppi si è sviluppato dopo 16-20 giorni; per il restante 55% la crescita è stata nulla. Lo sviluppo di *O. oeni* in presenza di 200 e 500 mg/L è stata, rispettivamente, bassissima e nulla. I test sopra descritti sono stati eseguiti anche su mosti di Chardonnay (senza bucce) e di Barbera (con bucce) (Delfini *et al.*, 2004). E' stata così confermata la resistenza di *Lb. hilgardii* a dosi di lisozima pari a 500 mg/L in entrambi i mosti; invece lo sviluppo di *O. oeni* è stato inibito da 100 mg/L in mosto senza bucce e da 200 mg/L in mosto con bucce.

7.6. Gestione della vinificazione in bianco in Sicilia per ostacolare l'attività dei batteri lattici

Preservare le caratteristiche di un vino bianco di qualità ed eliminare eventuali difetti organolettici dovuti all'azione dei batteri lattici implica accorgimenti tecnici in grado di bloccarne l'attività. Queste operazioni sono di fondamentale importanza per la gestione della vinificazione e dell'affinamento dei vini prodotti nelle aree mediterranee, come quella vitivinicola siciliana. In queste zone, l'elevate temperature estive, nonché le miti temperature invernali possono favorire l'attivazione e la crescita dei BL nel mezzo. Ciò può causare l'avvio di fermentazioni non controllate che possono deperire il prodotto a causa dell'aumento dell'acidità volatile e della diminuzione dell'acidità malica generando, quindi, vini squilibrati e poco serbevoli nel tempo. Inoltre l'elevato pH che spesso è associato alle produzioni di vini siciliani,

rende ancor più complicata la gestione della FML. Infatti, con pH elevati l'inibizione della BL non può essere affidata esclusivamente alla SO₂. Ben sapendo che la frazione molecolare della SO₂ sarà minima, occorrerà comunque aggiungerla sia alla pigiatura sia dopo la FA, dato che quest'ultima riduce sensibilmente il contenuto di SO₂ presente nel vino. Tuttavia, altri additivi sono in grado di controllare l'attività dei batteri lattici, quali i sorbati e il lisozima. Il primo è impiegabile esclusivamente in vini fermi, dato che la loro azione inibitrice è efficace anche sui lieviti. Il secondo, ha un'azione particolarmente interessante nei confronti dei batteri: essendo efficace solo su batteri Gram positivi, quindi sui BL, esso può essere usato per impedire l'azione alterativa delle specie *Pediococcus* e *Lactobacillus*. L'assoluta innocuità verso i lieviti consente l'aggiunta in caso di arresto di fermentazione o nei vini spumanti. Fondamentale, specialmente in annate calde, è una corretta gestione delle temperature. Già alla pigiatura un raffreddamento del vino facilita le chiarificazioni con possibilità di eliminare una maggiore quota di batteri lattici. Terminata la FA una rapida discesa della temperatura al di sotto dei 10-15°C, se accoppiata a filtrazioni e solfitazione, può garantire la stabilità del vino fino all'imbottigliamento. Per le filtrazioni buoni risultati possono essere ottenuti sottoponendo i vini a passaggi su membrane con pori di 0.22-0.45 µm in grado di eliminare tutte le cellule batteriche presenti nel mezzo. In ogni caso sarà indispensabile evitare contaminazioni successive ai trattamenti di stabilizzazione microbiologica dato che l'atmosfera di cantina risulta ricca di batteri lattici.

8. Bibliografia

- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T., Teixeira P. (2007). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): *In situ* assays. *Meat Science*, 76: 796-800.
- Alberto M. R., Farias M. E., Manca de Nadra M.C. (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 4359-4363.
- Andorra I., Landi S., Mas A., Guillamon J.M., Esteve-Zarzoso B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 25 (7): 849-856.
- Antunovics Z., Irinyi L., Sipiczki M. (2005). Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): 971-979.
- Bae S., Fleet G. H., Heard G. M. (2005). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 712-717.
- Baleiras Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 49-56.
- Barrajón N., Arévalo-Villena M., Rodríguez-Aragón L.J., Briones A. (2009). Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control*, 20 (9): 778-783.
- Bartowsky E. J., Costello P. J., Villa A., Henschke P. A. (2004). Chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape Wine Research*, 10: 143-150.
- Baydar N. G., Ozkan, G., Sagdic, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15: 335-339. 787-795.
- Beneduce L., Spano G., Vernile A., Tarantino D., Massa S., (2004). Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Basic Microbiology*, 44: 10–16.
- Bousbouras e Kunkee (1971). Effect of pH on Malo-Lactic Fermentation in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22:3:121-126.
- Burruano S., Mondello V., Conigliaro G., Alfonzo A., Spagnolo A., Mugnai L. (2008) Grapevine decline in Italy caused by *Lasioidiplodia theobromae*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47 (2): 132-136.
- Campos F. M., Couto J. A., Hogg T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 167-174.
- Cappello M.S., Bleve G., Grieco F., Dellaglio F., Zacheo G. (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (6): 1274-80.
- Carrascosa A., Ramón González R.M.Y. (2005). *Microbiología del vino*, 5: 149-178.
- Castrejón F., Codóna A., Cuberoa C.B., Benítez T. (2002). Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 25 (3): 462-467.
- Charpentier C., Colin A., Alais A., Legras J. (2009). French Jura flor yeasts: genotype and technological Diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 263-273.
- Cocolin L., Heisey A., Mills D.A. (2001). Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 49-53.
- Cocolin L., Manzano M., Rebecca S., Comi G. (2002). Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (1): 24-27.
- Costello P. J., Morrison G. J., Lee T. H., Fleet G. H. (1983). Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technology Association of Australia*, 35: 14-18.

- Deák T. Methods for the rapid detection and identification of yeast in foods. (1995). *Trends in Food Science & Technology*, 6: 287-292.
- Del Prete V., Rodriguez H., Carrascosa A. V., las Rivas B., Garcia-Moruno E., Muñoz R. (2007). In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 70: 2155-2160.
- Delfini C., Cersosimo M., Del Prete V., Strano M., Gaetano G., Pagliata A., Ambrò S. (2004). Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficiency of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1861-1866.
- Di Maro E., Ercolini D., Coppola S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 201-210.
- Edwards C. G., Jensen K. A. (1992). Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 233-238.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337.
- Esteve-Zarzoso B., Peris-Toran M.J., Ramon D., Querol A. (2001). Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 80 (1): 85-92.
- Farris G. A., Budroni M., Vodret T., Deiana P. (1990). Sull'origine dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, della foglie e degli acini di alcuni vigneti sardi. *L'Enotecnico*, 6: 99-108.
- Fleet G. H., Lafon-Lafourcade S., Ribereau-Gayon P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 1034-1038.
- Fleet G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11 – 22.
- Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Aponte M., Settanni L., Moschetti G. (2010). Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (2): 337-351.
- Fugelsang, K. C. (1997). *Wine Microbiology*. New York: Chapman & Hall.
- Granchi L., Bosco M., Messini A., Vincenzini M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 949-956.
- Gubler W.D., Baumgartner K., Browne G.T., Eskalen A., Latham S.R., Petit E., Bayramian, L.A. (2004). Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology*, 33 (2): 157-165.
- Heard G. M., Flett G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 727-728.
- Jemec K.P., Cadez N., Zagorc T., Bubic V., Zupec A., Raspor P. (2001). Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18 (3): 247-259.
- Jussier D., Dubé Morneau A., Mira de Orduña R. (2006). Effect of simultaneous inoculation of yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters during white winemaking. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 221-227.
- Lafon-Lafourcade S., Carre E., Ribereau-Gayon P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages. *Microbiology*, 46: 874-880.
- Larignon R., Dubos B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (2): 147-157.
- Lavallee F., Salvas Y., Lamy S., Thomas D.Y., Degre R., Dulau L. (1994). PCR and DNA Fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 86-91.
- Le Jeune C., Lonvaud-Funel A., Ten Brink B., Hofstra H., Van der Voosen J. M. B. M. (1995). Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 316-326.

- Legras J.L., Karst F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. FEMS Microbiology Letters, 221: 249-255.
- Legras J.L., Ruh O., Merdinoglu D., Kasrt F.(2005). Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. Journal of Food Microbiology. 102: 73-83.
- Leitao M. C., Marques A. P., San Romao M. V. (2005). A survey of biogenic amine in commercial Portuguese wines. Food Control, 16: 199-204.
- Liu S. Q. (2002). Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. Journal of Applied Microbiology, 92: 589-601.
- Llaubres R. M., Richard B., Lonvaud A., Fournet B., Dubourdieu D. (1990). Structure of an exocellular β -d-glucan from *Pediococcus* spp., a wine lactic bacteria. Carbohydrate Research, 203: 103-107.
- Longo E., Cansado J., Agrelo D., Villa T. G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. American Journal of Enology and Viticulture, 42: 141-144.
- Lonvaud-Funel A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 76: 317-331.
- Lonvaud-Funel. (2002). Lactic acid bacteria in winemaking: Influence on sensorial and hygienic quality. Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection V.P. Singh and R.D. Stapleton, Jr. (Editors), Elsevier Science B.V..
- Lopandic K., Tiefenbrunner W., Gangl H., Mandl K., Berger S., Leitner G., Gamalat A., Ellah A., Querol A., Gardner R. C., Sterflinger K. (2008). Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. FEMS Yeast Research, 8 (7): 1063-1075.
- Lopes C.A., Jofré V., Sangorrín M.P. (2009). Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. Revista Argentina de Microbiología, 41 (3): 177-84.
- Lopes C.A., Rodríguez M.E., Sangorrín M., Querol A., Caballero A.C. (2007). Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34 (2): 139-49.
- Marinangeli 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 characterization. FEMS Yeast Research, 4: 427-435.
- Martínez C., Cosgaya P., Vásquez C., Gac S., Ganga A. (2007). High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. Journal of Applied Microbiology, 103 (6): 2185-2195.
- Martini A., Federici F., Rosini G. (1980). A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. Canadian Journal of Microbiology, 26: 856-859.
- Martorell P., Barata A., Malfeito Ferreira M., Fernandez Espinar M.T., Loureiro V., Querol A. (2006). Molecular typing of yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. International Journal of Food Microbiology, 106 (1): 79-84.
- Marullo P., Yvert G., Bely M., Aigle M., Dubourdieu D. (2007). Efficient use of DNA molecular markers to construct industrial yeast strains. FEMS Yeast Research, 7 (8): 1295-306.
- Mugnai L., Graniti A., Surico G. (1999). Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Disease, 83 (5): 404-418.
- Musters W., Planta R. J., Heerikhuizen H., Raue H. A. (1990). Functional analysis of the transcribed spacer of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA: it takes a precursor to form a ribosome. W.E. Hill, A. Dahlberg, R.A. Garret, P.B. Moore, D. Schlessinger and J.R. Warner (Eds.) The ribosome: Structure, function and evolution. American Society for Microbiology, Washington, DC, 435-442.
- Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 2: 317-322.

- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturino gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700.
- Myers R.M., Fischer S G., Lerman L.S., Maniatis T. (1985). Nearlyall single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13: 313-3145.
- Ness F., Lavalley F., Dubourdiou D., Aigle M., Dulau L. (1993). Identification of yeast strains using polymerase chain-reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62 (1). 89-94.
- Ness F., Lavalley F., Dubourdiou D., Aigle M., Dulau I. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain-reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62 (1): 89-94.
- Nielsen J. C., Richelieu M. (1999). Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 740-745.
- Nikolaou E., Andrighetto C., Lombardi A., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. (2007). Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food control*, 18 (11): 1458-1465.
- Oelofse A., Lonvaud-Funel A., Du Toit M. (2009). Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*, 26 (4): 377- 385.
- Paffetti D., Barberio C., Casalone E. (1995). DNA-fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and DNA restriction-fragment-length-polymorphism is useful for yeast typing. *Research in Microbiology*, 146 (7): 587-591.
- Papadopoulou C., Soulti K., Roussis, I. G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 41-46.
- Pardo I., Zuniga M. (1992). Lactic acid bacteria in Spanish red rose´ and white musts and wines under cellar conditions. *Journal of Food Science*, 57: 392-395.
- Parrish M. E., Carrol D. E. (1985). Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 165 169.
- Peynaud E., Domercq S. (1967). Étude de quelques bacilles homolactiques isolés de vins. *Archiv für Mikrobiologie*, 57: 255-270.
- Prakitchaiwattana C. J., Fleet G. H., Heard G.M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4: 856-877.
- Prakitchaiwattana C.J., Fleet G.H., Heard G.M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4 (8): 865-877.
- Pramateftaki P. V., Lanardis 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. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 236-248.
- Querol A., Barrio D., Ramón D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 439-446.
- Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2948-2953.
- Querol A., Barrio E., Ramon D. (1994). Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 21: 315-323.
- Ratón T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico” *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 15-19.
- Renault P., Miot-Sertier C., Marullo P., Hernández-Orte P., Lagarrigue L., Lonvaud-Funel A., Bely M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *Journal of Applied Microbiology*, 134 (3): 201-10.
- Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (1): 149-164.

- Renouf V., Falcou M., Miot-Sertier C., Perello M.C., De Revel G., Lonvaud-Funel A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (6): 1208-1219.
- Renouf V., Gindreau E., Claisse O., Lonvaud-Funel A. (2005). Microbial changes during malolactic fermentation in red wine elaboration. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39: 179-190.
- Renouf V., Claisse O., Miot-Sertier C., Perello MC., De Revel G., Lonvaud-Funel A. (2006). Study of the microbial ecosystem present on the barrels surface used during the winemaking. *Sciences des Aliments*, 26 (5): 427-445.
- Riberau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. Lonvaud-Funel. (2003). *Trattato di enologia I*. Edagricole, Bologna, pp. 139-159.
- Riberau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1998). *Trattato di enologia : chimica del vino stabilizzazione e trattamenti*. Ed. Agricole, Bologna.
- Rodas A. M., Ferrer S., Pardo I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 412-422.
- Romano P., Capece A., Serafino V., Romaniello R., Poeta C. (2008). Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (9): 1797-1802.
- Rosi I., Fia G., Canuti V. (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 194-199.
- Rosini G., Federici F., Martini A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology*, 8: 83-89.
- Rosselló-Mora R., Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39-67.
- Sabate J., Cano J., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J.M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Research in Microbiology*, 157: 267-274.
- Schuller D., Alves H., Dequin S., Casal M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 167-177.
- Schuller D., Pereira L., Alves H., Cambon B., Dequin S., Casal M. (2007). Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast*, 24 (8): 625-36.
- Sebastiani F., Pinzauti F., Casalone E., Rosi I., Fia G., Polsinelli M., Barberio C. (2004). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes of Chianti area. *Annals of Microbiology*, 54 (4): 415-426.
- Settanni L., Corsetti A. (2007). The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 1-22.
- Settanni L., van Sinderen, D., Rossi, J., Corsetti A. (2005). Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough *Lactobacillus* species by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3049-3059.
- Sicheri G. (1986). *Industrie agrarie*. Ed. Ulrico Hoepli. Milano.
- Sieiro C., Cansado J., Agrelo D., Velazquez J.B., Villa T.G. (1990). Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2936-2938.
- Solieri L., Antúnez O., Pérez-Ortín J.E., Barrio E., Giudici P. (2008). Mitochondrial inheritance and fermentative: oxidative balance in hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum*. *Yeast*, 25 (7): 485-500.
- Spadaro D., Patharajan S., Lore A., Gullino M.L. Garibaldi, A. (2010). Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 65-73.

- Spiczki M., Romano P., Capece A., Paraggio M. (2004). Genetic segregation of natural *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from spontaneous fermentation of Aglianico wine. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (5): 1169-1175.
- Stainer R. J., Ingraham J. L., Wheelis M. L., Painter P. R. (1988). Il mondo dei microrganismi. Cap. 2: I Metodi della microbiologia, 17-41. Zanichelli, Bologna.
- Stendid J., Karlsson J.O., Hogberg N. (1994). Intra-specific genetic variation in *Heterobasidium annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycological Research*, 98: 57-63.
- Suarez J. A., Gonzalez M. C., Callejo J. J., Colomo, B., Gonzalez A. (1994). Contribution to the study of varietal wines from Rioja and Navarra I. Microbial growth trends during grape maturation. *Bull DL'OIV*. 759-760.
- Tirelli A., De Noni I. (2007). Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC methods. *Food Chemistry*, 105: 1564-1570.
- Tofalo R., Torriani S., Chaves-Lopez C., Martuscelli M., Paparella A., Suzzi G. (2007). A survey of *Saccharomyces* populations associated with wine fermentations from the Apulia region (South Italy). *Annals of Microbiology*, 57 (4): 545-552.
- Tosi E., Azzolini M., Guzzo F., Zapparoli G. (2009). Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1): 210-218.
- Tourdot-Maréchal R., Gaboriau D., Beney L., Diviès C., (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 269-273.
- Ummarino I., Gentilini N., Di Stefano R. (1997). Alcuni aspetti del controllo di qualità nel campo enologico. Lo stato di combinazione degli antociani. *Annali di ISE*, XXVII, 105-121.
- Urso R., Rantsiou K., Dolci P., Rolle L., Comi G., Cocolin L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods". *FEMS Yeast Research*, 8 (7): 1053-1062.
- Ussegio-Tomasset L. (2000). *Chimica enologica*. Ed. AEB, 136-138. Brescia.
- Vaudano E., Garcia-Moruno E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25: 56-64.
- Vaughan E.E., de Vries M.C., Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. (2002). The intestinal LABs. *Antonie leeuwenhoek*, 82: 341-352.
- Vezinhet F., Dulau L., Hallet J.N. (1994). Comparaison de differentes methodes d'identification moleculaire de levures d'interes enologique. *Revue Francaise de Oenologie*, 149: 13-16.
- Vilanova M., Zamuz S., Masa A., Sieiro C. (2007). Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis vinifera*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 41 (3): 155-160.
- Weiller H. G., Radler F. (1970). Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg*, 124: 707-732.
- Welsh J., McClelland M. (1992). PCR-amplified length polymorphisms in transfer-RNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. *Molecular Microbiology*, 6 (12): 1673-1680.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols. A guide to methods and applications*: 315-322.
- 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.
- Xufre A., Albergaria H., Inácio J., Spencer-Martins I., Gírio F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (3): 376-384.
- Yanagida F., Sriornual S., Chen S. Y. (2008). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from koshu vineyards in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 47: 134-139.
- Zambonelli C., Tini V., Castellari L. (2000). Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia. A cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali.

CAPITOLO II

“Caratterizzazione molecolare e tecnologica di lieviti vinari isolati dalla cultivar

***Grillo* nell’areale di produzione del vino Marsala D.O.C.”**

Abstract

The oenological interest in the autochthonous yeast applications has increased since they represents an important supplement to wine quality. Yeast populations harboured in musts of “Grillo” grape variety were isolated and analyzed. In order to obtain a first blastomycetic mapping of Marsala wine production area, nine vineyards were chosen on the basis of different climatic and agronomic parameters. Analysis of blastomycetic populations was performed by cell counts on specific culture media for yeasts. Furthermore, during micro-fermentations non-*Saccharomyces* populations were distinguished from presumptive *Saccharomyces* spp. based on the appearance of colonies after growth onto Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar. A total of 98 isolates were collected from unfermented musts and during must microfermentations after 3 and 13 days.

Species differentiation was carried out by amplification of ITS-5.8S rRNA region. The representative isolates of each group were identified by sequencing of D1/D2 region of 26S rRNA gene obtaining the following species/genus: *Candida vini*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Torulaspota* spp. and *Zygosaccharomyces* spp..

Moreover, the study was specifically oriented to the *Saccharomyces* spp. strains, which were isolated from musts fermented for 21 days using a “modified ethanol sulphite agar” (MESA), prepared from ESY medium. A total of 24 cultures were collected then evaluated by microscopic observation and

confirmed to be *S. cerevisiae* through amplification of ITS-5.8S rRNA region and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) analysis. All the isolates were typed at strain level by amplification and analysis of inter- δ regions. The *S. cerevisiae* strains were characterized for technological traits with interest in wine production such as hydrogen sulphide production, ethanol tolerance and potassium metabisulphide resistance. Strains showing the best performance were used to carry out “Grillo” must microfermentations lasting 13 days to select yeast starter cultures. Two strains showed a technological traits better than commercial *S. cerevisiae* strain performance that was employed as reference. The other nine strains were characterized by a good technological performance comparable to commercial strain profile.

Keywords: Wine yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*; Grillo grapevine; Marsala wine.

Riassunto

Negli ultimi anni l'interesse da parte del mondo enologico verso l'impiego dei lieviti autoctoni è fortemente cresciuto. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'impiego di ceppi indigeni può portare a dei vini con caratteristiche sensoriali uniche e di elevata qualità.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare la complessità blastomicetica relativa a diversi habitat della cultivar "Grillo" utilizzando metodiche tradizionali e molecolari e selezionare ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* per un successivo impiego in fermentazioni su scala aziendale. In tal senso, sono stati prelevati nove mosti di uva Grillo da vigneti con diverse caratteristiche pedo-climatiche all'interno dell'area di produzione del Marsalsa D.O.C..

La popolazione blastomicetica è stata analizzata attraverso la conta e l'isolamento di lieviti da mosti tal quali e da mosti in corrispondenza del 3° e 13° giorno di microfermentazione spontanea, impiegando il terreno di crescita Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar.

Sono stati isolati un totale di 98 lieviti, i quali sono stati raggruppati e identificati a livello di specie mediante amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA e successivo sequenziamento della regione D1/D2 del gene 26S rRNA.

Le specie e/o generi identificati sono state: *Candida vini*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora* spp. e *Zygosaccharomyces* spp..

Inoltre, è stata rivolta particolare attenzione all'isolamento e alla caratterizzazione dei ceppi di *S. cerevisiae*. In tal senso dai mosti al 21° giorno di microfermentazione spontanea sono stati isolati un totale di 24 lieviti, utilizzando il terreno di crescita “modified ethanol sulphite agar” (MESA). Le suddette colture, previa osservazione microscopica della morfologia cellulare, sono state presuntivamente ascritte al genere *Saccharomyces* e successivamente identificate come *S. cerevisiae* attraverso l'amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA e successiva analisi “randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD-PCR).

Tutti gli isolati *S. cerevisiae* sono stati successivamente analizzati a livello di ceppo mediante amplificazione ed analisi delle regioni inter- δ . Quindi, un totale di 17 ceppi sono stati caratterizzati a livello tecnologico mediante la valutazione della produzione di idrogeno solforato e della resistenza all'etanolo e all'anidride solforosa. I ceppi che hanno mostrato particolari attitudini tecnologiche sono stati inoculati in mosti di uva Grillo per la valutarne la capacità di portare a termine una fermentazione alcolica (durata 13 giorni), allestita su scala di laboratorio. Due ceppi autoctoni di *S. cerevisiae* hanno mostrato caratteristiche tecnologiche superiori a quelle di un ceppo commerciale usato come riferimento. I restanti ceppi indigeni hanno fornito dei risultati paragonabili a quelli ottenuti con il ceppo di riferimento.

Parole chiave: Lieviti vinari; *Saccharomyces cerevisiae*; Cultivar Grillo; Vino Marsala.

1. Introduzione

1.1. Qualità del vino e lieviti autoctoni

La qualità, negli ultimi anni, ha assunto un'importanza sempre maggiore, al punto che, in tutte le aree del mondo industrialmente sviluppate, essa rappresenta un obiettivo del sistema produttivo di maggior peso rispetto alla quantità: ultimamente, infatti, si mira ad un ampio ricorso a sistemi di garanzia e certificazione della qualità. Nel caso dei prodotti alimentari, la qualità è un requisito che può essere riferito a diverse caratteristiche, quali la genuinità, la freschezza, la tipicità, il valore nutritivo, la serbevolezza, la sicurezza d'uso ed è determinata da diversi fattori che coinvolgono le materie prime e la loro origine, le tecnologie di trasformazione, nonché le modalità di conservazione, condizionamento, distribuzione e consumo.

Con riferimento alla qualità dei prodotti dell'industria enologica, è 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 influenzati dal tipo di lievito presente (Castelli, 1954; Delfini, 1995; Zambonelli, 1998). 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 del flavour del prodotto finito (Pretorius, 2000).

La diffusione crescente dell'uso dei lieviti selezionati, se da un lato presenta il vantaggio di un maggior controllo del processo di fermentazione alcolica,

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. 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 dei lieviti indigeni nell'intento di conseguire il risultato di un prodotto con caratteristiche uniche.

Altrettanto diffusa è l'opinione secondo la quale la tipicità e talvolta anche la qualità superiore di molti vini sia dovuta, oltre che a numerosi altri fattori, anche alla presenza sul territorio (o addirittura nelle cantine) di ceppi di lieviti particolarmente adatti per la fermentazione di determinati vitigni.

Questi lieviti, detti "autoctoni", sarebbero il frutto di una selezione naturale svolta da vari fattori legati all'ambiente, alla tradizione, alle pratiche di campo e alle pratiche di cantina. Da questa ipotesi nasce la richiesta di eseguire, caso per caso, selezioni di lieviti autoctoni capaci di esaltare e valorizzare le caratteristiche proprio del vitigno.

Pertanto, il presente lavoro ha avuto l'obiettivo di analizzare la microflora blastomicetica presente sulle uve e nei mosti provenienti dalle diverse zone di coltivazione del vitigno Grillo, con l'intento di valutare la diversità di specie riscontrabili in uno delle cultivar più importanti della produzione del vino Marsala DOC. Inoltre, lo stesso lavoro è stato finalizzato alla selezione di

colture starter autoctone appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, mediante caratterizzazione molecolare e tecnologica degli isolati, con l'intento di un successivo impiego in fermentazioni di mosto "Grillo" su scala aziendale.

1.2. La cultivar *Grillo*

Il Grillo è un vitigno a bacca bianca presente in Sicilia e proveniente dalla Puglia, da dove sarebbe stato importato come vite di rimpiazzo per favorire la ricostruzione post fillosserica nella zona di Marsala (Trapani, Italia) e successivamente diffuso nelle altre province della Sicilia. L'uva Grillo è già largamente presente nel Trapanese verso la fine del 1800, conosciuta anche con il sinonimo "Riddu". Nel 1930 costituiva circa il 60% delle viti dell'isola. Questa quota si ridusse progressivamente a circa 17.500 ettari negli anni '50, e la sua presenza è andata lentamente diminuendo fino a metà degli anni '90, oggi, conta poco più di 6.500 ettari e la maggiore zona di produzione è il lungomare tra Marsala e Trapani. Presenta foglia media, pentagonale, pentalobata o quasi intera; grappolo medio, cilindrico o conico, a volte alato, spargolo o mediamente compatto; acino medio o grosso, di forma sferoidale; ha buccia leggermente pruinosa, consistente e spessa, trasparente, di colore giallo dorato con chiazze color ruggine; la polpa ha sapore dolce e semplice. La produzione è buona e costante; i sistemi d'allevamento più idonei sono quelli a scarsa espansione con potatura corta o mista. Sopporta abbastanza bene le alte temperature ed è mediamente resistente alle principali malattie crittogamiche e alle avversità climatiche. Il Grillo ha la peculiarità di offrire il meglio di sé

quando è allevato nel classico alberello, può raggiungere un alto tasso zuccherino (22-30%), bassa acidità totale e malica, la vigoria è ottima, raggiunge piena maturazione tra la seconda metà di settembre e la fine dello stesso mese. Storicamente è usato come componente nel Marsala conferendo la giusta alcolicità al vino liquoroso. Il grande interesse e la ricerca in campo enologico in questi ultimi anni di rinascita qualitativa della viticoltura siciliana, hanno rivalutato e valorizzato il Grillo per la produzione di vini bianchi secchi. Tale vitigno se utilizzato in purezza fornisce vini dall'aroma caratteristico che ricorda l'ortica, il pepe verde e il gelsomino. In assemblaggio con altri vitigni autoctoni siciliani mostra la sua capacità di caratterizzare vini di corpo con una grande e particolare dote di profumi ed interessanti aromi citrini, oltre che reggere bene l'affinamento in botte.

2. Materiali e metodi

2.1. Campionamento delle uve e isolamento dei lieviti

Gli acini d'uva sono stati prelevati durante l'annata 2008-2009 da vigneti impiantati con la cultivar "Grillo" nell'areale viticolo Marsala DOC (TP) (Figura1). Sono state individuate un totale di nove zone vitate con differenti caratteristiche pedoclimatiche (Tabella1) le cui coordinate geografiche sono qui di seguito riportate:

Triglia Scaletta, Petrosino (TP): 37°43'01.53"N 12°31'36.49"E;

San Nicola, Mazara del vallo (TP): 37°37'06.93"N 12°37'33.07"E;

Musciuleo, Marsala (TP): 37°50'43.40"N 12°33'26.69"E;

Pispisia, Marsala (TP): 37°51'02.78"N 12°29'11.28"E;

Tre Fontane, Campobello di Mazara (TP): 37°34'10.52"N 12°35'31.98"E;

Madonna Paradiso, Mazara del vallo (TP): 37°39'21.37"N 12°35'31.98"E;

Mazara del Vallo Nord (TP) 37°42'03.61"N 12°35'35.25"E;

Mazara del Vallo Sud (TP): 37°35'21.62"N 12°39'09.23"E;

Mothia, Marsala (TP): 37°51'42.80"N 12°28'45.50"E.

In ogni vigneto sono stati prelevati un totale di 1 kg di acini d'uva da grappoli in diverse condizioni fitosanitarie e in diverse posizioni del vigneto, cercando così di ottenere la massima rappresentatività della microflora blastomicetica. I campioni sono stati conservati in contenitori sterili e trasportati nei nostri laboratori a 4 °C, cercando di minimizzare le contaminazioni microbiche.

I campioni sono stati omogeneizzati mediante stomacher ottenendo così dei mosti simil-pressati (mosti tal quale). Inoltre, aliquote di 200 ml di ciascun mosto sono state versate in beute sterili da 250 ml e addizionate di metabisolfito di potassio (MBSK) (0,02 % p/v). Le beute così ottenute sono state chiuse con tappi forati, montati con pipetta Pasteur per la decarbonizzazione avviando così delle micro-fermentazioni spontanee condotte per 21 giorni a 17 °C e U.R. 60%.

La conta e l'isolamento della microflora blastomicetica totale è stata effettuata in corrispondenza dei mosti tal quale e dalle micro-fermentazioni spontanee al 3° e 13° giorno. Una quantità pari a 1 ml di ciascun campione è stata inoculata, previa diluizione decimale seriale in soluzione fisiologica (0,8% p/v, NaCl), su

terreno di coltura Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar (Oxoid, Milano, Italia) il quale è stato successivamente incubato per 48-72 ore a 28°C.

La conta e l'isolamento dei lieviti presuntivamente ascrivibili al genere *Saccharomyces* è stata effettuata in corrispondenza del 21° giorno delle micro-fermentazioni spontanee su terreno colturale Modified Ethanol Sulphite Agar (MESA) (Francesca *et al.*, 2010), previa diluizione decimale seriale dei campioni e incubazione per 72 ore a 28°C.

Per ogni campione analizzato, dalle piastre di WL nutrient agar sono state selezionate e successivamente purificate circa 2-3 colture di lieviti in base alla diversa morfologia della colonia su piastra (Cavazza *et al.*, 1992; Pallmann *et al.*, 2001) ed un rappresentante di ciascuna morfologia è stato sottoposto ad identificazione molecolare.

Dalle piastre di MESA, per ogni campione analizzato, sono state selezionate circa 2-3 colture microbiche, purificate su WL nutrient agar e sottoposte ad osservazione microscopica della morfologia cellulare. Tutti gli isolati morfologicamente ascrivibili al genere *Saccharomyces* sono stati identificati geneticamente.

2.2. Identificazione molecolare degli isolati

2.2.1. Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dagli isolati è stata condotta seguendo il protocollo suggerito dai laboratori Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories S.r.l, Milano, Italia) e

richiedente l'utilizzo di una particolare matrice, chiamata InstaGene™ Bio-Rad Matrix .

2.2.2. Amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA

L'amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA è stata svolta utilizzando i primers:

forward ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')

reverse ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')

La reazione è stata eseguita sulla base del protocollo specificato da Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), come qui di seguito riportato:

Componenti	Sol. Stock	Conc. in reazione	Quantità in reazione
DNA templato			2,5 µl
Buffer Taq-Polimerasi	10 X	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	50 mM	3,5 mM	1,25 µl
Mix dNTP	25 mM	0,4mM	0,25 µl
Taq Polimerasi	5 U/µl	2,5 U	0,075 µl
Primer ITS1	0,1 mM	0,0006 mM	0,0625 µl
Primer ITS4	0,1 mM	0,0006 mM	0,0625 µl
H ₂ O			a 25 µl

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, prevede: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min; 35 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 55.5°C per 2 min, estensione a 72°C per 2 min e un'estensione finale a 72°C per 10 min. La visualizzazione degli ampliconi è

stata possibile grazie ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (p/v) per 90 minuti in tampone 1× TBE (89mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8).

2.2.3. Amplificazione del dominio variabile D1/D2 del gene 26S rRNA

La regione amplificata e successivamente sottoposta a sequenziamento diretto è di circa 560 pb 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 mostra la composizione riportata in tabella (O'Donnell, 1993):

Componenti	Sol. Stock	Conc. in reazione	Quantità in reazione
DNA template			5 µl
Buffer Taq-Polimerasi	10 X	1 X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	2,5 µl
Mix dNTP	25 mM (ciascuno)	250µM (ciascuno)	0,5 µl
Taq Polimerasi	5 U/µl	2,5 U/50 µl	0,5 µl
Primer NL1	0,1 mM	0,2 µM	0,1 µl
Primer NL4	0,1 mM	0,2 µM	0,1 µl
H ₂ O			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 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. La visualizzazione è stata ottenuta dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (p/v) per 45 minuti in tampone 1× TBE (89mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8).

2.2.4. Analisi RAPD-PCR

L'amplificazione random del DNA è stata realizzata utilizzando alternativamente 4 differenti primers:

XD5 (5'-CTGGCGGCTG-3');

XD4 (5'-AGCAGCGTGG-3');

M13 (GAGGGTGGCGGTTCT).

La miscela di reazione mostra la composizione riportata nella tabella seguente (Francesca *et al.*, 2010; Tofalo *et al.*, 2009):

Componenti	Sol. Stock	Conc. in reazione	Quantità in reazione
DNA templato			5 µl
Buffer Taq-Polimerasi	10 X	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	50 Mm	3,5 mM	1,75 µl
Mix dNTP	25 mM	0,4mM	0,4 µl
Taq Polimerasi	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
Primer (XD5 o XD4 o M13)	0,1 mM	0,0006 mM	0,15 µl
H ₂ O			a 25 µl

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, 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 visualizzazione dei profili di amplificazione RAPD è stata possibile grazie ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,5% (p/v) per 45 minuti in tampone 1× TBE (89mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8).

2.2.5. Analisi delle sequenze interdelta

L'amplificazione delle sequenze interdelta è stata ottenuta utilizzando la coppia di primers:

forward delta 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3');

reverse delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3').

La miscela di reazione è riportata nella seguente tabella (Legras e Karst, 2003):

Componenti	Sol. Stock	Conc. in reazione	Quantità in reazione
DNA templato			5 µl
Buffer Taq-Polimerasi	10 X	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	50 mM	3,5 mM	0,5 µl
Mix dNTP	25 mM	0,4 mM	0,25 µl
Taq Polimerasi	5 U/µl	2,5 U	0,2 µl
Primer delta12	0,1 mM	0,0005 mM	0,125 µl
Primer delta21	0,1 mM	0,0005 mM	0,125 µl
H ₂ O			a 25 µl

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con uno Stratagene cycler termale usando il programma seguente: 4 min a 95°C seguito da 35 cicli di 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 46°C e 90 secondi a 72°C e una fase finale di 10 minuti a 72°C . La comparazione dei patterns ottenuti dall'amplificazione delle sequenze interdelta è stata possibile grazie ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio 2,0% (p/v) per 90 minuti in tampone 1× TBE (89mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8).

2.2.6. Sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA

Una quantità pari a 2 µl di DNA amplificato è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 230 nm utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop ND 1000.

Il sequenziamento del frammento d'interesse è stato realizzato presso i laboratori della Primm (DNA sequencing, Milano) a cui sono stati inviati, per ciascun campione, 20 µl DNA amplificato, 10 µl primer NL1 (1µM), 10 µl primer NL4 (1µM) e foto della corsa elettroforetica del gel di agarosio 1,5% (p/v), su cui sono stati caricati 1 µl DNA amplificato e 1 µl 1-Kb Plus DNA Ladder. La sequenza nucleotidica così ottenuta è stata stata comparata mediante programma BlastN (Altschul *et al.*, 1997) con quelle presenti in banca dati NCBI sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2.3. Selezione tecnologica dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1. Test per la produzione di idrogeno solforato (H₂S)

La capacità da parte dei ceppi *S. cerevisiae* di produrre idrogeno solforato è stata valutata mediante crescita degli isolati sul terreno nutritivo Bismuth Sulfite Glucose Glycerin Yeast extract (BiGGY) agar (Oxoid) (Mortimer *et al.*, 1994). Il substrato è stato sciolto a bagnomaria, come riportato sulla confezione, e versato in piastre sterili. Sulla superficie del terreno sono stati strisciati i vari isolati ed incubati a 28°C per 24-48 h. La produzione di H₂S sul Biggy agar viene evidenziata dal grado di imbrunimento della patina di lievito. Le cellule si scuriscono con intensità crescente in funzione della quantità di idrogeno solforato prodotta: 1 = bianco crema, 2 = marrone chiaro, 3 = marrone, 4 = marrone scuro, 5 = nero.

In base al grado di imbrunimento della patina è stata evidenziata la diversità fra gli isolati, prendendo come riferimento cromatico le colonie di un ceppo *Candida albicans*, noto produttore di idrogeno solforato, coltivato nelle medesime condizioni. Gli isolati che sono risultati essere bassi produttori di idrogeno solforato sono stati caratterizzati per ulteriori parametri di interesse enologico, quali resistenza all'etanolo, all'anidride solforosa e crescita in presenza combinata di etanolo e di anidride solforosa.

2.3.2. Test di resistenza all'etanolo e all'anidride solforosa

La resistenza dei ceppi *S. cerevisiae* all'etanolo è stato valutata impiegando il terreno di crescita Yeast Extract Medium (YEM) avente la seguente composizione: estratto di lievito 5 g l⁻¹, peptone batteriologico 5 g l⁻¹, glucosio 20 g l⁻¹, agar 5 g l⁻¹, pH 5.5.

Ad esso è stata aggiunta acqua deionizzata in quantità variabile in funzione del volume di etanolo (95% v/v) addizionato al terreno base (YEM), dopo sterilizzazione in autoclave a 121°C per 15 minuti. Sono state impiegate diverse concentrazioni di etanolo: 12, 14, 16 e 18% (v/v).

La resistenza all'anidride solforosa SO₂ dei ceppi *S. cerevisiae* è stata saggiata su terreno YEM sterile addizionato di metabisolfito di potassio (MBSK) in diverse quantità ottenendo le seguenti concentrazioni finali: 0,10 mg/ml, 0,15 mg/ml e 0,20 mg/ml.

La resistenza dei ceppi *S. cerevisiae* in presenza combinata di etanolo e di SO₂ è stata valutata usando il terreno YEM addizionato di MBSK e di alcol etilico (99% v/v), modificando il volume di acqua distillata in funzione delle concentrazioni dei selettivi impiegati. Le concentrazioni testate di metabisolfito di potassio e di etanolo sono state: etanolo 12% (v/v) con MBSK (0,24 mg/ml); etanolo 14% (v/v) con MBSK (0,24 mg/ml); etanolo 16% (v/v) con MBSK (0,24 mg/ml); etanolo 18% (v/v) con MBSK (0,24 mg/ml).

Tutti i test sono stati condotti in doppio e i ceppi sono stati inoculati in piastra tramite spot, corrispondenti a 10 µl di brodo coltura (10⁶ cellule/ml).

Dopo incubazione a 28°C per 48-72 h, è stata valutata la resistenza degli isolati alle diverse concentrazioni degli inibenti testati. Lo sviluppo delle colture è stato confrontato con la crescita di un ceppo tipo *S. cerevisiae* (Challenge, Enartis), coltivato nelle medesime condizioni, e con quello degli stessi isolati, inoculati su YEM non addizionato degli inibenti.

2.3.3. Valutazione della capacità fermentativa

Gli isolati che hanno mostrato una resistenza medio-alta all'etanolo e all'SO₂ sono stati ulteriormente caratterizzati impiegandoli in prove di microfermentazioni di mosti d'uva Grillo.

Sono state allestite delle beute, opportunamente sterilizzate in autoclave a 121°C per 15 minuti, impiegando 100 ml di mosto pastorizzato d'uva Grillo, addizionati di metabisolfito di potassio a due diverse concentrazioni, 0,10 mg/ml e 0,20 mg/ml, e di un attivante di fermentazione 0,20 mg/ml (Booster activ premium, Vason, Milano, Italia).

Le beute così preparate sono state inoculate con le brodo colture degli isolati selezionati, in quantità tale da ottenere una concentrazione di 10⁷ cellule/ml di mosto e chiuse con tappo forato montato con pipetta Pasteur per la decarbonizzazione dei mosti in fermentazione.

Il test è stato condotto a due differenti temperature: 13°C e 17°C con U.R. 60%.

Durante la fermentazione si forma anidride carbonica che, svolgendosi, provoca un calo di peso (CP) di tutto il sistema. L'andamento della fermentazione è stato seguito con pesate quotidiane fino al tredicesimo giorno dall'inoculo.

Parallelamente alle microfermentazioni delle colture testate, nelle medesime condizioni, è stata monitorata la microfermentazione condotta da un ceppo di *S. cerevisiae* (Challenge, Enartis) presente in commercio e comunemente impiegato nell'areale vitivinicolo Marsala DOC per la fermentazione di mosti d'uva Grillo.

3. Risultati

3.1. Conta e isolamento dei lieviti

La carica blastomicetica dei mosti tal quale è risultata compresa fra 1.2×10^4 e 3.8×10^6 UFC/g, relativamente più alta è risultata quella ottenuta dalle microfermentazioni spontanee al 3° giorno ($1.1 \times 10^6 - 204 \times 10^7$ UFC/ml) e 13° giorno ($8.2 \times 10^6 - 2.4 \times 10^7$ UFC/ml). La carica dei presunti *Saccharomyces* spp., valutata dopo 21 giorni di microfermentazione è stata compresa fra 2.6×10^6 e 1.9×10^7 UFC/ml.

Da tutti i campioni analizzati sono stati isolati 92 lieviti di cui 68 dai mosti tal quale e dalle prime fasi delle microfermentazioni spontanee (3° e 13° giorno) per un'analisi dell'ecologia blastomicetica della cultivar Grillo. Le restanti 24 colture sono state isolate in corrispondenza del 21° giorno di microfermentazione, identificate presuntivamente sulla base delle

caratteristiche morfologiche della colonia e cellulare come *Saccharomyces* spp., per la selezione di ceppi indigeni di *S. cerevisiae*.

3.2. Identificazione molecolare dei lieviti presunti non-*Saccharomyces*

Un totale di 68 isolati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e ad amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA.

Tutti gli isolati sulla base del peso molecolare del relativo amplicone ITS sono stati raggruppanti in 8 differenti clusters (Figura 2). Un rappresentate di ciascun profilo ITS è stato identificato a livello di specie mediante sequenziamento del dominio variabile D1/D2 del gene 26S rDNA, i cui risultati sono riportati in tabella 2. La composizione della comunità blastomicetica in funzione delle specie di lievito è riportata in figura 3. La distribuzione delle differenti specie di lievito identificate in funzione della zona di campionamento è esplicitata in tabella 3 e graficata in figura 4. La distribuzione delle diverse specie di lievito rilevate in funzione della sorgente d'isolamento è riportata in tabella 4.

Nel presente lavoro, *Torulaspota delbrueckii* è risultata essere la specie maggiormente riscontrata rispetto al totale degli isolati (Figura 3) e rilevata in tutte le zone campionate oltre che essere particolarmente presente in entrambi i siti di Mazara del Vallo (Figura 4) e in corrispondenza nelle microfermentazioni (3° e 13° giorno) (Tabella 4). La specie *Metschnikowia pulkerrima* e i generi *Zigosaccharomyces* spp. e *Torulaspota* spp. sono stati

riscontrati con diverse percentuale d'isolamento e rilevati in gran parte delle zone di campionamento.

Metschnikowia pulkerrima è stata isolata maggiormente in mosti tal quale e raramente nelle prime fasi di microfermentazione.

Diversamente dalle altre specie, *Zigosaccharomyces* spp. è stato ritrovato in più alta percentuale in corrispondenza del 13° giorno di micro-fermentazioni.

Tra le specie riscontrate con la più bassa percentuale d'isolamento rispetto al totale delle colture identificate emergono *Candida vini* e *Pichia guilliermondii*. Sono state rilevate nei mosti tal quale e nelle fasi iniziali delle micro-fermentazioni.

Soltanto due colture sono risultate ascrivibili alla specie *S. cerevisiae* che nell'ambito della microflora blastomicetica totale è risultata di difficile rilevazione così come molto bassa è stata la percentuale d'isolamento della specie *K. thermotolerans* riscontrata esclusivamente nel mosto ottenuto dal vigneto di Mazara del Vallo Nord.

3.3. Identificazione molecolare e strain typing di *Saccharomyces cerevisiae*

Un totale di 24 isolati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e all'amplificazione del frammento 5.8S-ITS del rRNA.

Tutte le colture analizzate hanno fornito un amplificato pari a 880 pb e pertanto ascrivibili al genere *Saccharomyces* spp. (Tabella 5 e Figura 5a).

Relativamente a tale genere, l'analisi diretta del 5.8S-ITS rRNA non consente di valutare le relazioni interspecifiche, in quanto tutte le specie ascrivibili al

gruppo dei *Saccharomyces sensu strictu* restituiscono un prodotto ITS di pari dimensioni (880 pb). Pertanto tutti gli isolati, successivamente, sono stati sottoposti ad amplificazione RAPD-PCR impiegando, alternativamente, tre differenti primers (XD4, XD5 e M13). Tutti gli isolati hanno mostrato un profilo RAPD uguale a quello del ceppo tipo *S. cerevisiae* 1942^T (Figura 5b) e pertanto riuniti in un unico cluster. Due isolati, selezionati come rappresentanti del suddetto cluster, sono stati sottoposti al sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA confermando la relativa appartenenza alla specie *S. cerevisiae* con un'omologia pari al 99%, dopo confronto delle relative sequenze nucleotidiche in BlastN database.

D'altro canto, nessuno dei tre primers impiegati è stato in grado di discriminare tali isolati a livello di ceppo. Pertanto le 24 colture sono state, successivamente, sottoposte ad analisi delle sequenze interdelta ottenendo un'elevata variabilità dei polimorfismi genetici. Tale tecnica ha permesso di discriminare i 24 isolati *S. cerevisiae* in 17 ceppi (Figura 5c). In

corrispondenza di tutte le microfermentazioni, ottenute con mosti provenienti dai nove vigneti campionati, sono stati isolati ceppi di *S. cerevisiae* tranne che per le località San Nicola e Trefontane (Figura 6). In corrispondenza delle zone vitate Mothia, Mazara del Vallo Nord e Pispisia sono stati isolati differenti biotipi dalla medesima microfermentazione e quindi appartenenti alla stessa zona di campionamento. L'isolamento dalla microfermentazione mMGR2, effettuata con mosto della località Pispisia, ha restituito la più alta biodiversità in termini di ceppi di *S. cerevisiae*.

3.4. Caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *S. cerevisiae*

È stata osservata una produzione medio bassa di H₂S da parte di 15 ceppi di *S. cerevisiae* su un totale di 17. Tali ceppi sono stati ulteriormente testati per la loro resistenza all'etanolo e MBSK. Un totale di 11 biotipi hanno mostrato resistenza medio-alta ad entrambi gli inibenti, anche in presenza combinata di etanolo e MBSK. Tali ceppi sono stati successivamente testati come starter in mosti di uva Grillo per valutarne la relativa capacità fermentativa.

Microfermentazioni a 17 °C e 0,10 mg/ml di MBSK. L'andamento fermentativo degli isolati non è stato omogeneo (Figura 7) . Fra le colture autoctone, CS182 ha mostrato il più alto CP sia al 3° che al 13° giorno, rispettivamente pari a 9,76 g e 13,60 g, superiori o in linea con il ceppo commerciale di riferimento *S. cerevisiae*. Gli isolati CS133, CS147, CS128, CS160 hanno avuto un andamento fermentativo paragonabile al controllo.

Microfermentazioni a 17 °C e 0,20 mg/ml di MBSK. Gli isolati hanno mostrato un andamento fermentativo pressoché omogeneo in termini di CP raggiungendo valori (da 12,76 g a 13,94 g) simili o leggermente inferiori a quelli del controllo (14.23 g) (Figura 8). I ceppi CS147, CS155, CS180 sono gli unici *S. cerevisiae* che hanno presentato un CP nettamente inferiore rispetto agli altri isolati e al ceppo di riferimento.

Microfermentazioni a 13 °C e 0,10 mg/ml di MBSK. La figura 9 mostra una differente distribuzione dei valori in termini di CP. I biotipi CS165 e CS160 hanno mostrato il più alto CP al 3° giorno (6,27 g e 5,29 g) e al 13° giorno

(15,03 g e 14,79 g), nettamente superiore al controllo. CS147 e CS162 hanno presentato il peggior andamento fermentativo pari a 3.20 e 11.02 g, rispettivamente. Il ceppo CS180 pur mostrando un CP al 3° giorno di microfermentazione al di sotto della media, nella seconda parte della fermentazione è risultato superiore al controllo in termini di CP. *Microfermentazioni a 13 °C e 0,20 mg/ml di MBSK*. La figura 10 mostra un andamento fermentativo abbastanza diversificato, soprattutto fra il 4° e 8° giorno in cui i campioni CS147, CS155 e CS180 hanno presentano il minor calo peso. Infine CS165 ha raggiunto valori di CP superiori al controllo e ai restanti ceppi.

Sulla base dei dati ottenuti, CS182 e CS165 possono essere ritenuti i ceppi di *S. cerevisiae* caratterizzati dalle migliori “performance” tecnologiche, rispettivamente a 17°C e 13°C.

4. Discussione

Tra i produttori di vino, sta divenendo sempre più forte l'interesse per l'ecologia e l'evoluzione dei lieviti durante l'intero processo produttivo, con l'intento di correlare l'avvicinarsi delle popolazioni microbiche ai tipi e alle concentrazioni delle sostanze responsabili dell'aroma del vino. 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 prodotto finito.

Il primo obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'ecologia microbica dell'ambiente vitivinicolo della cultivar "Grillo" e di un areale di produzione, quello del "Marsala D.O.C.", entrambi mai soggetti a questo tipo di analisi.

La presenza delle molte specie riscontrate è indice di una buona diversità nella popolazione degli isolati sia da mosti tal quale di uva "Grillo" che da microfermentazioni, così come dimostrato da 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).

T. delbrueckii è stata senza dubbio la specie più diffusa in tutti i vigneti e specificatamente nelle località di Mazara del Vallo (TP), come se in quell'anno, tale specie facesse parte di un pool stabile di microrganismi caratterizzanti quella specifica zona di produzione. Questo risultato ha confermato l'idea che la posizione geografica ed i cambiamenti microclimatici possono influenzare la diversità a livello di specie esistente in vigna e quindi nel mosto (Raspor *et al.*, 2006).

Numerosi studi hanno sottolineato l'impatto positivo di alcuni ceppi di *T. delbrueckii* sul profilo organolettico dei vini (Ciani e Maccarelli, 1998; Ciani e Picciotti, 1995; Herraiz *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991). Tale specie, infatti,

se impiegata in processi fermentativi, restituisce un prodotto finale con una bassa quantità di composti indesiderati quali acetaldeide, acetoino, acido acetico ed acetato di etile (Peynaud, 1956; Cabrera *et al.*, 1988; Herraiz *et al.*, 1990; Ciani e Picciotti, 1995; Ciani e Maccarelli, 1998; Plata *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2008). Hernández-Orte e collaboratori, in un lavoro del 2008, hanno sottolineato la capacità di tale specie di modificare, significativamente, per via enzimatica, la concentrazione degli aromi varietali nei mosti (norisoprenoidi, terpenoli, benzonoidi, fenoli volatili e lattoni) attraverso l'idrolisi dei rispettivi precursori aromatici. Nel 2009, Renault e collaboratori, hanno ulteriormente valutato le attitudini enologiche di tale specie. Infatti, numerosi ceppi hanno mostrato una tolleranza ad elevate concentrazioni di glucosio e fruttosio (fino a 350g/l), una produzione elevata di glicerolo (fino a 16 g/l), una resistenza all'etanolo fino al 10% (v/v) e una produzione di un fattore Killer inibente numerose specie non-*Saccharomyces*. Sulla base di tali dati, gli stessi autori hanno proposto un nuovo starter commerciale formato dalle specie *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*.

La species *M. pulkerrima* è stata maggiormente isolata in mosti tal quale e raramente nelle prime fasi di microfermentazione. Una sua caratteristica fisiologica è quella di crescere in presenza di elevate concentrazioni zuccherine (50-60% glucosio p/v) e di avere un basso potere alcoligeno (Vincenzini *et al.*, 2005). La presenza di alcol nel mosto determina un elevato stress fisiologico che induce tale specie ad una sintesi più o meno elevata di esteri, formati da alcoli superiori ed acidi grassi a 10-12 atomi di carbonio, la cui concentrazione

arricchisce il vino di aromi fruttati (ananas, mela verde, banana) (Fernandez *et al.*, 2000; Gonzalez-Pombo *et al.*, 2008). Recenti studi hanno dimostrato e quantificato la sintesi di questi aromi, tanto che propongono di affiancare questa specie a *S. cerevisiae*, mediante la formulazione di un unico starter commerciale (Parapaloli *et al.*, 2010).

Diversamente dalle altre specie, *Zigosaccharomyces* spp., è stato maggiormente ritrovato in corrispondenza del 13° giorno di micro fermentazioni confermandone la buona tolleranza all'alcool etilico e all'anidride solforosa (Vincenzini *et al.*, 2005). Diverse specie ascrivibili a questo genere, tra cui *Z. bailii* e *Z. rouxii*, se presenti nel mosto possono arricchirne il bouquet aromatico nei primi giorni di fermentazione, mentre con l'aumentare della concentrazione di etanolo, il relativo stress fisiologico determina un aumento di acido acetico nonché possibili odori sgradevoli (Martorell *et al.*, 2007).

Tra le specie riscontrate con la più bassa percentuale d'isolamento rispetto al totale delle colture identificate emergono *C. vini* e *P. guilliermondii*. Esse sono state rilevate nei mosti tal quale e nelle fasi iniziali delle micro-fermentazioni; hanno caratteristiche fisiologiche molto simili fra loro, entrambe presentano una ridotta o assente capacità di fermentare gli zuccheri (Vincenzini *et al.*, 2005) oltre che una scarsa tolleranza all'etanolo ed all'anidrite solforosa (Heard e Fleet, 1988; Gao e Fleet, 1988; Erten, 2002). Un'altra caratteristica comune ad entrambe le specie è la produzione di fenoli volatili, tra cui i più importanti risultano il 4-etil-fenolo e il 4-etil-guaicolo, responsabili di

importanti difetti olfattivi nei vini (Jolly *et al.*, 2006; Fugelsang e Edwards, 2007). Inoltre tali specie, sviluppandosi in presenza di ossigeno sulla superficie dei vini in affinamento, sono responsabili di una delle più frequenti alterazioni, la “fioretta”. La relativa ossidazione dell’etanolo, della glicerina e degli acidi non volatili produce elevate concentrazioni di acetaldeide, di acetato di etile ed esteri inficiando la qualità organolettica dei vini.

La specie *K. thermotolerans* è stata riscontrata esclusivamente nel mosto ottenuto dal vigneto di Mazara Nord. Tale specie è caratterizzata da una moderata tolleranza all’alcol etilico (7,50 % v/v di etanolo), da una scarsa produzione di acido acetico (inferiore a 0.25 g/l), da una bassa o assente produzione di off-flavour e dalla capacità di convertire l’acido malico in acido L-lattico. Soprattutto sulla base di questo ultimo carattere di qualità, diversi studi hanno approfondito il ruolo di tale specie in ambito enologico. Kapsopoulou *et al.*, nel 2005, hanno proposto uno starter commerciale composto dalle specie *K. thermotolerans* e *S. cerevisiae*.

Dunque, le differenze quali-quantitative riscontrate nella comunità blastomicetica tra i diversi vigneti risultano evidenti. Ciò consolida l’idea che il “terroir” influisca sul profilo sensoriale di un vino anche a livello microbico (Renouf *et al.*, 2006).

La possibilità di legare maggiormente l’identità di un vino alla propria zona di origine ha spinto numerosi produttori ad abbandonare l’impiego di starter commerciali, isolati altrove, affidandosi a delle fermentazioni spontanee con il rischio di una notevole incostanza qualitativa del prodotto finito. Pertanto, è

possibile ritenere che una fermentazione condotta da una coltura starter di lievito indigeno, impiegata nel medesimo areale d'isolamento, possa condurre a dei risultati enologici migliori rispetto ad una fermentazione spontanea o all'impiego di uno starter commerciale di altra origine geografica.

In tal senso, la seconda parte del lavoro è stata specificatamente indirizzata verso la caratterizzazione molecolare e tecnologica di ceppi indigeni di *S. cerevisiae*, ottenendo così una ceppoteca costituita da 17 diversi biotipi, con differenti capacità fermentative.

La presente ricerca, allo stato attuale dei risultati, può rappresentare uno studio iniziale per l'identificazione della mappa dell'ecologia blastomicetica della cultivar Grillo. Per quest'ultimo scopo, sarebbero necessarie analisi e monitoraggi di numerose altre zone vitate oltre che del processo produttivo del vino Marsala DOC, in tutte le fasi di vinificazione e per più anni consecutivi. Quanto all'ottenimento di uno starter autoctono, sono stati selezionati numerosi ceppi dalle interessanti caratteristiche tecnologiche che, ad oggi, se pur testati solo *in vitro*, garantiscono un loro futuro impiego in vinificazioni sperimentali, nonché un possibile utilizzo su scala aziendale.

5. Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche pedoclimatiche delle zone di campionamento

	Triglia Scaletta	San Nicola	Tre Fontane	Madonna Paradiso	Pispisia	Musciuleo	Mothia	Mazara del Vallo Nord	Mazara del Vallo Sud
Altitudine	10	100	5	180	15	200	50	50	20
Esposizione	nord-sud	nord-est	sud-ovest	nord-est	est-ovest	est-ovest	est-ovest	nord-est	nord-est
Suolo	terre rosse	limoso	sabbioso	argilloso	sabbioso	argilloso	sabbioso	argilloso	argilloso
Età del vigneto (anni)	10	20	30	90	25	3	15	10	15
Biotipo Grillo	A	B	B	B	B	B	B	A	A
Sistema di allevamento	cts ^a	cts	cts	alberello	cts	cts	cts	cts	cts
Vigoria vegetativa	elevata	media	bassa	elevata	elevata	bassa	media	elevata	elevata
Potatura	guyot	guyot	guyot	guyot	guyot	guyot	guyot	guyot	guyot
Potatura verde	si	no	no	no	no	no	no	si	si
Produzione Kg uva/pianta	10	15	12	5	6	4	3	12	10
Stato fitosanitario	buono	cattivo	buono	ottimo	buono	buono	buono	buono	buono
Irrigazione	si	si	no	no	no	no	no	no	si
Vicinanze zone boschive	no	si	no	no	si	no	si	no	no

^a Controspalliera

Tabella 2. Identificazione molecolare degli isolati della microflora blastomicetica

Codice isolato	PA ^a	Genere/specie di lievito	Identità (%) in BlastN
cs3	400	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	99
cs15	500	<i>Candida vini</i>	99
cs27	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
cs52	780	<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	95
cs72	850	<i>Torulospora</i> spp.	96
cs96	800	<i>Torulospora delbrueckii</i>	100
cs74	700	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	100
cs40	600	<i>Pichia guilliermondii</i>	100

^a PA, prodotto di amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA

Tabella 3. Specie di lieviti identificate nelle diverse zone di campionamento

Zona di campionamento	Numero totale di isolati	Genere/specie di lievito (numero di isolati)
Pispisia	16	<i>M. pulcherrima</i> (4), <i>S. cerevisiae</i> (1), <i>Zygosaccharomyces</i> spp. (2), <i>Torulospora</i> spp. (6), <i>T. delbrueckii</i> (2), <i>P. guilliermondii</i> (1)
Trefontane	6	<i>M. pulcherrima</i> (1), <i>C. vini</i> (3), <i>T. delbrueckii</i> (2)
Mothia	7	<i>Zygosaccharomyces</i> spp. (5), <i>Torulospora</i> spp. (1), <i>T. delbrueckii</i> (1)
Mad. Paradiso	7	<i>M. pulcherrima</i> (5), <i>Torulospora</i> spp. (1), <i>T. delbrueckii</i> (1)
Mazara Nord	11	<i>M. pulcherrima</i> (1), <i>Zygosaccharomyces</i> spp. (1), <i>Torulospora</i> spp. (2), <i>T. delbrueckii</i> (6), <i>K. Thermotolerans</i> (1)
Mazara Sud	7	<i>M. pulcherrima</i> (1), <i>C. vini</i> (1), <i>Zygosaccharomyces</i> spp. (2), <i>T. delbrueckii</i> (3)
Musciuleo	6	<i>S. cerevisiae</i> (1), <i>Zygosaccharomyces</i> spp. (1), <i>Torulospora</i> spp. (1), <i>T. delbrueckii</i> (2), <i>P. guilliermondii</i> (1)
Triglia Scaletta	5	<i>Zygosaccharomyces</i> spp. (1), <i>Torulospora</i> spp. (1), <i>T. delbrueckii</i> (3)
San Nicola	3	<i>T. delbrueckii</i> (3)

Tabella 4. Specie/genere di lieviti in funzione della sorgente d'isolamento

Codice isolato	Specie/genere	PA ^a	Sorgente di isolamento
cs12	<i>Candida vini</i>	500	mosto t.q.
cs15	<i>Candida vini</i>	500	mosto t.q.
cs17	<i>Candida vini</i>	500	mosto t.q.
cs53	<i>Candida vini</i>	500	microferm. (3°g)
cs74	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	700	mosto t.q.
cs3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs10	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs24	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs83	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs84	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs85	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs86	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs87	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs35	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	mosto t.q.
cs51	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	microferm. (3°g)
cs62	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	microferm. (3°g)
cs61	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	microferm. (3°g)
cs40	<i>Pichia guilliermondii</i>	600	mosto t.q.
cs46	<i>Pichia guilliermondii</i>	600	microferm. (3°g)
cs27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	mosto t.q.
cs71	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	mosto t.q.
cs81	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	mosto t.q.
cs75	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	mosto t.q.
cs76	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	mosto t.q.
cs78	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	mosto t.q.
cs33	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	mosto t.q.
cs49	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs50	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs44	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs47	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs63	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs64	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs54	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs55	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs56	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs60	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (3°g)
cs96	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs97	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs123	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs118	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs99	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs103	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs104	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs126	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	microferm. (13°g)
cs31	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs36	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs73	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs72	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs34	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs68	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs70	<i>Torulasporea spp.</i>	850	mosto t.q.
cs115	<i>Torulasporea spp.</i>	850	microferm. (13°g)
cs117	<i>Torulasporea spp.</i>	850	microferm. (13°g)
cs114	<i>Torulasporea spp.</i>	850	microferm. (13°g)
cs100	<i>Torulasporea spp.</i>	850	microferm. (13°g)
cs107	<i>Torulasporea spp.</i>	850	microferm. (13°g)
cs122	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (13°g)
cs82	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs28	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs30	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs65	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs67	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs69	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	mosto t.q.
cs52	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (3°g)
cs116	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (13°g)
cs93	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (13°g)
cs113	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (13°g)
i cs89	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	780	microferm. (13°g)

^a Prodotto di amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA

Tabella 5. Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* isolati dalle microfermentazioni (21° giorno)

Codice isolato	Sorgente di isolamento ^a	Zona di campionamento	PA ^b	Specie di lievito	Biotipo
cs127	mMGR1	Mothia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp1
cs128	mMGR1	Mothia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp2
cs129	mMGR1	Mothia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp3
cs182	mMGR1	Mothia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp3
cs161	mMGR1	Mothia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp3
cs136	mMGR4	Mazara del Vallo Sud	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp4
cs179	mMGR4	Mazara del Vallo Sud	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp4
cs180	mMGR4	Mazara del Vallo Sud	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp4
cs162	mMGR4	Mazara del Vallo Sud	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp4
cs133	mMGR3	Mazara del Vallo Nord	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp5
cs134	mMGR3	Mazara del Vallo Nord	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp6
cs154	mMGR3	Mazara del Vallo Nord	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp7
cs155	mMGR3	Mazara del Vallo Nord	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp8
cs160	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp9
cs148	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp9
cs153	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp10
cs177	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp11
cs178	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp12
cs46	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp13
cs71	mMGR2	Pispisia	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp14
cs139	mMGR5	Triglia scaletta	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp15
cs165	mMGR5	Triglia scaletta	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp15
cs147	mMGR8	Madonna paradiso	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp16
cs27	mMGR9	Musciuleo	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scgrcp17

^a mMGR, microfermentazioni (21° giorno) ottenute con i mosti di uva Grillo

^b PA, prodotto di amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA

Figura 1. Areale di produzione del Marsala D.O.C. soggetto a campionamento.



Figura 2. Profili di amplificazione del gene 5.8S-ITS rRNA.

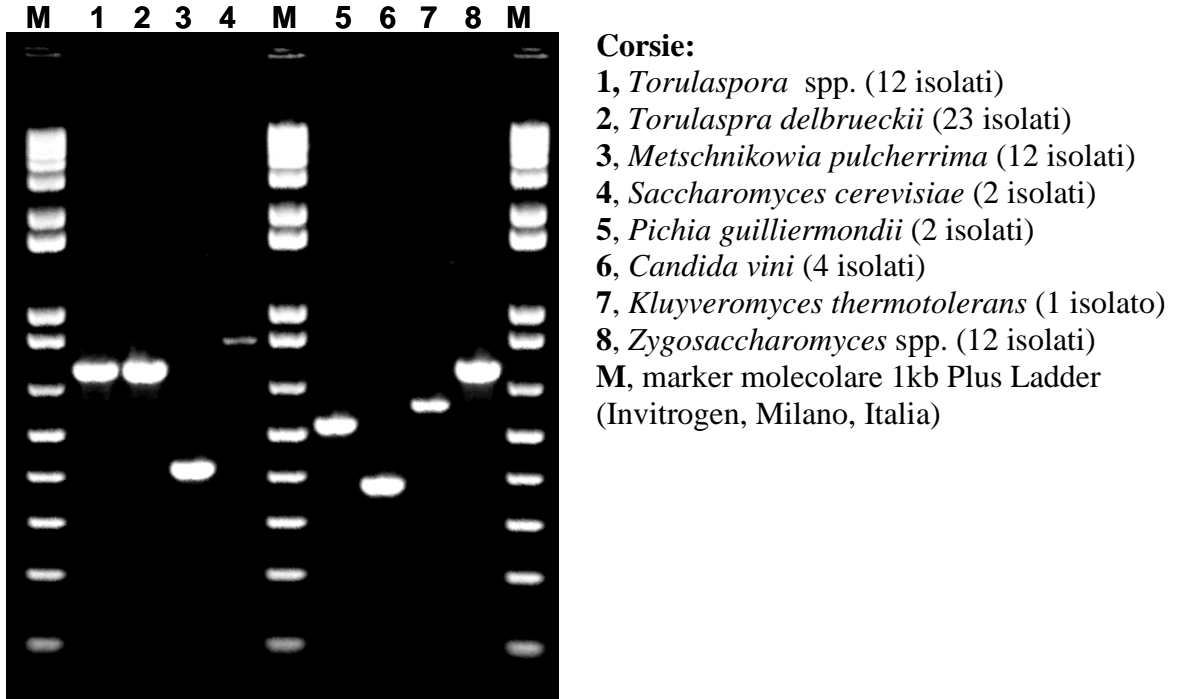


Figura 3. Composizione della comunità blastomicetica in funzione delle specie di lievito.

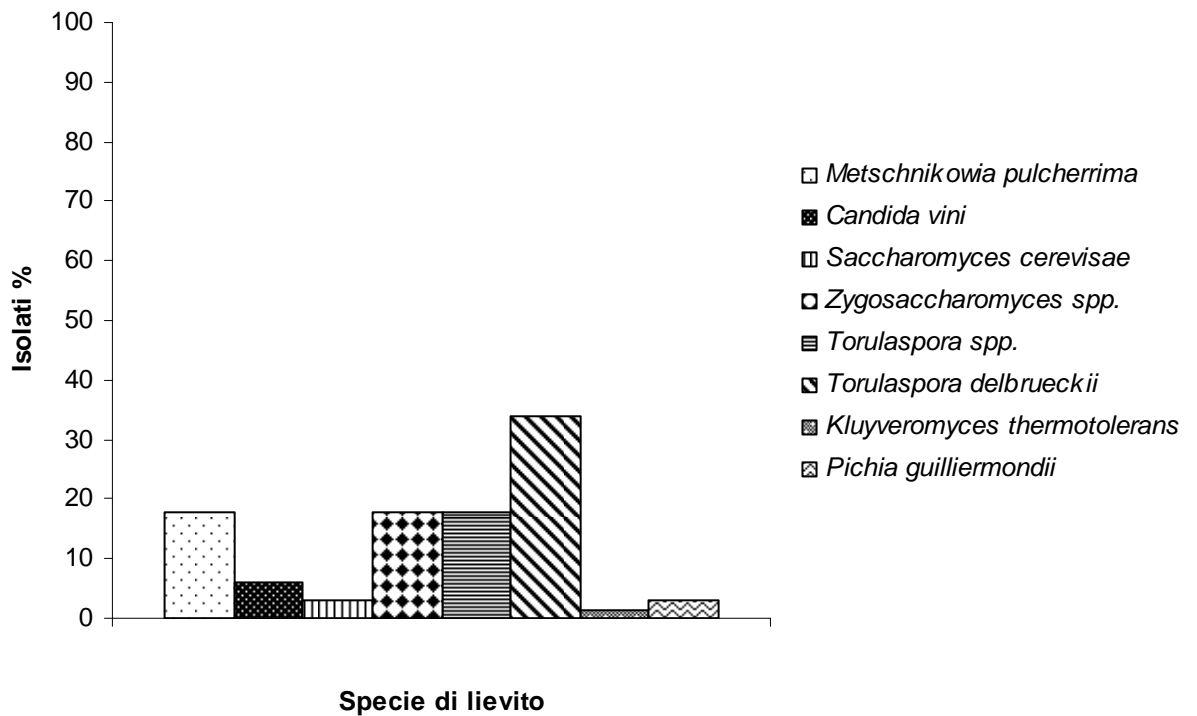


Figura 4. Composizione della comunità blastomicetica in funzione delle zone di campionamento.

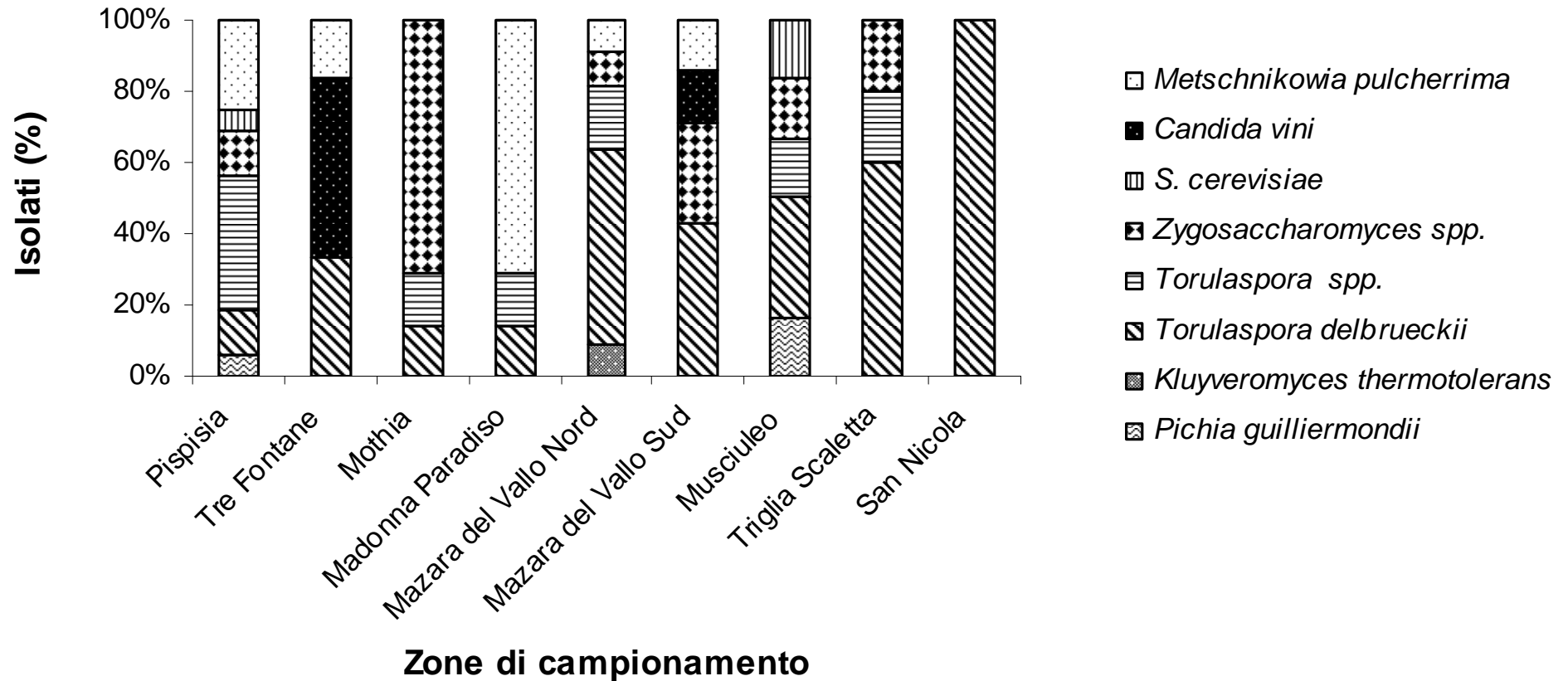


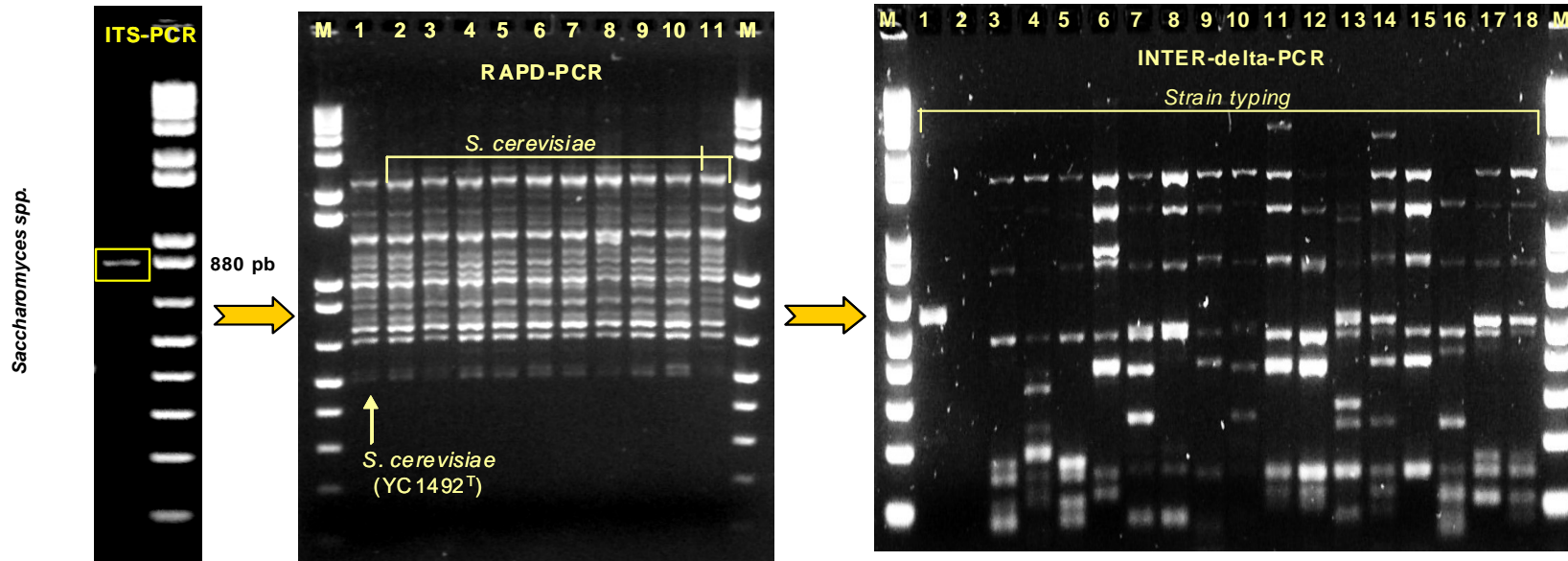
Figura 5. Identificazione molecolare e strain typing di *Saccharomyces cerevisiae*.**Fig. 5a**
5.8S-ITS
PCR**Fig. 5b.** Esempi di profili RAPD-PCR
ottenuti con i primer XD4, XD5 e M13
Corsi:
M, marker molecolare 1kb Plus Invitrogen
1, ceppo tipo *S. cerevisiae* YC1492^T
2-11, isolati di *S. cerevisiae***Fig. 5c.** Profili interdelta-PCR ottenuti con i primer delta12-delta21.
Corsi:
M, marker molecolare 1kb Plus Invitrogen
1-18, ceppi di *S. cerevisiae*

Figura 6. Distribuzione dei ceppi di *S. cerevisiae* nelle diverse zone di campionamento.

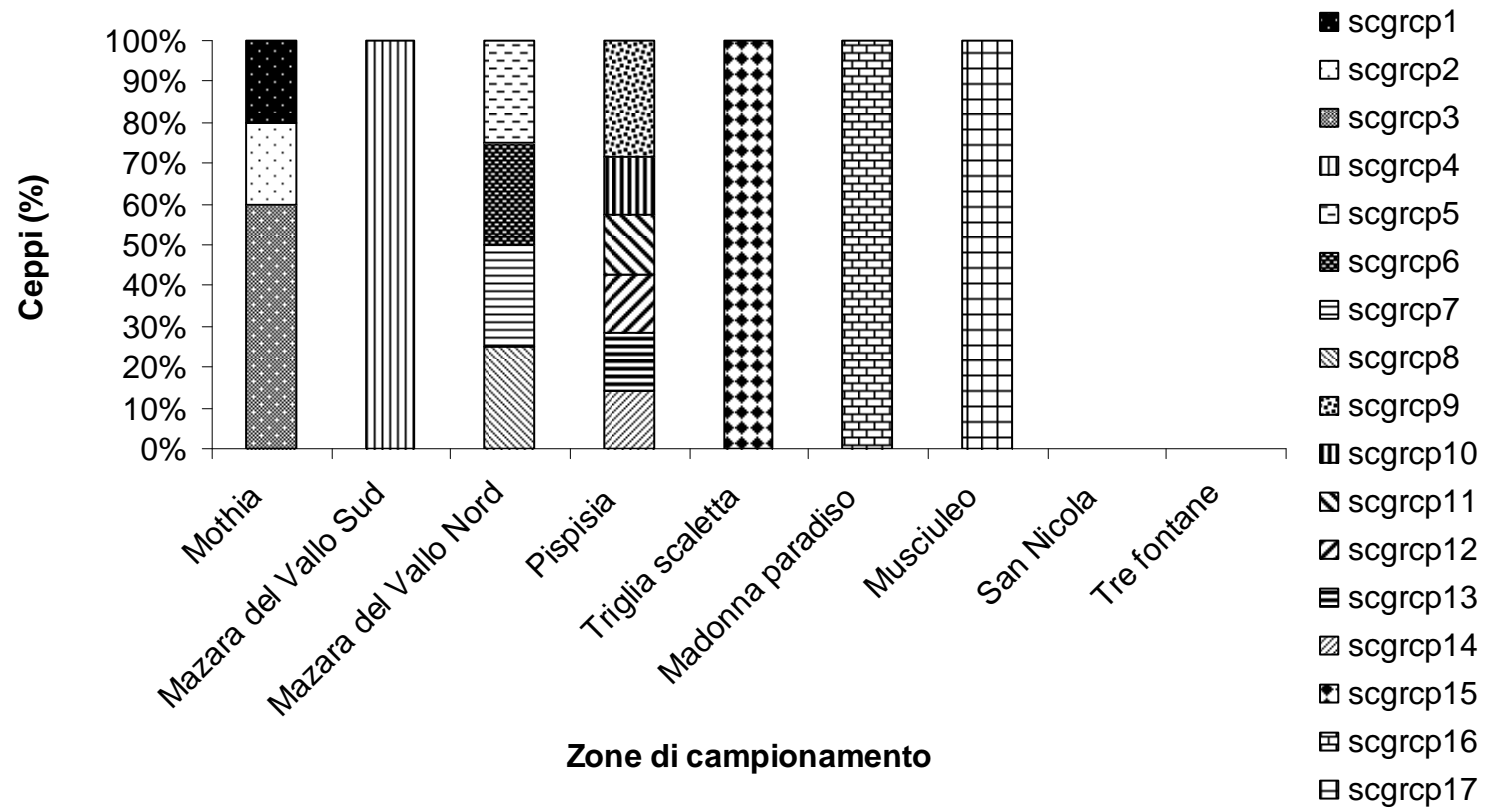


Figura 7. Monitoraggio del calo peso delle microfermentazioni condotte a 17°C e in presenza di 0,10 mg/ml di MBSK.

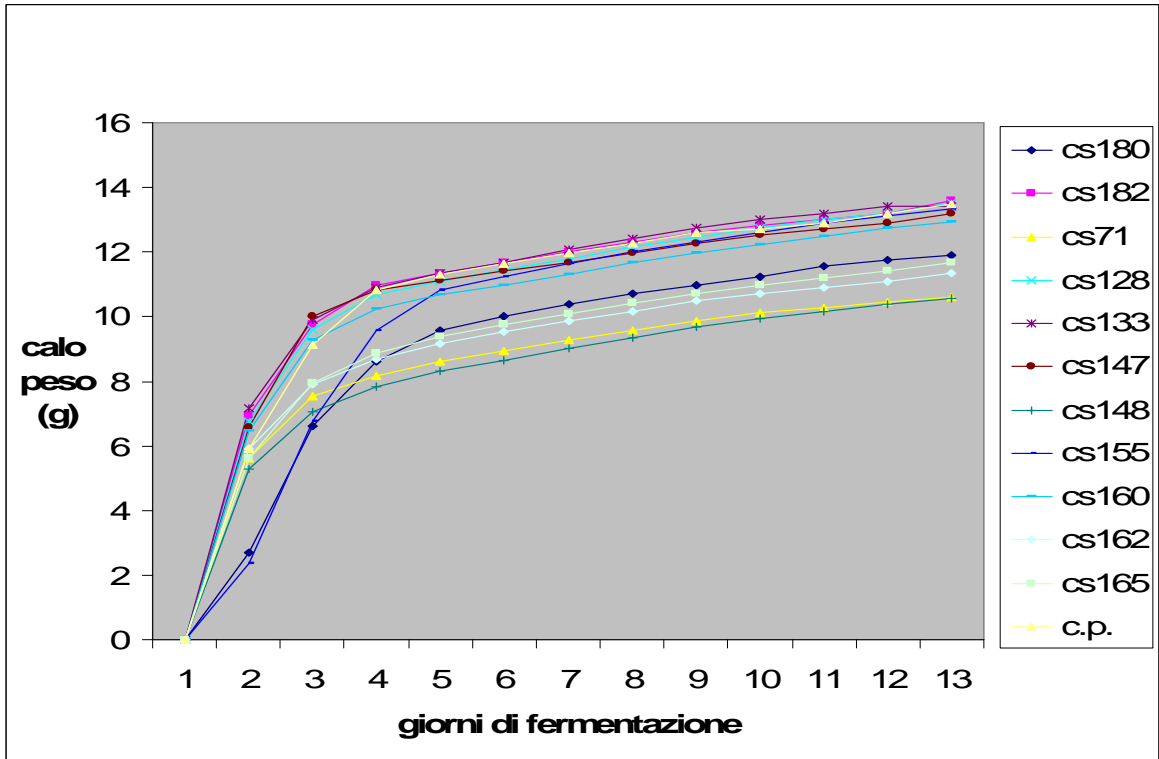


Figura 8. Monitoraggio del calo peso delle microfermentazioni condotte a 17°C e in presenza di 0,20 mg/ml di MBSK.

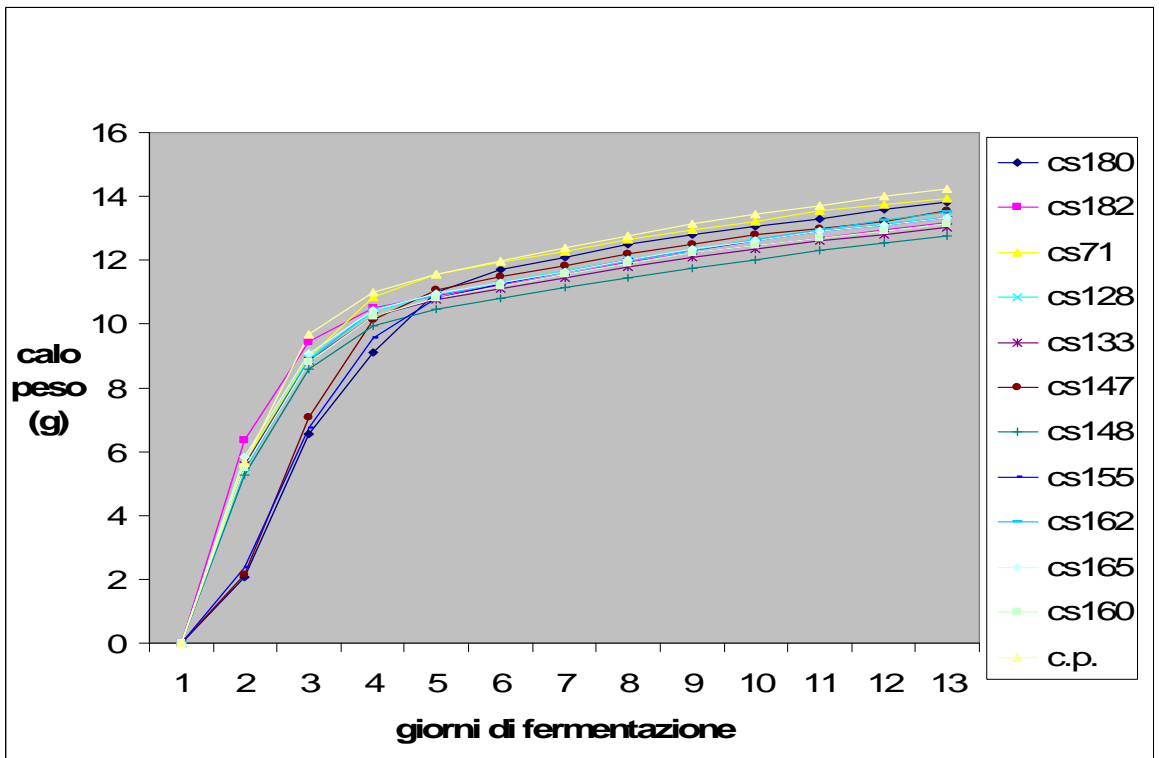


Figura 9. Monitoraggio del calo peso delle microfermentazioni condotte a 13°C e in presenza di 0,10 mg/ml di MBSK.

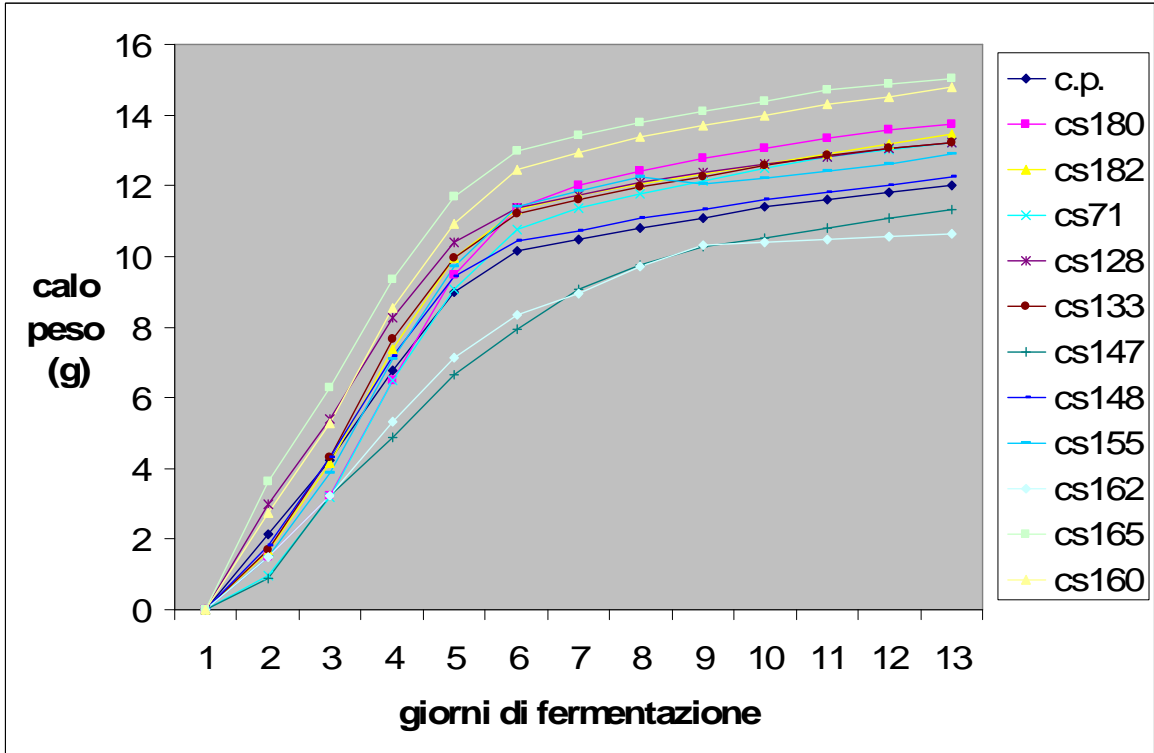
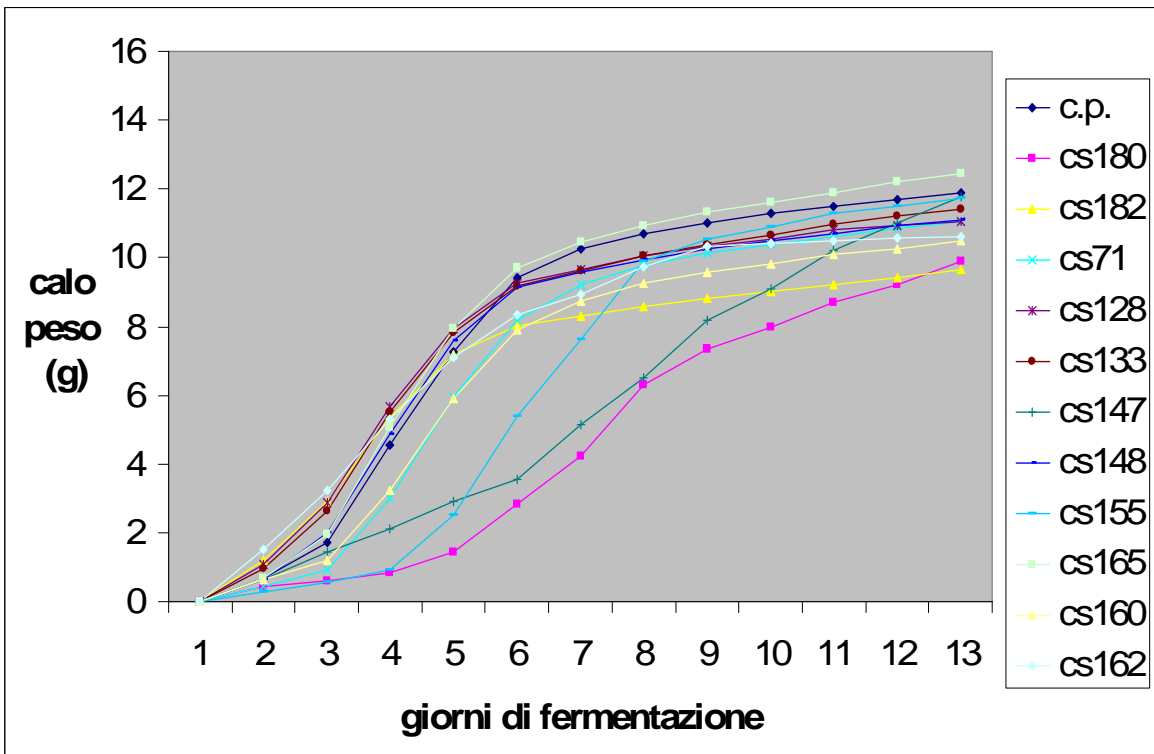


Figura 10. Monitoraggio del calo peso delle microfermentazioni condotte a 13°C e in presenza di 0,20 mg/ml di MBSK.



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.
- Cabrera M. J., Moreno J., Ortega J. M., Medina M. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39: 283-287.
- Castelli T. (1954). Les agents de la fermentation vinaire. *Archives of Microbiology*, 20: 323.
- Cavazza A., Grando M. S., Zini C. (1992). Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. *Vignevini*, 9: 17-20.
- Ciani M., Maccarelli F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 199-203.
- Ciani M., Picciotti G. (1995). The growth-kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17: 1247-1250.
- Delfini C. (1995). *Scienza e Tecnica di Microbiologia Enologica*. 1^a Edizione. Casa Editrice Il Lievito, Asti.
- 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*, 8: 377-382.
- Esteve-Zarzoso. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E., 2000. RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.
- Fleet G. H., Lafon-Lafourcade S., Ribereau-Gayon P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 1034-1038.
- Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Aponte M., Settanni L., Moschetti G. (2010). Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 337-351.
- Fugelsang K. C., Edwards C. G. (2007). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*, second ed. Springer Science and Business Media, New York.
- Gao C., Fleet G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 405-409.
- Gonza P., Pombo L., Perez G., Carrau F., Guisan J.M., Batista-Viera F., Brena B. M.. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular *b*-glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30:1469-1475.
- 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.
- Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*, 107: 1064-1077.
- 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 sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 313-318.
- Jolly N. P., Augustyn O. P. H., Pretorius I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27: 15-39.

- Kapsopoulou K., Kapaklis A., Spyropoulos H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:1599-1602.
- Legras J.L., Karst F.(2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 323-328.
- Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernandez-Espinar M.T., Querol A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 234-242.
- Moreno J. J., Millán C., Ortega J. M., Medina M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 7: 181-189.
- Mortimer R.K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M. (1994). Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, 10: 1543-1552.
- O'Donnel K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds D. R., Taylor J. W. (eds) *The fungal anamorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB international, Wallingford, pp 225-233.
- 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 Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 198-203.
- Parapaloli M., Hatziloukas E., Drainas C., Perisynakis A. (2010). The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine Xavour. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37: 85-93.
- Peynaud E. (1956). Sur la formation d'acétate d'éthyle par les levures de vin. *Industries Agricoles et Alimentaires*, 73: 253-257.
- 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.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 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.
- Renault F., Miot-Sertier C., Marullo P., Hernandez-Orte P., Lagarrigue L., Lonvaud-Funel A., Bely M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 201-210.
- Raspor P., Milek D. M., Polanc J., Mozina S. S., Čadež N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.*, 109: 97-102.
- Renouf V., Miot-Sertier C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A. (2006). The wine microbial consortium: a real terroir characteristic. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40: 209-216.
- Schütz M., Gafner J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 551-558.
- Tofalo R., Chaves-López C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high, sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 179-187.
- 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.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3521-3529.

- Viana F., Gil J. V., Genovés S., Vallés S., Manzanares P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25: 778-785.
- Vincenzini M., Romano P., Farris G.A., (2005). *Microbiologia del vino*, Casa Editrici Ambrosiana, Milano.
- 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*. A cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali, Ed. Calderini Ed. Agricole.

CAPITOLO III

“La diffusione ambientale di lieviti vinari e di muffe potenzialmente fitopatogene attraverso la migrazione degli uccelli in Sicilia”

Il lavoro riportato in questo capitolo è in procinto di sottomissione alla seguente rivista:

FEMS Microbiology Ecology

“Dissemination of oenological yeasts and potential phytopatogenic moulds through bird migration in Sicily”

Nicola Francesca, Emanuela Canale, Luca Settanni, Antonio Alfonzo, **Ciro Sannino**, Paolo Lucido, Santella Burruano, Bruno Massa, Giancarlo Moschetti

Abstract

The composition of yeast communities on grapes, then into musts, depends on several factors, including geographical location of the vineyard, type of soil, age of the vineyard, grapevine variety and harvesting technique. Moreover, insects and birds were in part responsible for the dissemination of fermentative yeasts and phytopathogenic moulds during their feeding. In order to evaluate the dissemination of fermenting yeasts and phytopathogenic moulds, migrating birds were caught and ringed in four experimental sites: “Riserva Naturale Integrale Lago Preola e Ghorghi Tondi” (Mazara del Vallo, TP) and the Sicilian islands of Lampedusa, Ustica and Linosa. These sites represent important stop-over for migrating birds. A total of 349 birds were captured with a Mist-nets placed in the proximity of woody areas in each site of ringing. Bird species more frequently caught were *Sylvia cantillans*, *Sylvia borin*, *Muscicapa striata*, *Saxicola rubetra* and *Hippolais icterina*. Bird cloacae were plugged with sterile cotton swabs and streaked onto Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar for yeast isolation and onto malt extract agar for the isolation of fungi. Microbial isolates were collected as follows: 125 yeasts and 2702 moulds.

Yeast identification was preliminary carried out by enzymatic digestion of 5.8S-ITS rRNA region and, subsequently, by D1/D2 region of the 26S rRNA gene sequencing. *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida inconspicua*, *Candida* spp., *Candida stellimalicola*, *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus magnus*, *Debaromyces hansenii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricola*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula mucilaginosa*,

Saccharomyces cerevisiae and *Sporisorium penniseti* were recognized. Moulds were subjected to dichotomous key analysis that identified 15 species:

Alternaria alternata, *Aspergiullus flavus*, *Aspergiullus niger*, *Aspergiullus ochraceus*, *Aspergiullus versicolor*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Phoma glomerata*, *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus stolonifer*.

Furthermore, the study was focused on the 18 *Saccharomyces cerevisiae* isolates that were typed at strain level by interdelta-PCR, multiplex-PCR and minisatellites-PCR. The strains of *S. cerevisiae* were characterized for technological traits with interest in wine production such as hydrogen sulphide production, ethanol and potassium metabisulphide resistance. Strains showing the best performances were used to carry out sterile must micro-fermentations to select yeast starter cultures.

To our knowledge, this research showed a new finding regarding the ecology of vineyards: for the first time it has been proved that *Saccharomyces cerevisiae* strains can be disseminated by migrating birds. Among them some strains with oenological potential were found.

Keywords: Migratory birds; Sicily; Wine yeasts; *Sacharomyces cerevisiae*; Phytopathogenic moulds.

Riassunto

La struttura della comunità blastomicetica presente sulle uve, e quindi nei mosti, dipende da numerosi fattori tra cui la posizione geografica e l'età del vigneto, la tipologia del suolo, la cultivar e le tecniche di raccolta delle uve. In aggiunta, gli insetti così come gli uccelli, durante la loro attività di alimentazione, possono rappresentare dei veicoli di lieviti vinari e di muffe fitopatogene. Con lo scopo di valutare la diffusione ambientale di questi funghi, sono stati catturati ed inanellati uccelli migratori in corrispondenza di 4 siti sperimentali: la "Riserva Naturale Integrale Lago Preola e Ghorghi Tondi" (Mazara del Vallo, TP) (sito densamente vitato con la cultivar Grillo), l'isola di Ustica, l'isola di Lampedusa e l'isola di Linosa. I suddetti siti rappresentano degli importanti luoghi di sosta per gli uccelli migratori.

Sono stati catturati un totale di 349 uccelli utilizzando delle "reti foschia" (Mist-nets) posizionate in prossimità delle aree boschive in ciascuno dei siti d'inanellamento. Le specie di uccelli maggiormente catturate sono state: *Sylvia cantillans*, *Sylvia borin*, *Muscicapa striata*, *Saxicola rubetra* e *Hippolais icterina*. L'isolamento dei lieviti e delle muffe è stato realizzato strisciando i tamponi cloacali, rispettivamente, su Laboratory (WL) nutrient agar e su agar malto. In totale sono stati isolati 125 lieviti e 2702 muffe. I primi sono stati identificati mediante digestione enzimatica del gene 5.8S-ITS rRNA e successivo sequenziamento della regione D1/D2 del gene 26S rRNA ottenendo le seguenti specie: *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida inconspicua*, *Candida* spp., *Candida stellimalicola*, *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus magnus*,

Debaromyces hansenii, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricola*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pseudozyma aphidis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Sporisorium penniseti* were recognized.

Le muffe, invece, sono state identificate attraverso l'analisi delle chiavi dicotomiche ottenendo un totale di 15 specie: *Alternaria alternata*, *Aspergiullus flavus*, *Aspergiullus niger*, *Aspergiullus ochraceus*, *Aspergiullus versicolor*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Phoma glomerata*, *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus stolonifer*.

Inoltre, il presente studio è stato incentrato sulla caratterizzazione molecolare e tecnologica di tutti gli isolati di *S. cerevisiae*. Tali colture sono state geneticamente discriminate fra loro impiegando diverse tecniche molecolari: interdelta-PCR, multiplex-PCR e minisatellities-PCR. I ceppi così ottenuti sono stati valutati per la loro capacità di produrre idrogeno solforato e di resistere all'etanolo e all'anidride solforosa. I ceppi che hanno mostrato particolare attitudine tecnologica sono stati, successivamente, inoculati in mosti d'uva per la valutarne le relativa capacità di portare a termine una microfermentazione alcolica, allestita in condizioni sperimentali. Tre ceppi di *S. cerevisiae* isolati da uccelli migratori hanno presentato delle caratteristiche tecnologiche superiori a quelle mostrate da un ceppo commerciale di *S. cerevisiae*, impiegato come controllo.

Questo studio fornisce delle nuove informazioni sull'ecologia dei funghi legati al mondo viticolo ed enologico. Per la prima volta sono stati isolati, da uccelli migratori, lieviti vinari dalle interessanti caratteristiche tecnologiche.

Parole chiave: Uccelli migratori; Sicilia; Lieviti vinari; *Sacharomyces cerevisiae*;
Muffe fitopatogene

1. Introduzione

L'ecologia microbica associata agli uccelli ha rappresentato l'oggetto di diverse lavori in campo microbiologico (Maul *et al.*, 2005). Negli ultimi anni l'interesse verso questo tipo di ricerche è aumentato, lo scopo è quello di valutare lo stato di salute e/o il rischio di malattie degli uccelli (Silvanose *et al.*, 2001), cosa che potrebbe avere una limitata rilevanza ecologica, ma soprattutto approfondire la conoscenza sulle infezioni umane veicolate dagli uccelli (Omenn, 2010; Tsiodras *et al.*, 2008). È stato dimostrato che gli uccelli selvaggi, incluso le specie migratorie, possono essere dei vettori, anche a lunga distanza, di microrganismi patogeni trasmissibili all'uomo (Nuttall, 1997). Particolare attenzione è stata rivolta alla diffusione di batteri attraverso gli uccelli migratori. D'altra parte pochi studi sono stati incentrati sulla diffusione di lieviti e muffe ad opera di uccelli migratori (Cafarchia *et al.*, 2006; Jansson *et al.*, 2008).

Poiché questi animali fungono da vettori di microrganismi, l'analisi della microflora da essi trasportata può essere importante per valutare la diversità microbica degli habitat da essi visitati.

In tal senso, Francesca *et al.* (2010) hanno recentemente indagato sulla diffusione di lieviti enologici attraverso gli uccelli (sedentari) frequentatori di un vigneto, principalmente attraverso tordi (*Turdus merula*). Con il medesimo scopo, gli stessi autori hanno esaminato uccelli migratori senza però riscontrare la presenza di lieviti tecnologicamente interessanti.

Inoltre, ad oggi non è presente nessun dato sulla persistenza (temporale) di un lievito presente nella faringe o nella cloaca di un uccello e quindi nessun dato è disponibile sulla

“durata” della diffusione ambientale dei funghi ad opera di uccelli.

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di isolare, identificare e caratterizzare lieviti d'interesse enologico e muffe potenzialmente fitopatogene veicolati da uccelli migratori per ottenere nuove informazioni sull'ecologia dei funghi, fornire ulteriori informazioni sul reale rapporto lieviti autoctoni-sorgente d'isolamento e caratterizzare lieviti di particolare rilevanza tecnologica isolati da habitat/sorgenti ad oggi non indagate.

2. Materiali e metodi

2.1. Siti di campionamento e analisi degli uccelli

Il presente lavoro è stato svolto in collaborazione col “Progetto Piccolo Isole” della regione Sicilia (Italia). Grazie al supporto di esperti ornitologi, gli uccelli sono stati catturati durante la loro migrazione in quattro siti di inanellamento presenti in Sicilia: la Riserva Naturale Integrale Lago Preola e Gorgi Tondi (Mazara del Vallo, TP), l'isola di Lampedusa, l'isola di Ustica e l'isola di Linosa. Tali siti rappresentano dei luoghi importanti per la sosta degli uccelli durante il periodo migratorio, sia estivo che invernale. La Riserva Naturale Integrale Lago Preola e Gorgi Tondi, rispetto agli tre siti d'inanellamento, risulta densamente vitata con elevata presenza della cultivar Grillo.

Gli uccelli sono stati catturati attraverso delle specifiche reti denominate mist-nets (reti foschia) a quattro tasche, alte 3 m e lunghe 12 m, posizionate in prossimità delle aree boschive in ciascuno dei siti di inanellamento. La cattura degli uccelli è avvenuta nel rispetto delle norme specificate dall'“Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale” (ISPRA). Tutti gli uccelli catturati sono stati rapidamente inanellati, identificati a livello di specie attraverso un'analisi delle caratteristiche fenotipiche (Mullarney *et al.*, 1999) classificati in base alla relativa strategia di migrazione (migratori trans-sahariani o parziali o irregolari) (Svensson *et al.*, 1992) e soggetti ad una valutazione visiva del grasso sub-cutaneo addominale (GSA) (Kaiser, 1993; Bairlein, 1995). Immediatamente dopo le analisi, gli uccelli sono stati liberati nelle vicinanze dei relativi siti di cattura.

Gli uccelli sono stati analizzati per la rilevazione della presenza di colture di lieviti e muffe seguendo la procedura descritta da Cafarchia *et al.* (2006). Specificatamente, sono stati effettuati dei tamponi cloacali i quali sono stati successivamente strisciati su due diversi substrati: Wallerstein Laboratory (WL) nutrient agar (Oxoid, Milano, Italia) addizionato con cloramfenicolo (0,5 g/L) e bifenile (1 g/L); malt extract (ME) agar (Oxoid) addizionato di cloramfenicolo (0,5 g/L). Le piastre così ottenute sono state incubate per 2-4 giorni a 28 ± 2 °C. Tutte le analisi sono state eseguite in doppio.

2.2. Isolamento e identificazione dei funghi

Sulla base della morfologia del micelio o della colonia, gli isolati sono stati suddivisi in due gruppi: muffe e lieviti. Tutte le colture isolate sono state successivamente purificate su ME agar.

Le muffe sono state raggruppate sulla base di caratteri fenotipici e successivamente identificate a livello di specie attraverso l'impiego delle chiavi dicotomiche così come descritto da Barnett e Barry (1998).

Gli isolati blastomicetici sono stati identificati attraverso metodiche genotipiche. Il DNA delle cellule è stato estratto impiegando il kit InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Per ottenere una prima differenziazione dei lieviti, tutti gli isolati sono stati sottoposti ad una restrizione per via enzimatica del gene 5.8S-ITS rRNA per valutarne i relativi polimorfismi (restriction fragment length polymorphism -RFLP- analysis). La regione oggetto della restrizione è stata amplificata impiegando la coppia di primer ITS1/ITS4 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999) mediante l'utilizzo di un termocicizzatore T1 (Biometra, Göttingen, Germania). Gli ampliconi così ottenuti sono stati digeriti con le seguenti endonucleasi di restrizione: *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germania) e mantenuti a 37 °C per circa 8 ore. Tutti gli isolati presuntivamente ascrivibili al genere *Hanseniaspora* sono stati ulteriormente digeriti con l'enzima di restrizione *DdeI* (MBI Fermentas). I prodotti di amplificazione ITS così come i relativi frammenti di digestione sono stati caricati su un gel di agarosio a due diverse concentrazioni: 1.5 e 3% (p/v) realizzati in tampone 1× TBE (89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8). Il gel è stato addizionato di SYBER safe DNA gel stain (Invitrogen, Milano, Italia), visualizzato

attraverso un transilluminatore UV e la relativa immagine è stata acquisita attraverso Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System (BioRad, Richmond, USA). Per la quantificazione delle masse molecolari, è stato impiegato come riferimento il marcatore 1kb Plus Ladder 50 pb (Invitrogen).

Circa 3 isolati rappresentativi di ciascun gruppo (1 isolato nel caso di gruppi poco numerosi) sono stati sottoposti ad una ulteriore analisi di restrizione che avuto come gene target il 26S rRNA. Tale regione è stata amplificata impiegando la coppia di primer NL1/LR6 così come riportato da Baleiras-Couto *et al.* (2005). I prodotti di amplificazione sono stati digeriti con le endonucleasi *HinfI*, *MseI* e *ApaI* (MBI Fermentas) e visualizzati come sopra descritto.

Con lo scopo di confermare il raggruppamento ottenuto con la tecnica RFLP-ITS, un isolato per ciascun gruppo è stato ulteriormente analizzato mediante sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA, il quale è stato amplificato con l'ausilio dei primer NL1/NL4 (O'Donnell, 1993). Nei casi con risultati insoddisfacenti, è stata sequenziata la regione 5.8S-ITS rRNA, previa amplificazione con i primer ITS1/ITS4 (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). I prodotti PCR sono stati visualizzati come sopra descritto. Il sequenziamento dei prodotti di amplificazione è stato realizzato presso la PRIMM S.r.l. (Milano, Italia). Le sequenze così ottenute sono state caricate in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e analizzate mediante il programma BlastN (Altschul *et al.*, 1997).

2.3. Persistenza sperimentale di un ceppo *Saccharomyces cerevisiae* negli uccelli

Sulla base delle metodiche sopra descritte, sono stati catturati tre pettirossi (*Erithacus rubecola*) e mantenuti in condizioni di cattività per un totale di 11 giorni. Nei primi due giorni, necessari per l'adattamento all'ambiente di laboratorio, gli animali sono stati nutriti con alimenti specifici reperiti in commercio e opportunamente sterilizzati ai raggi UV, per escludere l'apporto di contaminanti microbici. In corrispondenza del terzo giorno, gli uccelli sono stati nutriti con cibo, preventivamente sterilizzato, inoculato (10^2 UFC/g) con il ceppo *S. cerevisiae* GR1 (ottenuto dalla collezione del nostro laboratorio), caratterizzato da ottime attitudini enologiche (Francesca *et al.*, 2010). Dal quarto giorno in poi, gli uccelli sono stati nuovamente nutriti con cibo trattato ai raggi UV, non inoculato. Gli uccelli sono stati sottoposti a tamponi faringei e cloacali subito dopo l'inoculo e a distanza di 1, 3, 6 e 12 ore. Dal giorno successivo all'inoculo del ceppo GR1, i tamponi sono stati effettuati ad intervalli di 12 ore per un periodo totale di 8 giorni.

Tutti i tamponi sono stati strisciati su piastre di WL agar e incubati per 48-72 ore a 28 ± 2 °C. Il monitoraggio del ceppo *S. cerevisiae* GR1 è stato effettuato comparando il profilo interdelta ottenuto dalle colonie isolate su WL agar con quello della coltura mantenuta in condizioni di purezza.

2.4. Strain typing degli isolati di *Saccharomyces cerevisiae*

La valutazione delle relazioni intraspecifiche fra gli isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae* è stata realizzata mediante un approccio genetico multiplo: analisi delle sequenze interdelta con l'impiego dei primer delta12 e delta21 (Legras e Karst,

2003); impiego di minisatelliti [Simple Sequence Repeats (SSR) analysis] per l'amplificazione (differenziata) dei geni DAN4, AGA1 e SED1 (Marinangeli *et al.*, 2004); analisi multiplex-PCR dei loci SC8132X, YOR267C e SCPTSY7 (Vaudano e Garcia-Moruno, 2007). Tutti i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati come sopra descritto.

2.5. Screening tecnologico dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

I diversi ceppi ascrivibili alla specie *S. cerevisiae* sono stati valutati per una loro possibile applicazione in campo enologico. La produzione di idrogeno solforato (H₂S) da parte dei ceppi è stata valutata sul terreno di crescita BiGGY agar (Oxoid) (Mortimer *et al.*, 1994). I ceppi caratterizzati da una bassa produzione di H₂S sono stati valutati per la loro resistenza all'etanolo, al MBSK e per la capacità di portare a termine una microfermentazione alcolica. Le metodiche seguite sono quelle riportate nel capitolo II paragrafo 2.3 della presente tesi. Le microfermentazioni sono state monitorate per 13 giorni alla temperatura di 18 °C. Tutte le analisi sono state condotte in doppio.

3. Risultati

3.1. Specie di uccelli catturate

Sono stati catturati e analizzati un totale di 349 uccelli appartenenti a 32 specie riunite in 10 famiglie. La famiglia delle Sylviidae è risultata quella con il più alto numero di individui catturati ($n = 42$): 90 capinere (*Sylvia borin*); 1 bigiarella (*Sylvia curruca*); 1 canapino (*Hippolais polyglotta*); 24 canapini maggiori (*Hippolais*

icterina); 12 cannaiole (*Acrocephalus scirpaceus*); 3 cannareccioni (*Acrocephalus arundinaceus*); 2 capinere (*Sylvia atricapilla*); 6 forapaglie (*Acrocephalus schoenobaenus*); 7 lui grosso (*Phylloscopus trochilus*); 1 lui piccolo (*Phylloscopus collybita*); 5 lui verde (*Phylloscopus sibilatrix*); 15 occhiocotti (*Sylvia melanocephala*); 8 sterpazzole (*Sylvia communis*); 40 sterpazzoline (*Sylvia cantillans*); 2 usignoli di fiume (*Cettia cetti*). Il numero di uccelli appartenenti alla famiglia Muscicapidae è stato pari a 58: 1 balia dal collare (*Ficedula albicollis*); 6 balie nere (*Ficedula hypoleuca*); 51 pigliamosche (*Muscicapa striata*).

Le specie appartenenti alla famiglia delle Turdidae ($n = 42$) sono state: 12 codirossi (*Phoenicurus phoenicurus*); 1 tordo bottaccio (*Turdus philomelos*); 1 pettirosso (*Erithacus rubecula*); 4 usignoli (*Luscinia megarhynchos*); 1 passero solitario (*Monticola solitarius*); 23 stiacchini (*Saxicola rubetra*). La famiglia delle Hirundinidae è stata rappresentata solo dalla specie rondine ($n = 12$) (*Hirundo rustica*). La famiglia delle Passeridae è stata rappresentata da 1 passera mattugia (*Passer montanus*) e 8 passere sarde (*Passer hispaniolensis*). Altri uccelli catturati sono stati: 2 averle capirosse (*Lanius senator*) per la famiglia delle Laniidae; 3 rigogoli (*Oriolus oriolus*) per la famiglia delle Oriolidae; 2 prispoloni (*Anthus trivialis*) per la famiglia delle Motacillidae; 2 cinciallegre (*Parus major*) per la famiglia delle Paridae e 2 fanelli (*Carduelis cannabina*) per la famiglia delle Fringillidae.

3.2. Isolamento e identificazione dei microrganismi

Lieviti e muffe sono stati isolati dalla cloaca di numerosi uccelli (32,66 e 56,45%, rispettivamente) inanellati nei quattro siti di cattura (Tabella 1). Soltanto il 21.21% degli uccelli analizzati ha mostrato una presenza simultanea di lieviti e muffe. Le famiglia che hanno fornito il più alto numero di uccelli positivi all'isolamento dei funghi sono state: Passerideae (44,44%), Muscicapidae (60,34%) e Turdidae (26,19%).

Quanto alle colture microbiche isolate, sono stati analizzati un totale di 125 lieviti, i quali dopo restrizione enzimatica della regione 5.8S-ITS rRNA sono stati suddivisi in 18 gruppi (Tabella 2). Tale suddivisione è stata successivamente confermata attraverso la restrizione del gene 26S rRNA effettuata sugli isolati rappresentativi dei precedenti cluster.

L'identificazione a livello di specie, ottenuta con il sequenziamento dei domini variabili D1/D2 del gene 26S rRNA, è stata possibile solo per 17 dei 18 cluster ottenuti con le sopracitate analisi di restrizione enzimatica. Gli isolati appartenenti al gruppo V, infatti, sono stati identificati solo a livello di genere a causa di una bassa identità (95%) con il genere *Candida*. Gli stessi isolati sono stati sottoposti ad un secondo sequenziamento riguardante, in questo caso, il gene 5.8S-ITS rRNA, ottenendo nuovamente un basso livello di identità (92%) con il genere *Candida* (GenBank accession number JF292448). È interessante notare che i profili RFLP-5.8S-ITS III (*Candida glabrata*), IV (*Candida inconspicua*), V (*Candida* spp.), VI (*Candida stellimalicola*), VII (*Cryptococcus aureus*), VIII (*Cryptococcus carnescens*), XII (*Issatchenkia orientalis*), XV (*Pseudozyma aphidis*), XVII

(*Saccharomyces cerevisiae*) e XVIII (*Sporisorium penniseti*) non sono mai stati riportati in letteratura scientifica (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Korabecna *et al.*, 2003; Baleiras Couto *et al.*, 2005; Raspor *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2010; Valmorri *et al.*, 2010; Ocon *et al.*, 2010).

Sulla base delle analisi svolte con le chiavi dicotomiche, un totale di 2702 muffe isolate sono state suddivise in 15 gruppi e identificate a livello di specie confrontando le caratteristiche morfo-biometriche rilevate sui nostri isolati con quelle presenti in letteratura (Barnet *et al.*, 1965; Domsch *et al.*, 1995; Von Arx *et al.*, 1974). Quindi, le specie di muffe identificate sono state: *Alternaria alternata*, *Aspergiullus flavus*, *Aspergiullus niger*, *Aspergiullus ochraceus*, *Aspergiullus versicolor*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Phoma glomerata*, *Rhizoctonia solani* e *Rhizopus stolonifer*.

3.3. Biodiversità e distribuzione delle specie fungine

Le specie di lieviti maggiormente riscontrate (Tabella 3) sono state: *H. guilliermondii* (17,60%) seguita da *C. albicans* (16,00%), *S. cerevisiae* (14,40%) e *A. pullulans* (12,00%). Tra tutti i lieviti isolati, 71 colture sono risultate ascrivibili a specie (*A. pullulans*, *D. hansenii*, *H. guilliermondii*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, *R. mucillaginosa* e *S. cerevisiae*) di interesse enologico.

La distribuzione delle varie specie di lieviti fra gli uccelli analizzati è riportata in tabella 3. Il più alto numero di isolati e specie di lieviti è stato riscontrato nei gruppi di uccelli caratterizzati da un maggior numero di individui catturati. Le specie

beccafico e sterpazzolina, infatti, hanno fornito la più alta biodiversità blastomicetica. In ogni caso, alcuni lieviti d'interesse enologico (LIE), quali *S. cerevisiae*, sono stati ugualmente distribuiti tra diverse specie di uccelli, ovvero fra beccafico, canapino maggiore, codiroso, sterpazzola, sterpazzolina e saltimpalo; mentre ben sette isolati di tale lievito sono stati ottenuti esclusivamente da pigliamosche.

Quanto alle muffe identificate nel presente lavoro (Tabella 4), le specie maggiormente rappresentate sono state: *C. herbarum* (67,77%), *A. alternata* (13,45%), *A. niger* (6,12%) e *F. oxysporum* (4,40%). Anche per questi funghi, il più alto numero di isolati e di specie sono state associate agli uccelli appartenenti ai gruppi più numerosi.

Tutte le specie di uccelli da cui sono stati isolati il più alto numero di lieviti e muffe sono caratterizzate da una strategia migratoria di tipo “trans-sahariana” (Svensson *et al.*, 1992) (vedi simbolo “•” in tabella 3 e 4).

3.4. Biodiversità dei funghi fra gli uccelli con diverse quantità di grasso sub-cutaneo

Il 58,20% del totale dei lieviti isolati e gran parte dei LIE (63,39%) sono stati isolati da uccelli aventi un valore di GSA compreso fra 0-1 (Tabella 5). Alcune specie di lievito, quali *D. hansenii*, *M. pulcherrima* e *R. mucillaginosa* sono state isolate esclusivamente da uccelli con 0-1 GSA. Inoltre, fatta eccezione per la specie *H. guilliermondii* (45,45%), le specie LIE più numerose [*A. pullulans* (66,66%) e *S. cerevisiae* (66,67%)] sono state isolate da individui con bassi valori di GSA.

Anche le specie di lieviti di interesse non enologico (LInE) (58,50%), fra cui la più numerosa è risultata *C. albicans* (55,00%), sono state isolate da uccelli con basso GSA.

Quanto alle muffe, tutte le specie sono state isolate da uccelli con 0-1 GSA, fatta eccezione per la specie *R. solani* (Tabella 5).

3.5. Persistenza sperimentale di un ceppo *Saccharomyces cerevisiae* negli uccelli

Il ceppo *S. cerevisiae* GR1 è stato isolato dalla faringe degli uccelli analizzati fino alla sesta ora successiva all'inoculo. D'altra parte, in questo intervallo temporale il ceppo target non è stato riscontrato nei tamponi cloacali. In corrispondenza della 12° ora dall'inoculo, i tamponi faringei sono risultati negativi mentre quelli cloacali hanno rilevato la presenza del ceppo GR1. L'identificazione di *S. cerevisiae* GR1 è stata eseguita mediante paragone dei profili interdelta delle colonie isolate su WL agar con quelli del medesimo ceppo coltivato in purezza.

3.6. Strain typing degli isolati di *Saccharomyces cerevisiae*

I 18 isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae* sono stati discriminati a livello di ceppo attraverso tre diversi approcci molecolari (Tabella 6). Le tecniche Interdelta-PCR, multiplex-PCR e minisatellites-PCR (realizzata con la coppia di primer AGA1f/AGA1r) hanno mostrato lo stesso potere discriminante fornendo un totale di 6 diversi profili. Le amplificazioni dei geni SED1 e DAN4 (minisatellites-PCR) hanno evidenziato un più basso livello di polimorfismo fra i ceppi, fornendo soltanto 5 diversi profili.

Sul totale delle 18 colture analizzate, i profili di tipizzazione maggiormente riscontrati sono stati 1 e 3, associati, tra l'altro, a differenti specie di uccelli catturate rispettivamente nell'isola di Lampedusa e Ustica (Tabella 6). È interessante notare che i due ceppi ULSc28 e ULSc29 sono stati isolati dal medesimo uccello (stiacchino ps3). Inoltre, fatta eccezione per ULSc37, tutti i restanti ceppi di *S. cerevisiae* sono stati isolati da uccelli con bassi valori di GSA.

3.7. Selezione tecnologica dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

Sono stati sottoposti allo screening tecnologico i ceppi di *S. cerevisiae* differenziati fra loro a livello genetico: ULSc24, ULSc29, ULSc139, ULSc326, ULSc338 e ULSc339.

I ceppi ULSc326, ULSc338 e ULSc339 hanno mostrato una bassa produzione di H₂S ed un'elevata resistenza all'etanolo e al MBSK. Successivamente, tali ceppi sono stati impiegati in fermentazioni di mosti su scala di laboratorio. Sulla base del calo peso registrato quotidianamente, tali ceppi hanno evidenziato una buona capacità di portare a termine la fermentazione alcolica mostrando un andamento fermentativo paragonabile a quello dello starter commerciale GR1 impiegato come ceppi di riferimento (Figura 1).

4. Discussione

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la diffusione ambientale di lieviti enologici e di muffe potenzialmente fitopatogene attraverso gli uccelli migratori. I funghi sono stati isolati dalla cloaca degli uccelli e, attraverso differenti

approcci molecolari e analisi fenotipiche, sono stati identificati a livello di specie e/o ceppo. Sono state individuate numerose specie di lieviti legate comunemente all'ambiente enologico e diverse specie di muffe usualmente associate a malattie delle piante. Inoltre tre ceppi di *S. cerevisiae*, isolati da diversi siti di inanellamento, hanno mostrato buone attitudini enologiche. Sulla base delle nostre conoscenze, questa ricerca, ad oggi, rappresenta la prima indagine effettuata sulla diffusione di lieviti enologici e muffe fitopatogene mediata da uccelli migratori e fornisce nuove ed importanti informazioni sull'ecologia dei funghi.

Molti studi sono stati condotti su lieviti isolati da diverse parti del corpo e/o feci degli uccelli, ma esclusivamente in ambito medico (Mancianti *et al.*, 2001; Ramirez *et al.*, 1976; Refai *et al.*, 1983.). Recentemente, sono stati riscontrati numerosi funghi, patogeni per l'uomo, nella cloaca degli uccelli migratori (Cafarchia *et al.*, 2006a; Hubalek *et al.*, 2004) e in quelle dei rapaci (Cafarchia *et al.*, 2006b), confermando così che tali animali potrebbero essere dei potenziali vettori di microrganismi.

Ad oggi, in un solo lavoro pubblicato da Francesca *et al.* (2010) sono stati campionati uccelli per l'isolamento di lieviti vinari. È stato osservato che tali lieviti possono essere trasportati da uccelli (sedentari) frequentatori del vigneto durante le loro attività di alimentazione, ma nessuna coltura blastomicetica tecnologicamente interessante è stata riscontrata in uccelli migratori.

Numerose ricerche hanno indagato l'origine dei lieviti vinari dimostrando che gli insetti (*Drosophila* spp., *Apis* spp. e *Vespa* spp.) possono essere vettori di microrganismi, tra cui i lieviti (Phaff *et al.*, 1956, Phaff *et al.*, 1956b; Stevic, 1962;.

Lachance *et al.*, 1994). In passato, l'unica relazione, tra l'altro indiretta, fra lieviti enologici e uccelli è stata ipotizzata da Mortimer *et al.*, (1999) il quale ha definito gli uccelli come una delle possibile cause di rottura degli acini d'uva e quindi della successiva contaminazione batterica ad opera degli insetti.

Questi studi hanno dimostrato che i lieviti vinari possono essere diffusi nell'ambiente viticolo da diversi fattori, ma non è stata mai contemplato la possibilità che tali microrganismi potrebbero essere trasportati al di fuori delle zone vitate, anche a lunghe distanze, attraverso gli uccelli migratori.

Nel presente lavoro, sono stati isolati un totale di 125 lieviti e 2702 muffe dalla cloaca di 349 uccelli. Considerando il numero di individui campionati e il numero di colture isolate, i risultati ottenuti sono simili a quelli mostrati da Cafarchia *et al.*, (2006a).

Le analisi di restrizione effettuate sulle regioni 5.8S-ITS e 26S rRNA hanno consentito di suddividere tutti i lieviti in 18 gruppi evidenziando una perfetta corrispondenza fra le due tecniche messe in atto, confermandone l'elevata capacità di differenziazione dei lieviti a livello di specie (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Granchi *et al.*, 1999; Clemente Jimenez *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005; Zott *et al.*, 2008).

È interessante sottolineare che 8 delle 17 specie identificate sono comunemente associate all'ambiente enologico. Fra queste, *S. cerevisiae* è stato uno dei lieviti più isolati e il legame fra questa specie e l'ambiente viticolo-enologico è ben documentato (Beltran *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2005; Schuller *et al.*, 2005)

L'origine di *S. cerevisiae* è da tempo oggetto di controversie. Alcuni ricercatori hanno affermato che tale specie, anche se a concentrazioni molto basse, risulta

naturalmente presente nell'ambiente viticolo (Torok *et al.*, 1996; Mortimer e Polsinelli 1999; Mortimer, 2000). Altri studiosi, escludono una sua origine naturale indicando esclusivamente una stretta relazione fra tale specie e ambienti artificiali fortemente antropizzati, quali cantine e impianti di fermentazioni (Martini, 1993; Naumov, 1996).

D'altra parte, l'ipotesi di una naturale diffusione ambientale è stata confermata dall'isolamento di tale specie dagli essudati di querce nell'America settentrionale (Naumov *et al.*, 1998), un habitat molto lontano da fattori antropici e non correlabile all'ambiente vitivinicolo.

In base a quanto affermato da Mortimer e Polsinelli (1999), *S. cerevisiae* non può essere ritenuto un contaminante microbiologico aereo. Contrariamente alle spore di moltissime muffe, tale specie non è veicolata dal vento e necessita di un vettore per poter raggiungere e contaminare le varie parti dell'ambiente viticolo. Infatti, le cellule di *S. cerevisiae* sono raramente isolate da grappoli d'uva integri ma più frequentemente da uve danneggiate (Vaughan-Martini e Martini 1995; Martini *et al.*, 1996; Mortimer e Polsinelli 1999) suggerendo ancora una volta che gli insetti, soprattutto api e drosofile possono essere vettori di tale microrganismo (Stevic, 1962; Snowden e Cliver, 1996; Mortimer e Polsinelli, 1999). Recentemente, secondo una dichiarazione di Loureiro e Malfeito-Ferreira (2007), i ceppi di *S. cerevisiae* possono essere veicolati anche da uccelli, all'interno del vigneto.

In ogni caso, ad oggi, solo un isolato di questa specie è stato rilevato in uccelli migratori (*Scolopax rusticola*) e valutato sotto il profilo umano-infettivo (Cafarchia *et al.*, 2006a).

Così come per altre specie di lievito identificate nel presente studio, anche *S. cerevisiae* è stata caratterizzata da un profilo di restrizione 5.8S-ITS ad oggi non riportato in letteratura. Questa specie è universalmente riconosciuta come una delle più importanti dal punto vista enologico e poiché l'analisi di restrizione del 5.8S-ITS è fra le tecniche maggiormente impiegate per l'identificazione di tale specie, nuove informazioni su eventuali polimorfismi genetici risultano particolarmente utili per un rapido riconoscimento della specie. Altri polimorfismi del profilo di restrizione della regione 5.8S-ITS sono stati evidenziati per *S. cerevisiae* (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Suzzi *et al.*, 2006; Stringini *et al.*, 2008) così come per altre specie di lieviti (James *et al.*, 1996; Kurtzman e Robnett, 2003; Lachance *et al.*, 2003; Solieri *et al.*, 2007; Tofalo *et al.*, 2009) e funghi in generale (Ko e Jung, 2002). Tali variazioni nel profilo di restrizione potrebbero essere attribuite, secondo alcuni ricercatori, a mutazioni intraspecifiche accumulate nelle copie dei cosiddetti "pseudo-geni" prodotti, in aggiunta a copie funzionali della regione 5.8S-ITS, in seguito ad un meccanismo evolutivo definito "nonconcerted" (Buckler *et al.*, 1997; Solieri *et al.*, 2007).

H. guilliermondii e *A. pullulans* rappresentano le altre due specie d'interesse enologico isolate in maggiore percentuale rispetto al totale dei lieviti. La prima, è fra i lieviti maggiormente isolati nelle fasi iniziali della fermentazione alcolica (Pretorius, 2000) e secondo numerosi autori può influire positivamente sul profilo organolettico di un vino se impiegata come co-starter con *S. cerevisiae* nel processo di vinificazione (Rojas *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003; Ciani *et al.*, 2006; Moreira *et al.* 2008). Inoltre, alcuni autori hanno suggerito che *H. guilliermondii* rappresenta

la specie predominante del genere *Hanseniaspora* nelle aree con climi caldo-temperati (Castelli, 1954; Zambonelli, 1998). È da notare che questa ipotesi è perfettamente in linea con i dati ottenuti nel nostro lavoro e con quello pubblicato nel 2008 da Romancino e collaboratori, entrambi svolti in Sicilia, una regione a clima caldo-temperato. *A. pullulans*, isolata spesso da grappoli e mosti, è ritenuta un contaminante naturale dell'ambiente viticolo. Recentemente Verginer *et al.* (2010) hanno messo in luce la capacità da parte di questo lievito di influenzare il flavour dei vini mediante la produzione di composti sensorialmente attivi nei vini rossi (3-metil-1-butanolo, etil-acetato, etil ottanoato, esanale e fenil-etanolo).

Fra le specie di LIE riscontrate in minore percentuale *I. orientalis* e *M. pulcherrima* risultano di particolare rilevanza in quanto caratterizzate da potenziali caratteri tecnologici. La prima specie è nota per la sua capacità di ridurre il contenuto di acido malico nei vini (Seo *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Ocon *et al.*, 2010), anche in condizioni di immobilizzazione su specifici supporti (Hong *et al.*, 2010). *M. pulcherrima* è stata spesso testata per la produzione di enzimi β -glucosidasi (Fernandez *et al.*, 2000; Gonzalez-Pombo *et al.*, 2008) e proteolitici (Fleet, 2003; Ganga e Martinez 2004) in grado, rispettivamente, di potenziare le note fruttate dei vini e di liberare amminoacidi essenziali per lo sviluppo di *S. cerevisiae* in fase fermentativa.

Dagli uccelli analizzati sono state isolate anche specie non comunemente associate al settore enologico di cui quattro risultano appartenere al genere *Candida*: *C. albicans* e *C. glabrata* associate spesso ad infezioni umane (Cafarchia *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007; Lord *et al.*, 2010); *C. inconspicua* e *C. stellimalicola*, oltre che potenziali

patogeni per l'uomo e per gli animali, sono state identificate, rispettivamente, come lieviti dominanti nella fermentazione di bevande indiane ottenute da riso (Tsuyoshi *et al.*, 2005; Jeyaram *et al.*, 2008) e nella fermentazione delle fave di cacao in Africa occidentale (Jespersen *et al.*, 2005).

Un gruppo di isolati ascrivibili al genere *Candida* non è stato identificato a livello di specie a causa della bassa identità in GenBank. Poiché la similarità in BlastN non ha superato il 97%, per questi lieviti è possibile ipotizzare l'appartenenza ad una nuova specie di *Candida* spp. (Kurtzman e Robnett, 1998). Sarebbe auspicabile approfondire la caratterizzazione genotipica e fenotipica di questi isolati, in quanto *Candida* spp. è spesso responsabile di particolari attività enzimatiche con azione diretta/indiretta nei processi di trasformazione alimentare (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998) oltre che essere comunemente ritenuta un patogeno per uomini ed animali (Cafarchia *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007; Lord *et al.*, 2010).

Le specie *C. aureus*, *C. carnescens* e *C. magnus* sono state anche esse identificate nel nostro lavoro ma, sulla base dei dati presenti in letteratura, risultano prive di un'influenza diretta sulla qualità del vino. D'altra parte, sarebbe interessante testare gli isolati appartenenti a queste specie per una potenziale attività antagonistica contro funghi alterativi e produttori di tossine legati all'ambiente viticolo-enologico (Fleet, 2003a; Fleet, 2003b).

Così come per i lieviti, anche le muffe isolate dagli uccelli hanno restituito un'elevata biodiversità. Le specie identificate sono principalmente cosmopolite e alcune di esse sono in grado di attaccare un gran numero di piante ospiti. *Al. alternata* è un patogeno opportunistico e generalmente è associata ad alterazioni

nelle foglie (macchie necrotiche) di oltre 380 specie di piante ospiti (Ezra *et al.*, 2010; Kakalíková *et al.*, 2009)

Il gruppo di funghi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*, nel suo insieme, può essere responsabile di malattie secondarie della vite, quali marciume dei grappoli. Inoltre, la loro presenza nelle uve può portare alla biosintesi di micotossine riscontrabili, successivamente, nei vini.

B. cinerea è un fungo necrotrofo che colpisce molte specie vegetali; *Vitis vinifera* è fra i suoi ospiti più comuni. In viticoltura, è comunemente nota come muffa grigia e associata al cosiddetto “marciume grigio”. *Rh. solani* è un fungo patogeno di numerose piante, nella vite può causare la morte del portainnesto attraverso la formazione di marciume radicale in associazione con gli attacchi dei nematodi (Walker *et al.*, 1997).

Per affermare che i lieviti e le muffe sono diffuse nell’ambiente, anche a lunghe distanze, attraverso gli uccelli migratori, è necessario considerare i dati raccolti in relazione (i) alla strategia migratoria degli uccelli campionati; (ii) al valore del GSA negli uccelli positivi agli isolamenti microbiologici e (iii) alla persistenza temporale del ceppo GR1 inoculato sperimentalmente nei pettirossi, mantenuti in cattività nei nostri laboratori.

Quanto al primo punto, gran parte degli uccelli positivi ai lieviti e muffe appartengono a specie che compiono una migrazione definita “trans-sahariana”, ovvero uno spostamento dai luoghi di svernamento del sud del Sahara, attraverso il deserto, verso zone di riproduzione dell’Europa settentrionale (Jenny e Winkler, 1994).

Un altro dato, in grado di supportare l'ipotesi di una diffusione dei funghi a lunghe distanze è rappresentato dalle elevate percentuali d'isolamento dei microrganismi da uccelli con valori di GSA molto bassi (compresi fra 0 e 1). Il grasso rappresenta la prima fonte di energia dissipata dagli uccelli durante l'attività di migrazione. Uccelli con basso contenuto di GSA (pari a 0-1) sono fisiologicamente obbligati ad effettuare una sosta per una rapida ripresa delle energie (Cherry, 1982; Bairlein, 1985; Biebach, 1985; Biebach *et al.*, 1986; Moore e Kerlinger 1987; Kuenzi *et al.*, 1991; Lyons e Haig, 1995; Gannes, 2002; Goymann *et al.*, 2010). Generalmente, un migratore trans-sahariano compie dei viaggi con un numero minimo di soste ovvero effettua una sosta quando le sue riserve energetiche risultano minime (GSA compreso fra 0 e 1) (Jenny e Winkler, 1994).

Quindi, gli uccelli inanellati con GSA pari a 0-1 potrebbero essere appena arrivati nel sito di cattura ovvero arrivati da pochissime ore. Dunque, i funghi isolati da uccelli con basso valore di GSA potrebbero essere stati trasportati da luoghi relativamente lontani rispetto ai siti di cattura. In ogni caso, non è possibile escludere una contaminazione fungina, in loco, degli uccelli appena inanellati.

Inoltre, il dato ottenuto dalla valutazione della persistenza del ceppo GR1 nei pettirossi può fornire delle indicazioni sulle distanze coperte dalla diffusione dei funghi. Il ceppo target è stato riscontrato negli uccelli in esame fino a 12 ore dopo l'inoculo. Un passeriforme (in condizioni fisiologiche e meteorologiche standard) è in grado di volare ad una velocità media di circa 30 km/h (Cooke *et al.*, 1993), quindi dopo 12 ore di volo potrebbe aver percorso una distanza pari a 360 km (circa).

È ipotizzabile, quindi, una diffusione dei lieviti fra diverse regioni dell'Italia o dell'Europa così come fra regioni dell'Africa settentrionale e la regione Sicilia.

Sulla base dei dati raccolti e delle considerazioni che ne sono scaturite, il concetto di lievito "autoctono" necessita una rivisitazione.

Numerosi studiosi ed enologi sostengono che ogni zona pedoclimatica possa aver selezionato nel tempo uno starter autoctono che, se impiegato nel medesimo areale d'isolamento, può condurre a dei risultati enologici migliori rispetto all'impiego di un lievito commerciale di altra origine geografica (Ramòn, 1997; Heard, 1999; Lopes *et al.*, 2002; Francesca *et al.*, 2010).

Secondo alcuni ricercatori, i lieviti autoctoni risultano legati ad uno specifico ambiente viticolo o di cantina (van der Westhuizen *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2002; Schuller *et al.*, 2005), sono stabili nel tempo (Vezinhet *et al.*, 1992; Torija *et al.*, 2001; Schuller *et al.*, 2005) e sono in grado di dominare, negli anni, il processo fermentativo spontaneo (Frezier e Dubourdieu, 1992; Sabate *et al.*, 1998; Ciani *et al.*, 2004; Mercado *et al.*, 2007). Tutto ciò supporta l'idea che il "terroir" possa influire sulla qualità di un vino anche a livello microbiologico (Renouf *et al.*, 2006; Mazzei *et al.*, 2010).

Altri studiosi ritengono impossibile definire un rapporto temporale stabile fra un ceppo di lievito e una specifica area geografica, tanto meno una sua influenza ripetuta negli anni sulla qualità del prodotto finito. Non a caso i fattori che influenzano la composizione di una popolazione blastomicetica, in un dato habitat, sono numerosi: andamento climatico; grado di maturazione delle uve (Rosini *et al.*, 1982); trattamenti fitosanitari (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Sturm *et al.*, 2006);

tecnica di raccolta (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982; Pretorius *et al.*, 1999) e pratiche di sanitizzazione effettuate in cantina (Hierro *et al.*, 2006).

In tal senso, la diffusione ambientale dei lieviti causata dalla migrazione degli uccelli, può riguardare soprattutto i ceppi indigeni e quindi potrebbe indebolire il legame fra lievito autoctono e uno specifico habitat. L'utilizzo del termine "autoctono" implica un legame temporale fra lievito e sorgente d'isolamento del tutto discutibile. La definizione di "lievito ambientale", ovvero di un lievito con una più ampia diffusione spaziale e meno vincolato nel tempo ad una ristretta area geografica, potrebbe risultare più appropriata.

La diffusione dei lieviti mediata dagli uccelli potrebbe coinvolgere anche gli starter commerciali, introdotti massivamente e senza alcun controllo, nell'ambiente viticolo a causa del loro intenso utilizzo in cantina (Van der Westhuizen *et al.*, 2000a; Van der Westhuizen *et al.*, 2000b; Schuller *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2005). I lieviti commerciali, spesso geneticamente modificati, potrebbero essere veicolati dagli uccelli anche in habitat lontani dalla zona di impiego e, attraverso fenomeni di ricombinazione genetica con i ceppi indigeni, potrebbero influenzare e/o alterare l'ecologia microbica di un determinato habitat. Non a caso, recentemente, alcuni studiosi hanno sottolineato la necessità di indagare l'inquinamento di natura microbiologico generato dagli scarti dell'industria enologica (Valero *et al.*, 2005; Schuller *et al.*, 2005)

Nel presente lavoro, tutti gli isolati di *S. cerevisiae* sono stati caratterizzati a livello di ceppo. Il numero di profili ottenuti con le analisi genetiche è stato più basso di quello stimato sulla base della sorgente d'isolamento. In ogni caso, è interessante

notare che questa specie, così come altre, è risultata ampiamente diffusa sia rispetto alle specie di uccelli che ai siti di cattura.

Ad ogni modo, le tecniche di strain typing messe in atto nel nostro lavoro sono fra quelle con la più alta efficienza e ripetibilità (Legras e Karst, 2003; Marinangeli *et al.*, 2004; Vaduano e Garcia-Moruno, 2007). Non escludiamo, però, la possibilità di analizzare i suddetti isolati impiegando altre tecniche, quali “Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)” e/o “Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) analysis”, molto più laboriose di quelle applicate in questo studio ma ad elevato potere discriminante (Solieri *et al.*, 2006; Ayoub *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2009).

Infine, attraverso la caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *S. cerevisiae* abbiamo dimostrato che la diffusione ambientale dei funghi non riguarda solo lieviti potenzialmente applicabili in campo enologico, ma anche ceppi effettivamente capaci di fermentare un mosto d'uva.

Dunque, considerando gli obiettivi prefissati in questo studio, possiamo trarre le seguenti conclusioni: 1) lieviti tecnologicamente validi e muffe potenzialmente fitopatogene possono essere diffuse nell'ambiente, anche a lunghe distanze, dagli uccelli migratori; 2) il termine “ambientale” risulta più appropriato, rispetto all'espressione “lievito autoctono”, nel definire i lieviti indigeni presenti in una specifica area; 3) è stato evidenziato un nuovo profilo di restrizione del gene 5.8S-ITS relativamente alla specie *S. cerevisiae*; 4) è stata individuata una nuova possibile specie appartenente al genere *Candida*; 5) è necessario approfondire l'effettivo potere discriminante delle tecniche interdelta-PCR, multiplex-PCR e minisatellites-PCR per una certa tipizzazione dei ceppi *S. cerevisiae*.

5. Tabelle e figure

Tabella 1. Famiglie di uccelli positive all'isolamento dei funghi.

Famiglie di uccelli	Numero di uccelli analizzati	Numero di uccelli positivi a:		
		lieviti N (%)	muffe N (%)	lieviti + muffe N (%)
Sylviidae	217	78 (35,94)	126 (58,06)	52 (23,96)
Muscicapidae	58	13 (22,41)	35 (60,34)	7 (12,07)
Turdidae	42	16 (38,10)	25 (59,52)	11 (26,19)
Hirundinidae	12	2 (16,67)	2 (16,67)	1 (8,33)
Passeridae	9	4 (44,44)	3 (33,33)	2 (22,22)
Altri*	11	1 (9,09)	6 (54,54)	1 (9,09)
Totale	349	114 (32,66)	197 (56,45)	74 (21,20)

*Include le famiglie delle Fringillidae, Laniidae, Motacillidae, Oriolidae e Paridae caratterizzate da un numero di individui pari o inferiore a tre

Tabella 2. Identificazione molecolare dei lieviti

P.R.	5.8S-ITS PCR	Frammenti di restrizione			26S PCR	Frammenti di restrizione			Specie (% identità) ^a	GenBank Accession number
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>		<i>HinI</i>	<i>MseI</i>	<i>ApaI</i>		
I	600	180+165+90	430+150	230+175+125	1100	490+410+190	610+360+95	n.d.	<i>Aureobasidium pullulans</i> (99)	HQ641272
II	550	290+260	460+90	280+270	1100	490+400+190	610+425	n.d.	<i>Candida albicans</i> (99)	HQ641284
III	900	380+165+140	660+220	350+260+50	1050	500+220+200+180	700+370	700+420	<i>Candida glabrata</i> (100)	HQ641276
IV	480	105+90+75+55	450	260+210	1150	490+240+180+130+110	1000+90	700+390	<i>Candida inconspicua</i> (99)	HQ641283
V	460	200+180+80	450	220+190+50	1100	490+400+100+90	390+375+285+75	n.d.	<i>Candida</i> sp. (95)	HQ641271
VI	525	200+155+130	515	290+220	1100	500+400+180	n.d.	n.d.	<i>Candida stellimalicola</i> (99)	HQ641277
VII	520	250+200+70	520	290+170	1160	470+290+210+190	400+370+270	n.d.	<i>Cryptococcus aureus</i> (99)	HQ641274
VIII	550	280+240	350+90+65	250+250	1100	440+280+220+205	425+380+260+75	n.d.	<i>Cryptococcus carnescens</i> (99)	HQ641265
IX	650	355+295	495+95+60	270+240+140	1100	280+200+180+150	400+370+270	n.d.	<i>Cryptococcus magnus</i> (99)	HQ641280
X	650	300+300+50	420+150+90	325+325	1100	490+410+190	610+320+115+75	n.d.	<i>Debaromyces hansenii</i> (99)	HQ641266
XI	750	320+310+105	750	350+200+180	1000	415+395+190+105	610+500+440+100+75	n.d.	<i>Hanseniaporea guilliermondii</i> ^b (99)	HQ641270
XII	500	115+90+75+55	325+90+75	270+225	1100	500+250+180	n.d.	700+400	<i>Issatchenkia orientalis</i> (100)	HQ641275
XIII	450	130+100+90+85+45	290+125	240+105+105	1100	500+350	800+200	n.d.	<i>Issatchenkia terricola</i> (99)	HQ641279
XIV	400	205+100+95	280+100	200+190	1100	380+260+240	580+270+140	600+420	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (98)	HQ641286
XV	780	220+170+150+130	420+320	440+340	1100	480+250+200	400+370+270	n.d.	<i>Pseudozyma aphidis</i> (99)	HQ641278
XVI	640	320+240+80	425+215	340+225+75	1100	500+400+200	400+300+250	n.d.	<i>Rhodotorula mucillaginosa</i> (99)	HQ641269
XVII	850	375+335+140	320+240+170+130	370+130+110	1100	500+220+180	n.d.	n.d.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (99)	HQ641267
XVIII	825	370+250+150	300+240+160+60	400+200+130	1100	500+260+200	400+380+300	n.d.	<i>Sporisorium peniseti</i> (97)	HQ641273

Tutti i valori riportati in tabella relativi alla restrizione dei geni 5.8S-ITS e 26S rRNA e all'amplificazione D1/D2 26S rRNA sono espressi in paia di basi (pb)

Abbreviazioni: P.R., profili di restrizione; n.d. non digerito.

^a Ottenuta mediante analisi della sequenza della regione D1/D2 26S rRNA su BlastN (Altschul *et al.* 1997) in NCBI database.

^b *Hanseniaporea guilliermondii* è stata identificata anche mediante digestione del gene 5.8S-ITS con l'endonucleasi *DdeI* confermando i risultati ottenuti da Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

Tabella 3. Numero di isolati per ciascuna specie di lievito in relazione alle diverse specie di uccelli

Specie di lieviti	Specie di uccelli positivi ai lieviti (I simboli sottostanti le lettere indicano la strategia migratoria degli uccelli)																	Totale N. (%)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	M	N	O	P	Q	R		
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	■	■	■	■		□
<i>A. pullulans</i>	8	4					1				1		1						15 (12,00)
<i>C. albicans</i>	7	1	2	1							2	1		4	1		1	20 (16,00)	
<i>C. glabrata</i>											2							2 (1,60)	
<i>C. inconspicua</i>				2		1												3 (2,40)	
<i>Candida</i> sp.	3	2						2										7 (5,60)	
<i>C. stellimalicola</i>									2									2 (1,60)	
<i>Cr. aureus</i>	3																	3 (2,40)	
<i>Cr. carnescens</i>						2												2 (1,60)	
<i>Cr. magnus</i>								2			1	6						9 (7,20)	
<i>D. hansenii</i>	2																	2 (1,60)	
<i>H. guilliermondii</i>	4			1		1					9		1	4	1	1	22 (17,60)		
<i>I. orientalis</i>	3										1				1		5 (4,00)		
<i>I. terricola</i>			1								2						3 (2,40)		
<i>M. pulcherrima</i>	3																3 (2,40)		
<i>Ps. aphidis</i>					3												3 (2,40)		
<i>R. mucillaginosa</i>	4																4 (3,20)		
<i>S. cerevisiae</i>	3	2		1				7		2	1	2					18 (14,40)		
<i>Sp. penniseti</i>			2														2 (1,60)		
Totale	40 (32,00)	8 (6,40)	5 (4,00)	5 (4,00)	3 (2,40)	4 (3,20)	1 (0,80)	11 (8,80)	2 (1,60)	2 (1,60)	19 (15,20)	9 (7,20)	1 (0,80)	1 (0,80)	8 (6,40)	3 (2,40)	1 (0,80)	1 (0,80)	125
Lieviti d'interesse enologico*	27 (38,02)	6 (8,45)	1 (1,41)	2 (2,82)	0	1 (1,41)	1 (1,41)	7 (9,86)	0	2 (2,82)	14 (19,72)	2 (2,82)	1 (1,41)	1 (1,41)	4 (5,63)	2 (2,82)	1 (1,41)	0	71 (56,80)

Lettere: A, beccafico; B, canapino maggiore; C, cannaiola; D, codirosso; E, forapaglie; F, lui grosso; G, lui verde; H, pigliamosche; I, rondine; J, sterpazzola; K, sterpazzolina; L, stiacchino; M, usignolo; N, capinera; O, passera sarda; P, passero solitario; Q, pettirosso; R, cinciallegra.

Simboli: •, migratore trans-sahariano; ■, migratore parziale; □, migratore irregolare.

*Lieviti appartenenti alle seguenti specie: *A. pullulans*, *D. hansenii*, *H. guilliermondii*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, *R. mucillaginosa* e *S. cerevisiae*.

Tabella 4. Numero di isolati per ciascuna specie di muffa in relazione alle diverse specie di uccelli

Specie di muffe	Specie di uccelli positive alle muffe																		
	(I simboli sottostanti le lettere indicano la strategia migratoria degli uccelli)																		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	■	■	■	■	□	•
<i>Al. alternata</i>	72	21	7	4	13	1	7	73	1	43	36	27	3			2			23
<i>As. flavus</i>			3									1							1
<i>As. niger</i>	33	2				2	1	4	17	24	25	18	1	7		1	4		
<i>As. ochraceus</i>	1		2							6	5	1							
<i>As. versicolor</i>	13		1	1					1	6	5								2
<i>B. cinerea</i>	10		1										2		2				
<i>Cl. herbarum</i>	581	150	86	8	102	23	13	227	4	191	141	111	4	16	7	1	5	6	77
<i>F. oxysporum</i>	18		12	1	1			19	3	20	17	3		1	1	1		6	
<i>G. candidum</i>	2							2											
<i>P. chrysogenum</i>	18			8				8				3						11	
<i>P. griseofulvum</i>	16			4		1		8		1	1	1			3	1		2	
<i>P. notatum</i>	10	1	2	12				7					2		4		1		
<i>Ph. glomerata</i>	3	1		1				5				3							
<i>Ri. solani</i>			1																
<i>Ri. stolonifer</i>	3									2	2					1			
Totale	780 (28,90)	175 (6,48)	115 (4,26)	39 (1,44)	116 (4,30)	27 (0,10)	21 (0,78)	353 (13,06)	26 (0,96)	293 (10,84)	232 (8,59)	168 (6,22)	12 (0,44)	17 (0,63)	24 (0,89)	6 (0,22)	7 (0,26)	30 (1,11)	103 (3,81)

Lettere: A, beccafico; B, canapino maggiore; C, cannaiola; D, codirosso; E, forapaglie; F, lui grosso; G, lui verde; H, pigliamosche; I, rondine; J, sterpazzola; K, sterpazzolina; L, stiacchino; M, usignolo; N, capinera; O, passera sarda; P, passero solitario; Q, pettirosso; R, cinciallegra; S, prispolone.

Simboli: •, migratore trans-sahariano; ■, migratore parziale; □, migratore irregolare.

Tabella 4 (continuazione). Numero di isolati per ciascuna specie di muffa in relazione alle diverse specie di uccelli

Specie di muffe	Specie di uccelli positive alle muffe (I simboli sottostanti le lettere indicano la strategia migratoria degli uccelli)								Totale N. (%)
	T	U	V	W	X	Y	Z	α	
	•	•	•	•	•	•	•	•	
<i>Al. alternata</i>	4	1	4		9		7	4	362 (13,39)
<i>As. flavus</i>									5 (0,19)
<i>As. niger</i>	1	1					8		149 (5,51)
<i>As. ochraceus</i>									16 (0,59)
<i>As. versicolor</i>	1						2		32 (1,18)
<i>B. cinerea</i>									15 (0,56)
<i>Cl. herbarum</i>	21		15	6			14	37	1846 (68,32)
<i>F. oxysporum</i>	1		1					8	113 (4,18)
<i>G. candidum</i>									4 (0,15)
<i>P. chrysogenum</i>		1						4	53 (1,96)
<i>P. griseofulvum</i>								4	42 (1,55)
<i>P. notatum</i>						1			40 (1,48)
<i>Ph. glomerata</i>	1	2							16 (0,59)
<i>Ri. solani</i>									1 (0,04)
<i>Ri. stolonifer</i>									8 (0,31)
Totale	29 (1,10)	5 (0,18)	20 (0,74)	6 (0,22)	9 (0,33)	1 (0,038)	31 (1,15)	57 (2,11)	2702

Lettere: T, balia nera; U, averla capirossa; V, lui piccolo; W, canapino; X, balia dal collare; Y, rigogolo; Z, bigiarella; α , usignolo di fiume.

Simboli: •, migratore trans-sahariano; ■, migratore parziale; □, migratore irregolare.

Table 5. Numero e percentuale (fra parentesi) di funghi isolati dagli uccelli raggruppati in funzione del valore del GSA*.

Specie di funghi	Numero (%) di funghi isolati da uccelli con un valore di GSA pari a:	
	0-1	2-7
Lieviti totali (n = 125)	73 (58,20)	52 (41,80)
Lieviti d'interesse enologico (n = 72)	46 (63,89)	26 (36,11)
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n = 15)	10 (66,66)	5 (33,34)
<i>Debaromyces hansenii</i> (n = 2)	2 (100)	0.00
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (n = 22)	10 (45,45)	12 (54,55)
<i>Issatchenkia orientalis</i> (n = 5)	3 (60,00)	2 (40,00)
<i>Issatchenkia terricola</i> (n = 3)	2 (66,66)	1 (33,34)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (n = 3)	3 (100)	0.00
<i>Rhodotorula mucillaginosa</i> (n = 4)	4 (100)	0.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n = 18)	12 (66,67)	6 (33,33)
Lieviti d'interesse non enologico (n = 53)	31 (58,50)	22 (42,50)
<i>Candida albicans</i> (n = 20)	11 (55,00)	9 (45,00)
<i>Candida glabrata</i> (n = 2)	0.00	2 (100)
<i>Candida inconspicua</i> (n = 3)	2 (66,66)	1 (33,34)
<i>Candida</i> sp. (n = 7)	3 (42,85)	4 (57,14)
<i>Candida stellimalicola</i> (n = 2)	2 (100)	0.00
<i>Cryptococcus aureus</i> (n = 3)	2 (66,66)	1 (33,34)
<i>Cryptococcus carnescens</i> (n = 2)	2 (100)	0 (0.00)
<i>Cryptococcus magnus</i> (n = 9)	6 (66,66)	3 (33,34)
<i>Pseudozyma aphidis</i> (n = 3)	3 (100)	0.00
<i>Sporisorium penniseti</i> (n = 2)	0.00	2 (100)
Muffe totali (n = 2702)	1551 (57,41)	1151 (42,59)
<i>Alternaria alternata</i> (n = 362)	193 (53,27)	169 (46,73)
<i>Aspergillus flavus</i> (n = 5)	3 (60,00)	2 (40,00)
<i>Aspergillus niger</i> (n = 149)	93 (62,41)	56 (37,59)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (n = 16)	10 (62,50)	6 (37,50)
<i>Aspergillus versicolor</i> (n = 32)	21 (62,62)	11 (34,38)
<i>Botrytis cinerea</i> (n = 15)	9 (60,00)	6 (40,00)
<i>Cladosporium herbarum</i> (n = 1846)	1064 (57,62)	782 (42,38)
<i>Fusarium oxysporum</i> (n = 113)	59.62 (67,37)	40.38 (32,63)
<i>Geotrichum candidum</i> (n = 4)	3 (75,00)	1 (25,00)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n = 53)	29 (54,71)	24 (45,29)
<i>Penicillium griseofulvum</i> (n = 42)	23 (54,76)	19 (45,24)
<i>Penicillium notatum</i> (n = 40)	22 (55,00)	18 (45,00)
<i>Phoma glomerata</i> (n = 16)	10 (62,50)	6 (37,50)
<i>Rhizoctonia solani</i> (n = 1)	0.00	1 (100)
<i>Rhizopus stolonifer</i> (n = 8)	6 (75,00)	2 (25,00)

*GSA, grasso sub-cutaneo addominale

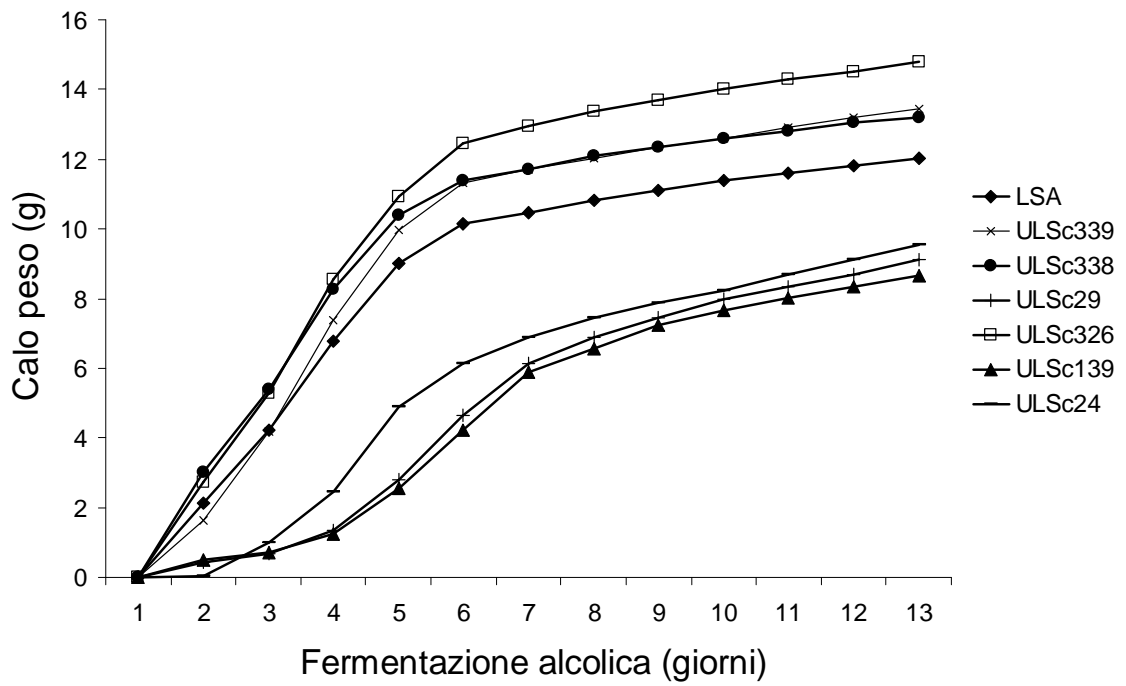
Table 6. Profili molecolari dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

Codice isolato	Sorgente d'isolamento (codice uccello)	GSA	Sito di cattura	Profili molecolari ottenuti mediante				
				PCR Interdelta	PCR Multiplex	PCR SSR ^a		
						AGA1	SED1	DAN4
ULSc24	Canapino maggiore (ps1)	1	IL	1	1	1	1	1
ULSc26	Canapino maggiore (ps2)	1	IL	1	1	1	1	1
ULSc28	Stiaccino (ps3)	1	IL	1	1	1	1	1
ULSc29	Stiaccino (ps3)	2	IL	2	2	2	2	2
ULSc30	Sterpazzola (ps4)	2	IL	1	1	1	1	1
ULSc31	Sterpazzola (ps5)	2	IL	1	1	1	1	1
ULSc32	Codirosso (ps6)	1	IL	1	1	1	1	1
ULSc37	Beccafico (ps7)	3	IL	1	1	1	1	1
ULSc139	Beccafico (ps8)	2	IU	3	3	3	1	1
ULSc140	Beccafico (ps9)	2	IU	3	3	3	1	1
ULSc144	Pigliamosche (ps10)	0	IU	3	3	3	1	1
ULSc145	Pigliamosche (ps11)	0	IU	3	3	3	1	1
ULSc146	Pigliamosche (ps12)	1	IU	3	3	3	1	1
ULSc148	Pigliamosche (ps13)	1	IU	3	3	3	1	1
ULSc186	Pigliamosche (ps14)	1	IU	3	3	3	1	1
ULSc326	Pigliamosche (ps15)	1	MdV	4	4	4	3	3
ULSc338	Pigliamosche (ps16)	1	IU	5	5	5	4	4
ULSc339	Sterpazzolina (ps17)	0	IL	6	6	6	5	5
Numero totale di profili molecolari				6	6	6	5	5

Abbreviazioni: GSA, grasso sub-cutaneo addominale; IL, isola di Lampedusa; IU, isola di Ustica; MdV, Mazara del Vallo.

^a L'analisi PCR SSR (Simple Sequence Repeat) è stata effettuata mediante l'amplificazione separata dei geni DAN4, AGA1 e SED1

Figura 1. Calo peso delle microfermentazioni inoculate con i ceppi di *S. cerevisiae*



LSA, lievito secco attivo (ceppo commerciale di *S. cerevisiae*)

ULSc24-ULSc339, ceppi di *S. cerevisiae* isolati da uccelli

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.
- Ayoub M. J., Legras J. L., Saliba R., Gaillardin C. (2006). Application of multi locus sequence typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *Journal of Applied Microbiology* 100: 699-711.
- Bairlein F. (1985). Body weights and fat deposition of palaeartic passerine migrants in the central Sahara. *Oecologia* 66: 141-146.
- Baleiras Couto M.M., Reizinho R.G., Duarte F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 49-56.
- Barnett H. L. (1965). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (1983). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press.
- Beltran G., Torija M. J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamon, J. M., Rozes N., Mas A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 287-293.
- Biebach H. (1985). Sahara stopover in migratory flycatchers: fat and food affect the time program. *Experientia* 41: 695-697.
- Biebach H., Friedrich W., Heine G. (1986). Interaction of bodymass, fat, foraging and stopover period in trans-Saharan migrating passerine birds. *Oecologia* 69: 370-379.
- Buckler E. S., Ippolito A., Holtsford T. P. (1997). The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832.
- Cafarchia C., Camarda A., Romito D. (2006a). Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia*, 161: 229_234.
- Cafarchia C., Romito D., Iatta R. (2006b). Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, 44: 485-492.
- Castelli T. (1954). Les agents de la fermentation vinaire. *Archives of Microbiology* 20, 323-342.
- Cherry J. D. (1982). Fat deposition and length of stopover of migrant white-crowned sparrows. *Auk* 99: 725-732.
- Ciani M., Beco L., Comitini F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 239-245.
- Ciani M., Mannazzu I., Marinangeli P. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek International journal of General and Molecular Microbiology*, 85:(2) 159-164.
- Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martinez-Rodriguez S., Javier Las Heras-Viazquez F., 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
- Combina M., Mercado L., Borgo P., Elia A., Jofré V., Ganga A., Martinez C., Catanis C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina.
- Cooke. (1933). *Speed of Birds flight*, Vol. L.
- Domsch K. H. Gams W., Anderson T-H. (1995). *Compendium of soil fungi*. Lubrecht & Cramer Ltd.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 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.

- Ezra D., Gat T., Skovorodnikova Y., Vardi Y., Kosto I. (2010). First report of *Alternaria* black spot of pomegranate caused by *Alternaria alternata* in Israel. *Australasian Plant Disease, Notes* 5 (1): 1-2.
- Fernandez-Espinar M. T., Esteve-Zarzoso B., Querol A., Barrio E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.
- Fleet G. H. (2003a). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11- 22.
- Fleet G. H. (2003b). Yeasts in fruit and fruit products. In: Boekhout, T., Robert, R. (Eds.), *Yeasts and Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behrs Verlag, Hamburg, pp. 267-288.
- Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Aponte M., Settanni L., Moschetti G. (2010). Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (2): 337-351.
- Frezier V., 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.
- Ganga M. A., Martinez C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 76-83.
- Gannes L. Z. (2002). Mass change pattern of blackcaps refuelling during spring migration: evidence for physiological limitations to food assimilation. *Condor*, 104: 231-239.
- Garcia M. E., Lanzarot P., Rodas V.L., Costas E., Blanco J. L. (2007). Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. *Veterinari Medicina*, 52 (10): 464-470.
- Gonzalez-Pombo P., Perez G., Carrau F., Guisan J. M., Batista-Viera F., Brena B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular *b*-glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30:1469-1475.
- Goymann W., Spina F., Ferri A., Fusani L. (2010). Body fat influences departure from stopover sites in migratory birds: evidence from wholeisland telemetry. *Biology Letters*, 6: 478-481.
- Granchi L., Bosco M., Messini A., Vincenzini M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 949-956.
- Heard G. (1999). Novel yeast in wine making — looking to the future. *Food Australia* 51: 347-352.
- Hierro N., Gonzalez A., Mas A., Guillamon J.M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 792-801.
- Hong S.K., Lee H.J., Park H.J., Hong Y.A., Rhee I.K., Lee W.H., Choi S.W., Lee O.S., Park H.D. (2010). Degradation of malic acid in wine by immobilized *Issatchenkia orientalis* cells with oriental oak charcoal and alginate. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 522-529.
- Hubalek Z. (2004). An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 639-659.
- James S. A., Collins M. D., Roberts I. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 189-194.
- Jansson D.S., Brojer C., Mattsson R., Feinstein R., Morner T., Hard C. (2008). Mycotic proventriculitis in gray partridges (*Perdix perdix*) on two game bird farms. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39 (3): 428-437.
- Jenni L., Winkler R. (1994). *Moult And Ageing Of European Passerines* - Academic Press, London.
- Jespersen L., Nielsen D. S., Honholt S., Jakobsen M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5: 441-453.
- Jeyaram K., Singh W. M., Capece A., Romano P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' — A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 115-125.
- Kakaliková L., Jankura E., Šrobárová A. (2009). First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. *Australasian Plant Disease Notes*, 4 (1): 68-69.

- Kim D. H., Hong Y. A., Park H. D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*, 30: 1633-1638.
- Ko K. S., Jung H. S. (2002). Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus, *Trichaptum abietinum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23: 112-122.
- Korabečná M., Liška V., Fajfrlík K. (2003). Primers *ITS1*, *ITS2* and *ITS4* detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi. *Folia Microbiologica*, 48: 233-238.
- Kuenzi A. J., Moore F. R., Simons R. R. (1991). Stopover of neotropical landbird migrants on East Ship Island following trans-gulf migration. *Condor*, 93: 869-883.
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeast of the '*Saccharomyces complex*' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, 3: 417-432.
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. (1998). Identification and phylogeny of *ascomycetous* yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Lachance L.A., Daniel H. M., Meyer W. (2003). The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Res* 4: 253-258.
- Lachance M. A., Gilbert D. G., Starmer W. T. (1994). Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in eastern oak-pine forests: a comparison with western communities, *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 484-494.
- Legras J., Karst F. (2003). Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 221: 249-255.
- Legras J.L., Karst F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 221: 249-255.
- Li S.H., Cheng C., Li Z., Chen J.Y., Yan B., Han B.Z., Reeves M. (2008). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 85-90.
- Lopes C. A., van Broock M., Querol A., Caballero A. C. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 608-615.
- Lord A. T. K., Mohandas K., Somanath S., Ambu S. (2010). Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9: 11.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2007). The ecology of contamination yeasts on wine grapes. In: *Proceedings of the international specialized symposium on yeasts ISSY26, Sorrento, Italy*, p.
- Lyons J. E., Haig S. M. (1995). Fat content and stopover ecology of spring migrant semipalmated sandpipers in South Carolina. *Condor* 97: 427-437.
- Mancianti F., Tardoni S., Cecherelli R. (2001). Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia*, 153:121-124.
- Marinangeli 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 characterization. *FEMS Yeast Research*, 4: 427-435.
- Marinangeli 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. *FEMS Yeast Research* 4: 427-435.
- Martini A. (1993). The origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 4:165-176.
- Martini A., Ciani M., Scorzetti G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 435-440.
- Martini A., Federichi F., Rosini G. (1980). A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, 26: 856-859.
- Maul J.D., Gandhi J.P., Farris J.L. (2005). Community-level physiological profiles of cloacal microbes in songbirds (Order: Passeriformes): Variation due to host species, host diet, and habitat. *Microbial Ecology*, 50: 19-28.

- 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.
- Mercado L., Dalcero A., Masuelli R., Combina M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology* 24: 403-412.
- Moore F., Kerlinger P. (1987). Stopover and fat deposition by North American wood-warblers (Parulinae) following spring migration over the gulf of Mexico. *Oecologia* 74: 47-54.
- Moreira N., Mendes F., Guedes de Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 231-238.
- Mortimer R. K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*. 10: 403-409.
- Mortimer R. K., Polsinelli M. (1999). On the origin of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150:199-204.
- Mortimer R.K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M. (1994). Genome Renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, 10: 1543-1552.
- Naumov G. I. (1996). Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 295-302.
- Naumov G. I., Naumova E. S., Sniegowski P. D. (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1045-1050.
- Nuttall P.A. (1997). Viruses, bacteria and fungi of birds. In: Clayton DH, Moore J, editors. *Host-parasite evolution*. Oxford, UK: University Press, pp. 271-302.
- O'Donnell K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds) *The fungal anamorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB international, Wallingford, pp 225-233.
- Ocón E., Gutiérrez A. R., Garijo P., Tenorio C., López I., Santamaría P. (2010). Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *European Food Research and Technology*, 230:885-891.
- Phaff H. J., Miller M. W., Reccda J. A., Shifrine M., Mrak E. M. (1956b). Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California. II Yeast found in the alimentary canal of *Drosophila*, *Ecology* 37 533-538.
- Phaff H. J., Knapp E. P. (1956a). The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 22: 117-130.
- Prakitchaiwattana C. J., Fleet G. H., Heard G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4: 856-877.
- Pretorius I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast*, 16: 675-729.
- 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 industries. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20: 61-74.
- Ramirez R., Robertstad G. W., Hutchison L. R., Chavez J. (1976). Mycotic flora in the lower digestive tract of feral pigeons (*Columba livia*) in El Paso, Texas area. *Journal of Wildlife Diseases*, 12:83-85.
- Ramón D. (1997). Trends in wine microbiology. Minireview. *Microbiología SEM* 13: 405-412.
- Raspor P., Zupan J., Cadez N. (2007). Validation of yeast identification by in silico RFLP. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15: 267-281.
- Refai M., Taha M., Selim S. A., Elshabourii F., Yusseff H. H. (1983). Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia*, 21:163-165.

- Renouf V., Miot-Sertier C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A. (2006). The wine microbial consortium: a real terroir characteristic. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40: 209-216.
- Richards K. D., Goddard M. R., Gardner R. C. (2009). A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 355-359.
- Rojas V., Gil J. V., Pinaga F., Mazaneres P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 181-188.
- Romancino D. P., Di Maio S., Muriella R., Oliva D. (2008). Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 105: 2248-2254.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169-180.
- Rosini G., Federichi F., Martini A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology*, 8: 83-89.
- Sabate J., Cano J., Querol A., Guillamon J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Letter in Applied Microbiology*, 26: 452-455.
- Schuller D., Alves H., Dequin S., Casal M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 167-177.
- Seo S. H., Rhee C. H., Park H. D. (2007). Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. *Journal of Microbiology*, 45: 521-527.
- Silvanose C.D., Bailey T.A., Naldo J.L., Howlett J.C. (2001). Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. *Avian Diseases*. 42: 447-451.
- Snowdon J. A., Cliver D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31: 1-26.
- Solieri L., Cassanelli S., Giudici P. (2007). A new putative *Zygosaccharomyces* yeast species isolated from traditional balsamic vinegar. *Yeast* 2007; 24: 403-417.
- Solieri L., Landi S., De Vero L., Giudici P. (2006). Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 63-71.
- Stevic S. (1962). The significance of bees (*Apis* sp.) and wasps (*Vespa* sp.) as carriers of yeast for the microflora of grapes and the quality of wine, *Arhiv zav Poljoprivredne Nauke*. 50: 80-92.
- Stringini M., Comitini F., Taccari M., Ciani M. (2008). Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 184-189.
- study. *Syst. Appl. Microbiol.*, 25: 287-293.
- Sturm J., Grossmann M., Schnell S. (2006). Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1241-1248.
- Suzzi G., Pisante M., Tofalo R., Torriani S., Rizzotti L., Stagnari F., Chaves López C., Taccogna L., Valmorri S. (2006). Diversity of yeast biota in musts from Montepulciano d'Abruzzo grapes grown in vineyards under two soil management systems. *Industria delle Bevande XXXV*, 237-244.
- Tofalo R., Chaves-López C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 179-187.
- Torija M. J., Rozes N., Poblet M., Guillamon 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.
- Torok T., Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M. (1996). Quest for wine yeasts—an old story revisited. *Journal of Industrial Microbiology*, 17:303-313.
- Tsiodras S., Kelesidis T., Kelesidis I., Bauchinger U., Falagas M.E. (2008). Human infections associated with wild birds. *Journal of Infection*, 56: 83-98.
- Tsuyoshi N., Fudou R., Yamanak S., Kozaki M., Tamang N., Thapa S., Tamang J. P. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 135-146.

- Valero E., Schuller D., Cambon B., Casal M., Dequin S. (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Research*, 5: 959-969.
- Valmorri S., Tofalo R., Settanni L., Corsetti A., Suzzi G. (2010). Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 119-129.
- Van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Pretorius I. S. (2000a). Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 3-9.
- Van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Khan W., Pretorius I. S. (2000b). Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 10-16.
- Vaudano E., Garcia-Moruno E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25: 56-64.
- Vaughan-Martini A., Martini A. (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 514-522.
- Verginer M., Leitner E., Berg G. (2010). Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8344-8350.
- Vezihet F., Hallet J. N., Valade M., Poulard A. (1992). Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 83-86.
- Von Arx J. A. (1974). The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer ed., Vadutz, Germany.
- Walker G. E. (1997). Effects of *Meloidogyne* spp. and *Rhizoctonia solani* on the Growth of Grapevine Rootings. *Journal of Nematology*, 29 (2): 190-198.
- Zambonelli C. (1998). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Bologna: Edagricole.
- Zott K., Miot-Sertier C., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Masneuf-Pomarede I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 197-203.

CAPITOLO IV

“Ecologia e valutazione dei caratteri tecnologici di batteri lattici isolati durante le vinificazioni dell’uva Grillo nell’areale di produzione del vino Marsala”

Il lavoro riportato in questo capitolo è stato pubblicato sulla seguente rivista:

Annals of Microbiology

“Ecology and technological capability of lactic acid bacteria isolated during Grillo grape vinification in the Marsala production area”

Nicola Francesca, Luca Settanni, Ciro Sannino, Maria Aponte, Giancarlo Moschetti

DOI 10.1007/s13213-010-0109-1

Abstract

Grapes of “Grillo” variety, used to produce Marsala wine, were harvested from five vineyards different for climatic and agronomic parameters, in order to obtain a first mapping of lactic acid bacteria (LAB) inhabiting the production area. Marsala base wine production was followed at large-scale and two experimental vinifications, different for lysozyme and SO₂ concentration and combination, were carried out at pilot-plant scale. LAB communities and conventional chemical parameters were periodically analysed. LAB were found on grapes at an average concentration of about 10² CFU g⁻¹ which decreased during the transformation process. A total of 146 colonies were collected, but only 35 were recognized as presumptive LAB. On the basis of phenotypic differences and isolation source, 16 isolates were then subjected to genotypic identification and gathered into the following species: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc fallax* and *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains was the species most frequently isolated during winemaking showing the highest resistance to SO₂ and lysozyme.

Keywords: Lactic acid bacteria; Grillo grapes; Marsala wine; Lysozyme; SO₂

Riassunto

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di analizzare l'ecologia dei batteri lattici (BL) associata alla varietà d'uva "Grillo" nell'areale di produzione del "Marsala D.O.C.". I campioni analizzati sono stati prelevati in corrispondenza di diverse fasi tecnologiche di tre diverse produzioni del vino Grillo impiegato come base-marsala: (i) vinificazione su larga-scala; (ii) microvinificazione in presenza di SO₂; (iii) microvinificazione in presenza di lisozima e SO₂. I tre processi tecnologici sono stati monitorati sia da un punto di vista microbiologico che chimico. La concentrazione dei BL riscontrata sui grappoli è stata pari a 10² UFC/g la quale è progressivamente diminuita durante i processi di trasformazione. Sono stati isolati un totale di 146 batteri, di cui solo 35 sono stati presuntivamente identificati come BL. Di queste colture, 16 sono state selezionate sulla base delle differenze fenotipiche e della diversa sorgente d'isolamento. Tali colture, successivamente, sono state identificate mediante tecniche genetiche ottenendo le seguenti specie: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc fallax* e *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae*.

La specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* è risultata dominante durante i processi di vinificazione e ha mostrato la più alta resistenza all'SO₂ e al lisozima.

Parole chiave: batteri lattici; cultivar Grillo; vino Marsala; lisozima; SO₂.

1. Introduzione

I batteri lattici (BL) sono naturali contaminanti microbiologici delle uve e la loro capacità di crescita nel mosto e nei vini è stata, in passato, ben documentata (Davis *et al.*, 1985; Bartowsky *et al.*, 2004; Neeley *et al.*, 2005). I BL hanno un ruolo ben definito nel processo di vinificazione e le loro attività metaboliche possono influenzare sia positivamente che negativamente la qualità dei vini. Ciò dipende, essenzialmente, dalla specie e/o ceppo di BL e dalla fase della vinificazione in cui essi sviluppano (Lonvaud-Funel, 1999). La crescita dei BL nel vino può essere influenzata da numerosi fattori quali la temperatura, il tenore in etanolo, il valore del pH, la disponibilità di nutrienti e la concentrazione dell'anidride solforosa (SO₂) (Fugelsang, 1997). Il lisozima (EC. 3.2.1.17, enzima muramidasi) è stato indicato da alcuni ricercatori come additivo enologico alternativo alla SO₂ per controllare la proliferazione dei BL nei vini e per una corretta gestione e/o ritardo della fermentazione malolattica (Gerbaux *et al.*, 1997). D'altra parte tale enzima non presenta la capacità antiossidante della SO₂ e la sua efficacia dipende dalla sensibilità del ceppo di BL a tale composto oltre che dal valore del pH, dal contenuto polifenolico e della SO₂ presente nei vini in cui è addizionato (Bartowsky *et al.*, 2004).

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di: (i) isolare ed identificare i BL presenti su uve Grillo e in diverse fasi tecnologiche della produzione del vino base-Marsala; (ii) valutare l'influenza che il lisozima e l'SO₂ possono avere sulla comunità dei BL durante la vinificazione; (iii) valutare la sensibilità dei BL al lisozima e alla SO₂.

2. Materiali e metodi

2.1. Campionamento dei grappoli, mosti e vini

I grappoli della cultivar Grillo sono stati prelevati in cinque vigneti locati nell'areale di produzione del Marsala D.O.C. (Sicilia, Italia) e caratterizzati da diverse parametri e condizioni pedoclimatiche. I mosti e i vini sono stati campionati durante le principali fasi tecnologiche relative a tre diverse vinificazioni (Tabella 1).

Il processo di trasformazione A (su larga scala) è stato realizzato presso la “Cantina Sociale Birgi” (Marsala, TP) seguendo il protocollo aziendale. Il mosto d'uva Grillo (contenente 230.50 g/L di zuccheri riducenti e con pH 3.40) è stato inoculato con un ceppo commerciale Premium Blanc 12V *Saccharomyces cerevisiae* (Enologica Vason, Verona, Italy) a cui è seguita una fermentazione alcolica termo-controllata (16-18 °C). Sono state monitorate altre due microvinificazioni di uve Grillo realizzate, presso i nostri laboratori, aggiungendo diverse concentrazioni e combinazioni di SO₂ e lisozima. La sperimentazione B è stata condotta in presenza di 25 mg/L di SO₂ libera mentre la microvinificazione C in presenza di 20 mg/L di SO₂ libera e 200 mg/L di lisozima. Entrambe le sperimentazioni sono state effettuate seguendo lo stesso protocollo messo in atto nella vinificazione A ma impiegando come starter il ceppo *Saccharomyces cerevisiae* strain GRA21, appartenente alla collezione dei lieviti del Dipartimento SENFIMIZO (Università degli Studi di Palermo), inoculato in una quantità di mosto pari a 100 litri

2.2. Analisi chimiche

Le analisi chimiche (Tabella 2) sono state realizzate come riportato da Francesca *et al.* (2010). Il contenuto di glicerolo, acido malico e lattico è stato determinato mediante reazione enzimatica così come suggerito dalle istruzioni presenti nel kit della R-Biofarm (Darmstadt, Germania).

2.3. Conta e isolamento dei batteri lattici

I campioni di uve sono stati analizzati come di seguito descritto: all'interno di ogni vigneto sono stati prelevati 20 grappoli, appartenenti a diverse piante, e 500 g di acini d'uva, prelevati casualmente in diverse parti del vigneto, i quali sono stati inseriti in busta sterile, trasportati in laboratorio garantendo una temperatura di 4 °C ed omogeneizzati per 5 minuti alla massima velocità mediante stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward Medical, Regno Unito).

I grappoli, i mosti e i vini sono stati sottoposti a diluizioni decimali seriali in soluzione acquosa (0.9% NaCl, p/v) ed aliquote di 1 ml sono state inoculate in piastre contenenti il terreno colturale Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (Oxoid). I campioni prelevati alla fine delle fermentazioni sono stati analizzati su MRS addizionato con succo di pomodoro (15% v/v) (MRSt) con un pH di 4.8.

Tutte le piastre di coltura sono state incubate, in condizioni di anaerobiosi, a 28 ± 2 °C per 5 giorni. L'isolamento delle colture è stato effettuato prelevando "random" diverse colonie sviluppate sui terreni di crescita che sono state successivamente purificate su MRS agar. Tutti i batteri identificati presuntivamente come BL, ovvero batteri Gram-positivi [analizzati impiegando l'idrossido di potassio (KOH) come

descritto da Gregersen (1978)], catalasi negativi (stemperando una porzione di colonia su vetrino porta-oggetti in presenza di acqua ossigenata (H₂O₂) al 5%), sono stati mantenuti in MRS broth con glicerolo (30 % v/v) alla temperatura di -80°C.

2.4. Raggruppamento e identificazione dei batteri lattici

Tutti i presunti BL sono stati raggruppati in base alla loro capacità di produrre CO₂ in seguito alla fermentazione del glucosio (Pilone *et al.*, 1991).

L'identificazione genotipica è stata effettuata mediante sequenziamento del gene 16S rRNA. Il DNA dei BL è stato estratto seguendo il metodo descritto da Lopez *et al.* (2003); la reazione di amplificazione è stata realizzata come riportato da Wiesburg *et al.* (1991). Gli ampliconi sono stati visualizzati con trans-illuminatore UV su gel di agarosio (1.5% p/v) addizionato di bromuro di etidio (0.5 µl/ml). I prodotti di amplificazione (1600 pb, circa) sono stati purificati mediante QIAquick purification kit (Quiagen S.p.a., Milano, Italia) e sequenziati impiegando gli stessi primer della precedente reazione di amplificazione. Le sequenze di DNA sono state ottenute mediante metodo "dideoxy chain termination" impiegando il "DNA sequencing kit" (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA). Le sequenze così ottenute sono state comparate con quelle presenti in banca dati GenBank/EMBL/DDBJ impiegando il programma BlastN (Altschul *et al.*, 1997).

2.5. Sensibilità dei batteri lattici al lisozima e alla SO₂

La resistenza dei ceppi di BL al lisozima e alla SO₂ sono è stata valutata mediante la tecnica “well diffusion assay”: le piastre di MRS agar sono state inoculate con 3.0 ml di MRS soft agar (0.7% p/v di agar) contenenti 0.1 ml di brodo-coltura di ciascun ceppo, incubato per 12 ore a 28 ± 2°C.

All'interno delle suddette piastre di coltura sono stati praticati dei fori (diametro 7 mm) opportunamente riempiti con 50 µl di soluzione contenente gli inibenti (lisozima e SO₂) a diverse concentrazioni [da 100 a 1600 mg/l di lisozima; da 100 a 1600 mg/l di SO₂; lisozima e SO₂ (contemporaneamente) mantenendo costante il contenuto di SO₂ a 100 mg/l e variando quello del lisozima da 100 a 1600 mg/l). Le piastre così trattate sono state mantenute a 4°C per 6 ore per consentire una diffusione radiale ed omogenea degli inibenti all'interno del substrato di crescita. Successivamente, le piastre sono state incubate, in condizioni di anaerobiosi, a 30°C per 24 h e la sensibilità dei BL al lisozima e alla SO₂ è stata valutata misurando il diametro (mm) del relativo alone di inibizione.

3. Risultati

3.1. Analisi chimiche

Le analisi chimiche sono state effettuate sui mosti e sui vini (dalla fermentazione all'imbottigliamento) relativi alle tre vinificazioni (Tabella 2).

In tutti i processi di trasformazione gli zuccheri riducenti sono stati completamente metabolizzati. I vini ottenuti con le microvinificazioni B e C hanno mostrato valori di pH, rispettivamente, pari a 3.53 e 3.55; il pH del vino relativo al processo industriale

è stato leggermente più basso (pH 3.34). Tutti i vini analizzati hanno mostrato bassi valori di acidità volatile; l'acido lattico è stato rilevato esclusivamente nella lavorazione su larga scala mentre l'acido malico, in tutti e tre i casi, non ha subito variazioni significative. Il contenuto di etanolo e di glicerolo è stato più alto nei vini sperimentali rispetto a quello industriale; la concentrazione di SO₂ totale, in corrispondenza dell'imbottigliamento, è stata simile in tutti i vini mentre nel vino A è stata registrata una quantità più alta di SO₂ libera. Durante le vinificazioni A e B sono stati registrati incrementi relativi al contenuto totale di polifenoli.

3.2. Conta, isolamento e identificazione dei batteri lattici

Tutti i risultati relativi alla conta dei presunti BL sono riportati in tabella 3. La gran parte dei grappoli ha mostrato una carica microbica pari 10² UFC/g, fatta eccezione per il campione GR1 ($1.0 \pm 0.3 \times 10^5$ UFC/g). Nel mosto impiegato per le due microvinificazioni è stata registrata una carica batterica di 1.1×10^2 UFC/ml che è diminuita, dopo la chiarificazione, fino a 1.2×10 UFC/ml. Quanto al mosto relativo al processo industriale, la concentrazione dei presunti BL è stata pari a 10³ UFC/ml. Durante i 21 giorni di fermentazione alcolica, il contenuto di BL è stato compreso fra 3.1 – 6.3 UFC/ml (vinificazioni A e B) e pari a 1.8×10 UFC/ml (vinificazione C). In generale la concentrazione dei BL è stata molto bassa sia nei vini sperimentali (da B1 a B4 e da C1 a C4) che in quello industriale (A4) anche se questo ultimo ha fornito una carica microbica più alta dei vini sperimentali.

Dalle piastre di coltura relative a ciascun campione sono state isolate mediamente 5 colonie ottenendo un totale di 156 colture. Di queste, solo 31 isolati sono stati

identificati presuntivamente come BL (Gram +, catalasi negativi e privi di spore) mentre altri 4 batteri (Gram + e catalasi negativi) hanno mostrato capacità di formare spore. Sulla base della produzione di CO₂ in seguito alla metabolismo del glucosio, tutti i 31 isolati sono stati classificati come BL omofermentanti; i restanti 4 isolati sono risultati eterofermentanti.

Sulla base della produzione di CO₂ e della sorgente d'isolamento, sono stati selezionati ed identificati geneticamente un totale di 16 BL (Tabella 4), ottenendo le seguenti specie: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc fallax* e *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae*.

3.3. Sviluppo dei batteri lattici in presenza di lisozima e SO₂

I sedici ceppi di BL sono stati valutati per la loro capacità di crescita in presenza di differenti concentrazione degli inibenti (Tabella 4). La gran parte dei ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* (5 ceppi su 8) sono risultati resistenti a 200 mg/l di lisozima, fatta eccezione del ceppo Vm231 resistente fino a 800 mg/l di tale composto. I ceppi di *Ln. fallax* hanno mostrato la più alta resistenza al lisozima in quanto sono stati in grado di sviluppare in presenza di 1600 mg/l di enzima. D'altra parte, *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* è stata caratterizzata dalla più bassa resistenza a tale inibente. Quanto alla capacità di crescita in presenza di SO₂, tutti i lattococchi, enterococchi e un ceppo di *Ln. fallax* hanno mostrato un'elevata resistenza (crescita fino a 1600 mg/l). *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* e un ceppo di *Ln. Fallax* hanno mostrato la più bassa resistenza alla SO₂. In presenza combinata di entrambi gli inibenti, tutti i

ceppi, ad eccezione di *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, sono stati in grado di crescere fino a 1600 mg/l di lisozima e 100 mg/l di SO₂ (mantenuti costanti).

4. Discussione

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di caratterizzare la popolazione dei BL associata all'uva Grillo e alla produzione del vino base-Marsala oltre che valutare la resistenza dei ceppi isolati a due importanti additivi enologici, quali il lisozima e la SO₂.

Sono stati monitorati da un punto di vista chimico e microbiologico tre diversi processi produttivi: una vinificazione industriale e due microvinificazioni sperimentali in cui è stata valutata l'influenza del lisozima e della SO₂ sulla comunità di BL.

I campioni, analizzati secondo metodi "culture-dependent", sono stati prelevati prima e durante le fasi di fermentazione alcolica, così come in fase di affinamento in acciaio e di imbottigliamento. La carica dei BL riscontrata sui grappoli è stata molto bassa, ma in linea con i dati riportati in altri studi (Fleet, 1993; Fugelsang, 1997). La concentrazione dei BL è diminuita durante la fermentazione alcolica fino a raggiungere valori molto bassi (meno di 10 UFC/ml) nella fase di affinamento e d'imbottigliamento dei vini.

Anche se il numero di colonie isolate è stato relativamente consistente, sono stati presuntivamente identificati come BL solo 35 isolati.

Questo dato mette in luce le difficoltà, che spesso si hanno, nell'isolare i BL da matrici enologiche e, per tale ragione, molti studiosi hanno suggerito la necessità di

effettuare un pre-arricchimento dei campioni ed impiegare metodi di analisi sia “culture-dependent” che “culture-independent” (Bae *et al.*, 2006).

Considerando le differenze fenotipiche fra gli isolati e le diverse sorgenti d’isolamento, sono stati selezionati 16 ceppi di BL, identificati a livello di specie. Di questi, i lattococchi (*Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) rappresentano il gruppo più frequentemente isolato in corrispondenza di quasi tutte le fasi tecnologiche delle tre vinificazioni monitorate. Sebbene *Lactococcus* spp. sia stato già rilevato nell’ambiente viticolo (Yanagida *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2006), nessun dato, ad oggi riportato, ha indicato la presenza di questo genere durante il processo di vinificazione. Fra le specie identificate, sono stati identificati anche *E. faecium* e *Ln. fallax* ma riscontrati esclusivamente in fase pre-fermentativa.

In questo lavoro, è interessante notare la presenza della specie sporigena *S. nakayamae* subsp. *nakayamae*. Ad oggi, tale specie è stata isolata esclusivamente da grappoli in vigneti australiani (Bae *et al.*, 2006) e in terreni vitati della Korea (Chang *et al.*, 2008) ed il presente lavoro rappresenta il primo ritrovamento di *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* in fase di affinamento dei vini o più in generale durante la vinificazione. Questo BL è stato isolato soltanto nella fermentazione della vinificazione industriale la quale ha previsto l’impiego di uno starter commerciale sotto forma di coltura liofilizzata. Il ceppo commerciale potrebbe aver rappresentato la fonte di inoculo/contaminazione di *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* nel vino industriale in quanto, recentemente, è stato dimostrato che i preparati liofilizzati di lieviti commerciali ad uso enologico sono spesso contaminati da BL a concentrazioni anche di 10^4 UFC/g (Scartezzini *et al.*, 2009).

In ogni caso, l'isolamento di due ceppi di *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* risulta tecnologicamente interessante. Il genere *Sporolactobacillus* comprende batteri sporigeni in grado di produrre, per via omofermentativa, acido lattico (Yanagida *et al.*, 1997) ma nonostante ciò essi non sono mai stati inclusi nel gruppo dei batteri lattici (Bae *et al.*, 2006). D'altra parte, la capacità di produrre spore determina un importante vantaggio ecologico per questa specie in quanto questi batteri potrebbero sopravvivere anche in condizioni avverse come quelle generate da bassi pH ed da elevate concentrazioni di etanolo e polifenoli nei vini. In tal senso, sarebbe opportuno approfondire il ruolo di tale specie in relazione alle matrici alimentari fermentate come il vino.

Quanto alle analisi chimiche, non sono state registrate differenze significative fra le tre vinificazioni e i relativi vini hanno presentato valori dei principali parametri chimici del tutto paragonabili a quelli delle vinificazioni commerciali, realizzate in Sicilia.

Tutti i ceppi identificati sono stati testati per la loro resistenza a diverse concentrazioni di lisozima e SO₂. Grazie alla sue potenziali applicazioni in campo alimentare, nei suddetti test sono stati inclusi anche i ceppi di *S. nakayamae* subsp. *nakayamae*. Il lisozima ha presentato una più capacità d'inibizione rispetto alla SO₂, soprattutto su *S. nakayamae* subsp. *nakayamae*. Lo sviluppo di *E. faecium* e *Lc. lactis* non sembra essere stato influenzato dalla presenza dei composti testati.

È importante sottolineare il fatto di aver rilevato la presenza di *Lc. lactis* in numerose fasi delle vinificazioni, fino all'imbottigliamento di tutti i vini. Poiché il vino rappresenta, per tale specie, una sorgente d'isolamento del tutto insolita, sarebbe

opportuno approfondire le caratteristiche metaboliche dei nostri ceppi di *Lc. lactis*. Infatti, nessun dato in letteratura indica la capacità da parte di questa specie di resistere e/o sviluppare a concentrazioni elevate di etanolo come quelle presenti nei vini (Stiles e Holzapfel, 1997). Ad oggi tale specie è stata riscontrata solo su uve e/o nell'ecosistema viticolo (Bae *et al.*, 2006). Anche se nel nostro lavoro, i lattococchi sono stati isolati a concentrazioni (< 10 UFC/ml) alle quale questi batteri non potrebbero causare alterazioni dei vini, non è da escludere che, in condizioni di alti valori di pH e basse acidità totali dei vini (tipiche condizioni tecnologiche dei vini siciliani), e considerata l'elevata resistenza al lisozima e SO₂ non all'etanolo, questi BL potrebbero proliferare inficiando la qualità dei vini.

In generale, elevate concentrazioni di BL nei vini, esclusa la fase di fermentazione malo lattica, possono risultare potenzialmente dannose per la qualità del prodotto in quanto essi sono in grado di degradare vari composti quali acidi citrico e glicerolo alterando la qualità del prodotto finito (Comi *et al.*, 2005).

Nel nostro studio non stati isolari BL appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*, il principale attore della fermentazione malo-lattica (Van Vuuren e Dicks, 1993). D'altra parte, tutto ciò è in linea con i parametri chimici che non hanno evidenziato nessuna variazione del contenuto di acido malico (Tabella 2), tranne che una limitata presenza di acido lattico nel vino industriale. Inoltre, ad eccezione dei ceppi di *Ln. fallax*, nessun degli isolate è risultato eterofermentativo.

Concludendo, le due vinificazioni sperimentali non hanno prodotto effetti negativi sulla composizione e concentrazione dei batteri lattici durante il processo produttivo

e il livello chimico-microbiologico compositivo dei vini sperimentali è stato perfettamente in linea con quello ottenuto nella vinificazione industriale.

5. Tabelle

Tabella 1. Schema di campionamento relativo ai processi di vinificazione

Processo di vinificazione	Mosto		Fermentazione alcolica				Affinamento in acciaio			Imbottigliamento
	appena pressato	chiarificato	3° giorno	6° giorno	14° giorno	21° giorno	17° giorno	32° giorno	78° giorno	
Vinificazione A ^a	A0	n.p.	n.p.	FA2	n.p.	FA4	A1	A2	A3	A4
Microvinificazione B ^b	M0	M1	F1	F2	F3	F4	B1	B2	B3	B4
Microvinificazione C ^c							C1	C2	C3	C4

^a Vinificazione industriale effettuata in presenza di 20 mg/l di SO₂ libera

^b Microvinificazione effettuata in presenza di 25 mg/l di SO₂ libera

^c Microvinificazione effettuata in presenza di 20 mg/l di SO₂ libera e 200 mg/l di lisozima

n.p., non prelevato

Tabella 2 Composizione chimica dei mosti e dei vini relativi alla vinificazione industriale (A) e alle microvinificazioni (B e C).

Campioni	pH	Zuccheri riduttori (g/l)	ATT ^a	AV ^b	Acido malico (g/l)	Acido lattico (g/l)	Etanolo (% v/v)	Glicerolo (mg/l)	SO ₂ totale (mg/l)	SO ₂ libera (mg/l)	Estratto secco (g/l)	PT ^c	Tannini (ppm catechine)
A0	3.40±0.01	230.50±0.04	5.00±0.01	n.d.	1.08±0.01	n.d.	n.d.	1.33±0.04	48.00±0.18	16.00±0.01	20.30±0.33	382.00±0.87	15.40±0.80
A1	3.32±0.01	1.50±0.04	5.00±0.01	0.23±0.01	0.85±0.01	0.45±0.01	13.56±0.03	5.56±0.04	51.00±0.09	15.00±	20.60±0.12	340.00±0.87	15.40±0.61
A2	3.39±0.01	1.60±0.03	5.20±0.01	0.25±0.01	0.91±0.01	0.41±0.02	13.56±0.07	5.92±0.02	58.00±0.12	15.00±0.01	21.90±0.09	382.00±1.25	16.20±0.42
A3	3.39±0.00	1.60±0.05	5.20±0.03	0.28±0.01	0.91±0.03	0.43±0.01	13.56±0.03	5.85±0.02	66.00±0.10	17.00±0.01	21.60±0.12	398.00±0.98	16.40±0.60
A4	3.34±0.01	1.60±0.01	5.40±0.02	0.24±0.01	0.95±0.012	0.43±0.01	13.61±0.05	5.89±0.01	99.00±0.18	35.00±0.01	22.90±0.05	384.00±1.45	16.20±0.41
M0	3.48±0.00	261.40±0.04	6.50±0.01	n.d.	0.97±0.02	n.d.	n.d.	2.84±0.01	46.00±0.22	17.00±0.05	28.60±0.25	303.00±1.02	32.70±0.18
B1	3.50±0.01	1.10±0.05	6.40±0.05	0.20±0.01	1.30±0.02	n.d.	15.80±0.08	9.00±0.01	81.00±0.31	23.00±0.07	25.30±0.08	334.00±0.89	15.70±0.21
B4	3.53±0.01	1.10±0.01	6.00±0.03	0.18±0.01	1.17±0.02	n.d.	15.80±0.01	9.00±0.02	92.00±0.17	28.00±0.02	22.90±0.09	379.00±1.22	17.60±0.20
C1	3.51±0.01	1.40±0.03	5.90±0.02	0.26±0.01	1.20±0.01	n.d.	15.80±0.02	9.50±0.04	98.00±0.12	24.00±0.02	26.80±0.02	341.00±1.09	15.00±0.20
C4	3.55±0.00	1.40±0.03	5.60±0.02	0.28±0.01	1.17±0.02	n.d.	15.80±0.02	9.50±0.04	102.00±0.10	25.00±0.02	28.90±0.02	338.00±0.96	15.20±0.21

^aATT, acidità totale titolabile (g/l di acido tartarico)^bAV, acidità volatile (g/l di acido acetico)^cPT, polifenoli totali (ppm di acido gallico)

n.d., non determinato (valore < al limite di rilevamento del metodo)

Tabella 3. Concentrazione dei presunti batteri lattici isolati da uve, mosti e vini

Campioni ^a	UFC/g (ml) ^b	Isolati
GR1	1.0 (\pm 0.3) x 10 ⁵	1
GR2	6.7 (\pm 0.4) x 10 ²	0
GR5	1.0 (\pm 0.4) x 10 ²	2
GR7	1.1 (\pm 0.2) x 10 ²	0
GR9	1.2 (\pm 0.4) x 10 ²	0
GR10	4.2 (\pm 0.3) x 10 ²	0
GR12	2.7 (\pm 0.2) x 10 ²	0
GR15	4.0 (\pm 0.1) x 10 ²	0
GR26	2.3 (\pm 0.) x 10	0
A0	1.0 (\pm 0.4) x 10 ³	1
FA2	1.6 (\pm 0.1) x 10	0
FA4	1.8 (\pm 0.1) x 10	0
A1	1.3 (\pm 0.2) x 10	3
A2	5.0 (\pm 0.1)	4
A3	2.0 (\pm 0.1) x 10	2
A4	5.0 (\pm 0.1)	3
M0	1.1 (\pm 0.2) x 10 ²	7
M1	1.2 (\pm 0.1) x 10	4
F1	6.3 (\pm 0.2)	1
F2	4.0 (\pm 0.1)	1
F3	6.0 (\pm 0.1)	0
F4	3.1 (\pm 0.1)	1
B1	1.0 (\pm 0.1)	0
B2	1.0 (\pm 0.1)	1
B3	1.0 (\pm 0.1)	0
B4	4.0 (\pm 0.2)	1
C1	1.0 (\pm 0.1)	1
C2	2.0 (\pm 0.1)	1
C3	3.1 (\pm 0.2)	1
C4	3.0 (\pm 0.1)	1

^a GR, grappolo; A0, mosto appena pressato della vinificazione industriale; FA2, FA4, fermentazione alcolica nella vinificazione industriale; A1-A3, affinamento del vino industriale; A4, imbottigliamento del vino industriale; M0, mosto appena pressato nelle microvinificazioni; M1, mosto appena chiarificato nelle microvinificazioni; F1-F4, fermentazione alcolica nelle microvinificazioni; B1-B3, affinamento del vino nella microvinificazione B; B4, imbottigliamento del vino nella microvinificazione B; C1-C3, affinamento del vino nella microvinificazione C; C4, imbottigliamento del vino nella microvinificazione C.

^b I risultati sono espressi in grammi per i grappoli e in millilitri per i restanti campioni.

Tabella 4. Specie di batterici lattici e relative resistenze al lisozima e alla SO₂.

Campioni	Ceppi	Produzione di CO ₂ da glucosio	Specie	Accession no. ^a	Identità (%)	Lisozima (mg/l) ^b	SO ₂ (mg/l) ^b	Lisozima e SO ₂ (mg/l) ^b
F1	Vm199	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638430	97	200	1600	1600
C1	Vm209	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638422	98	200	1600	1600
C2	Vm141	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638416	99	200	1600	1600
C3	Vm115	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638420	97	200	1600	1600
C4	Vm118	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638419	99	100	1600	1600
B4	Vm231	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638431	98	800	1600	1600
A4	Vm214	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638423	99	200	1600	800
GR1	Vm79	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	HM638418	99	400	1600	400
M0	Vm72	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	HM638424	99	200	1600	800
F4	Vm180	–	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	HM638425	99	400	1600	400
M0	Vm3	–	<i>Enterococcus faecium</i>	HM638426	99	800	1600	1600
B2	Vm137	–	<i>Enterococcus faecium</i>	HM638421	98	800	1600	1600
A0	Vm162	+	<i>Leuconostoc fallax</i>	HM638428	98	1600	1600	1600
GR5	Vm181	+	<i>Leuconostoc fallax</i>	HM638429	98	1600	200	1600
A1	Vm28A	–	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	HM638417	99	100	800	1600
A1	Vm28B	–	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	HM638427	98	100	800	1600

^a Accession number ottenuti depositando le sequenze del 16S rRNA presso la GenBank/EMBL/DDBJ

^b I risultati della resistenza al lisozima e alla SO₂ sono riferiti alla più alta concentrazione alla quale è stata registrato sviluppo microbico

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.
- Bae S., Fleet G.H., Heard G.M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 712-717.
- Bartowsky E.J., Costello P.J., Villa A., Henschke P.A. (2004) Chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 143-150.
- Chang Y.H., Jung M.J., Park I.S., Oh H.M. (2008). *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. *Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2316-2320.
- Comi G., Manzano M., Cocolin L. (2005). Le alterazioni microbiche dei vini. In: Vincenzini M., Romano P., Farris G.A. (eds), *Microbiologia del vino*. Casa editrice Ambrosiana, Milano, pp 315-346.
- Davis C.R., Wibowo D., Eschenbruch R., Lee T.H., Fleet G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 290-301.
- Fleet G.H. (1993). The microorganism of winmaking – isolation, enumeration and identification. In: Fleet GH (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publisher, Switzerland, pp 1-25.
- Francesca N., Chiurazzi M., Romano R., Settanni L., Moschetti G. (2010). Indigenous yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 337-351.
- Fugelsang K.C. (1997). The lactic acid bacteria. In: Fugelsang KC (ed) *Wine Microbiology*, Chapman & hall, New York, pp. 159-168.
- Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A. (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 49-54.
- Gregersen T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5:123-127.
- Lonvaud-Funel A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek Internation Journal of General and Molecular Microbiology*, 76: 317-331.
- Lopez I., Ruiz-Larrea F., Cocolin L., Orr E., Phister T., Marshall M., VanderGheynst J., Mills D. (2003). Design and Evaluation of PCR Primers for Analisis of Bacteria Population in Wine by Denaturing Gradiente Gel Electrophoreres. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6801-6807.
- Neeley E.T., Phister T.G., Mills D.A. (2005). Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8954-8957.
- Pilone G.J., Clayton M.G., van Duivenboden R.J. (1991). Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture of tests of heterofermentation, mannitol form fructose and ammonia from arginine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 153-157.
- Scartezzini V., Putti A., Kobler A. (2009). Test tecnico dei lieviti selezionati, Centro di Sperimentazione Agraria e Forestale Laimburg - Sezione Enologia. http://www.laimburg.it/download/Test_dei_lieviti_2009.pdf (last accession 10.06.10)
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29.
- Van Vuuren H.J.J., Dicks L.M.T. (1993). *Leuconostoc oenus*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 99-112.
- Weisburg W., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173:697-703.
- Yanagida F., Srionnual S., Chen Y.S. (2008). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from koshu vineyards in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 47: 134-139.

Yanagida F., Suzuki K.I., Kozaki M., Komagata K. (1997). Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racernicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofiensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. International Journal of Systematic and Bacteriology 47: 499-504.