

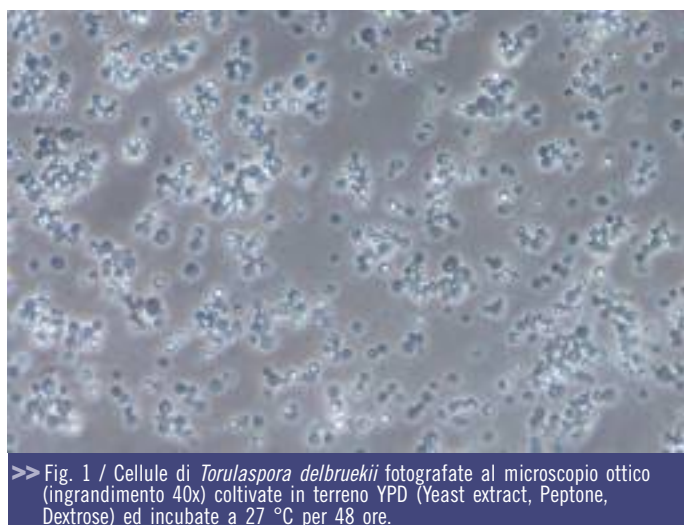
LA SELEZIONE E IL MITO DEI LIEVITI AUTOCTONI

di Paolo Giudici¹, Lisa Solieri¹, Luciana De Vero^{1,2}

Il termine “autoctono” è inappropriato a descrivere i lieviti “naturalmente” presenti. I lieviti non conoscono la geografia! Più che derivare da isolamenti casuali, i ceppi più efficaci sono il risultato di programmi di miglioramento. Dalla selezione per caratteri si identificheranno gli starter del futuro

La microbiologia enologica italiana vanta una tradizione gloriosa grazie a ricercatori di grande valore scientifico fra cui menzioniamo solo alcuni per esigenze di spazio: de' Rossi, Castelli, Sacchetti, Florenzano e Zambonelli. I loro studi hanno posto l'attenzione sull'evoluzione della popolazione microbica durante la fermentazione alcolica dei mosti e la successione delle specie descritte ha piena validità anche oggi.

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, via Giovanni Amendola 2, Padiglione Besta, 42100 Reggio Emilia. ² Curatore collezione dipartimento.



Le fermentazioni spontanee

Nel corso dei decenni lo studio dei lieviti indigeni e della loro successione in vinificazione è stato ripetuto con tecniche sempre più avanzate,

ma ottenendo risultati simili. Si può generalizzare che la successione delle specie durante la fermentazione alcolica nelle regioni temperate idonee alla crescita della *Vitis vinifera* è sempre la stessa: si

Riassunto

La scelta del ceppo di lievito influenza il successo della fermentazione alcolica dei vini e modula profondamente la qualità del prodotto finale. Analisi molecolari hanno portato ad una profonda revisione della tassonomia dei lieviti ed hanno facilitato gli studi ecologici delle fermentazioni spontanee dei mosti, evidenziando l'esistenza della specie *Saccharomyces cerevisiae* in habitat naturali non antropici. Le specie riscontrate sulle uve sono in numero elevato e maggiore che non nei mosti e nei vini, dove esiste una forte pressione selettiva del mezzo e delle condizioni tecnologiche impiegate. In generale, più stringenti sono le condizioni di crescita, minore è il numero di specie in grado di sviluppare. *S. cerevisiae* è la specie più alcool tollerante ed è per questa ragione che a fine fermentazione è sempre la più rappresentata, nonostante sia poco frequente sulle uve. Queste osservazioni hanno suggerito la tesi

della domesticazione della specie *S. cerevisiae* e quella dei lieviti autoctoni, ma le evidenze a supporto non possono essere considerate sufficienti. In particolare, la tesi dei lieviti autoctoni è debole, specie nel passaggio che attribuisce ai lieviti autoctoni un contributo significativo nella qualità dei vini corrispondenti. I buoni ceppi di lievito sono il risultato di un programma di selezione e miglioramento genetico e, solo raramente, l'oggetto di un isolamento casuale. In questo articolo discutiamo il significato dei termini “domesticazione” ed “autoctono” in biologia, suggerendo che il termine “autoctono” marca troppo il rapporto tra luogo, tempo e ceppo, lasciando intendere una dipendenza non dimostrata. Il termine “indigeni” è molto più appropriato per definire i lieviti presenti in un mosto, in una cantina o in un vigneto, e con esso si intendono i lieviti presenti in un determinato momento, senza pretese di continuità temporale.

Tab. 1 / Tassonomia e importanza enologica delle principali specie di lievito non-Saccharomyces presenti nelle fermentazioni spontanee

Genere	Specie*	Sinonimi**	Importanza enologica
Brettanomyces (anamorfo di <i>Dekkera</i>)	<i>B. bruxellensis</i>		
Non hanno un ruolo definito nella vinificazione, producono elevate quantità di acido acetico, alteranti dei vini in barrique			
Candida	<i>C. colliculosa</i>	<i>Torula colliculosa</i>	
	<i>C. mycoderma</i>	<i>Saccharomyces mycoderma</i>	
	<i>C. pulcherrima</i>	<i>Torula pulcherrima</i>	
	<i>C. stellata</i>	<i>Cryptococcus stellatus</i> <i>Saccharomyces stellatus</i>	Adatto a temperature < 20 °C
	<i>C. valida</i>	<i>Mycoderma valida</i>	
	<i>C. vini</i>	<i>Eutorula vini</i> <i>Mycoderma vini</i>	Privo di attività fermentativa, agente responsabile della fioretta
Debaryomyces	<i>D. hansenii</i>	<i>Pichia hansenii</i> <i>Saccharomyces hansenii</i>	
Hanseniaspora Basso potere fermentativo, molto sensibili alla SO ₂	<i>H. guilliermondi</i>	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Willia guilliermondii</i>	
	<i>H. occidentalis</i>		
	<i>H. uvarum</i>	<i>Kloeckeraspora uvarum</i> <i>Kloeckera apiculata</i>	Prime fasi della fermentazione spontanea di mosti non solfitati, bassa attività fermentativa
	<i>H. valbyensis</i>	<i>Endomyces valbyensis</i> <i>Kloeckeraspora valbyensis</i>	
	<i>H. vineae</i>	<i>Kloeckeraspora vineae</i>	
	<i>H. anomala</i> (= <i>Wickerhamomyces anomalus</i>)	<i>Hansenula anomala</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Saccharomyces anomalus</i>	
	<i>I. occidentalis</i>		
Issatchenkia	<i>I. orientalis</i>	<i>Candida krusei</i> <i>Pichia orientalis</i> <i>Saccharomyces krusei</i>	
Kloeckera	<i>Kl. apiculata</i>	<i>Saccharomyces apiculatus</i>	
Prime fasi della fermentazione spontanea di mosti non solfitati, basso potere alcoligeno, adatto a temperature < 20 °C			
Kluyveromyces Bassa produzione di alcol, bassa produzione di acido acetico	<i>K. marxianus</i>	<i>Dekkeromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces marxianus</i>	
	<i>K. thermotolerans</i> (= <i>Lachancea thermotolerans</i>)		
Metschnikowia	<i>M. pulcherrima</i>		Modesta produzione di alcol e alta produzione di acido acetico
Pichia	<i>P. membranifaciens</i>	<i>Debaryomyces membranifaciens</i> <i>Saccharomyces membranifaciens</i>	Privo di attività fermentativa, responsabile della fioretta
Saccharomyces	<i>Sacch. ludwigii</i>		Unico agente della fermentazione nei mosti con alta quantità di SO ₂
Schizosaccharomyces Provoca intensa fermentazione malo lattica	<i>Schiz. japonicus</i> (= <i>Hasegawaea japonica</i>)	<i>Octosporomyces japonicus</i>	Vigorosa attività fermentativa
	<i>Schiz. pombe</i>		Ottima attività fermentativa
Torulaspora	<i>T. delbrueckii</i>	<i>Debaryomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i>	Forte vigore fermentativo, usato nei processi di rifermentazione in bottiglia
Zygosaccharomyces	<i>Z. bailii</i>	<i>Saccharomyces bailii</i> <i>Torulaspora bailii</i>	Buona attività fermentativa ed elevata osmofilia

* (= nome corrente) **Sono riportati solo alcuni dei sinonimi. L'elenco completo ed i riferimenti bibliografici sono reperibili nel sito: <http://www.speciesfungorum.org> (data di accesso: marzo 2010). In rosso: importanza enologica

comincia con l'azione di lieviti di forma apiculata e in un secondo tempo appaiono delle cellule di forma ovale, ellittiche o allungate le quali prendono il sopravvento sulle prime portando a termine il processo fermentativo. In particolare i lieviti dei generi *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* predominano nelle prime fasi, seguiti da diverse specie di *Metschnikowia* e *Pichia*, a volte, di *Issatchenkia* e *Kluyveromyces* nelle fasi centrali, quando la concentrazione dell'etanolo arriva al 3-4 % (Fleet e Heard, 1993; Mortimer et al. 1994). I lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono in maniera significativa alla fermentazione, dal momento che essi raggiungono popolazioni superiori a 10⁶-10⁷ cellule/ml (Fleet et al.1984; Heard e Fleet, 1986), influenzando non solo la composizione del vino ma anche lo sviluppo di *Saccharomyces* (Lema et al.1996). Infatti, con l'aumento della concentrazione alcolica nel mosto in fermentazione, le condizioni ambientali diventano progressivamente più restrittive per lo sviluppo dei lieviti non-*Saccharomyces*, consentendo in tal modo ai lieviti *Saccharomyces*, generalmente dotati di un maggiore potere alcoligeno, di prendere il sopravvento e di portare a termine il processo fermentativo (Castelli, 1954; Amerine et al.1982; Lafon-Lafourcade, 1983). Tuttavia, gli stessi lieviti apiculati hanno dimostrato, in alcuni casi, di sostenere da soli e in modo soddisfacente la vinificazione (Caridi e Ti-

ni 1994; Tini et al. 1979; Garoglio, 1981). Inoltre, le basse temperature di fermentazione (10-15 °C) sono considerate favorevoli allo sviluppo preferenziale dei lieviti apiculati, in particolare, incrementano la tolleranza all'etanolo delle specie *Hanseniaspora* e *Candida*, al punto che questi lieviti non scompaiono e diventano specie dominanti accanto a *S. cerevisiae* per un tempo più lungo (Heard e Fleet, 1988; Erten, 2002). Oltre a *S. cerevisiae*, poche altre specie hanno la possibilità di intervenire nelle ultime fasi della fermentazione e in quelle centrali, in quanto dotate di un discreto potere alcoligeno: si tratta di *Torulaspota delbrueckii* (Fig.1) e *Zygosaccharomyces bailii*, che occasionalmente possono anche sostituire lo stesso *S. cerevisiae*, e di varie specie del genere *Schizosaccharomyces* (*Schizosacch. pombe* e *Schizosacch. japonicus*). Altri lieviti il cui intervento è del tutto marginale, sono rappresentati da *Saccharomyces ludwigii* (Fig.2), *Metschnikowia pulcherrima* e alcune specie del genere *Brettanomyces* (Zambonelli, 1988). Al termine della fermentazione poi, se non viene impedito in qualche modo il contatto con l'aria atmosferica, è inevitabile lo sviluppo dei lieviti della fioretta (principalmente *Pichia membranifaciens*, *Candida vini* e *Hansenula anomala*). Questi sono privi di attività fermentativa, formano veli superficiali spessi e fragili, si moltiplicano respirando l'alcool etilico e

Tab. 2 / Tassonomia e importanza enologica di alcune specie del genere *Saccharomyces*

Genere/specie	Sinonimi**	Importanza enologica
<i>S. cerevisiae</i>		Elevato vigore fermentativo, elevato potere alcoligeno, buona tolleranza all'SO ₂ , elevata adattabilità alle diverse condizioni
<i>S. bayanus</i>		Resistenza alle basse temperature, adatto per le rifermentazioni
<i>S. exiguus</i>	<i>Kazachstania exigua</i> <i>Torulaspota exigua</i>	
<i>S. kluyverii</i> (= <i>Lachancea kluyveri</i> *)	<i>Torulaspota kluyveri</i>	
<i>S. uvarum</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>uvarum</i>	Adatto alle fermentazioni a basse temperature

* (= nome corrente). **Sono riportati solo alcuni sinonimi. L'elenco completo ed i riferimenti bibliografici sono reperibili nel sito: <http://www.speciesfungorum.org> (data di accesso: marzo 2010). In rosso: importanza enologica

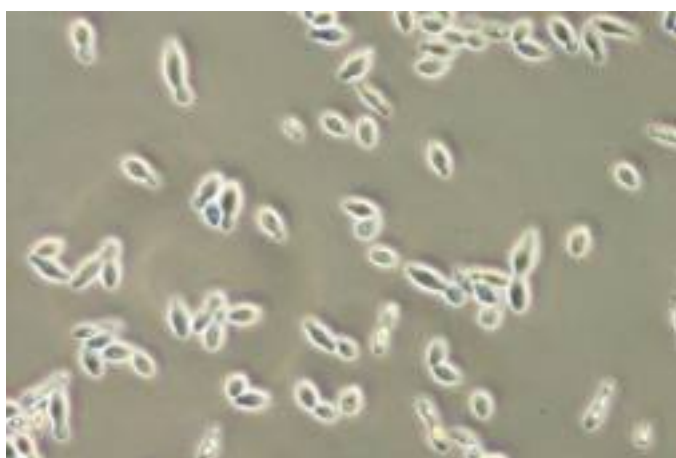
provocano una netta diminuzione del grado alcolico (Zambonelli 1988). Le possibili varianti, soprattutto in termini quantitativi, al quadro microbiologico sopra delineato sono innumerevoli in quanto lo sviluppo e l'attività di ogni specie dipendono da numerosi fattori come la tipologia delle specie presenti, la loro abbondanza relativa all'inizio del processo fermentativo,

la cinetica di crescita, l'entità dello sviluppo e la persistenza di ciascuna popolazione (Lambrechts e Pretorius, 2000). In tabella 1 e 2 riportiamo le specie di maggiore importanza per il settore enologico (per l'elenco completo dei sinonimi ed i relativi riferimenti bibliografici si rimanda al sito: <http://www.speciesfungorum.org>). I caratteri tecnologici riportati

sono da intendersi come caratteri medi delle singole specie perché esistono forti variabilità intraspecifiche.

La classificazione

L'identificazione e la classificazione dei lieviti si basa su informazioni differenti. In prima istanza, le proprietà fenotipiche e morfologiche sono state una fonte di informazione solida e consistente sulla quale si è basata la formazione dei ranghi tassonomici. In seguito, altre fonti di informazione sono state riconosciute nei polimeri costitutivi della cellula (polisaccaridi, proteine, lipidi) (Tanaka et al., 1966) e nei polimeri detentori dell'informazione genetica (DNA ed RNA). La disponibilità di tecniche di indagine molecolare sempre più avanzate ha portato a profondi cambiamenti nella tassonomia dei lieviti. Per quanto riguarda il genere *Saccharomyces*, negli



>> Fig. 2 / Cellule di *Saccharomyces ludwigii* fotografate al microscopio ottico (ingrandimento 40x) coltivate in terreno YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) ed incubate a 27 °C per 48 ore.

Tab. 3 / Proprietà genomiche dei ceppi da vino in comparazione a ceppi di laboratorio

Proprietà genomiche	Descrizione	Geni	Cromo-soma	Funzione	Ceppi	Fenotipo	Bibliografia
Omotallismo	Interconversione del tipo sessuale	<i>HO</i>	IV	endonucleasi necessaria per la conversione del locus MAT	Ceppi da vino	spore auto-fertili	Mortimer 2000
Polimorfismo cromosomico	Variazione nel numero e nella dimensione dei cromosomi	v	v	Incremento del numero di geni; protezione da danni ambientali	“	aneuploidia	Carro et al., 2003; Codon et al., 1998; Bakalinski e Snow 1990
Polimorfismo di singoli nucleotidi (SNP)	Variazione di singoli nucleotidi	-	v	generazioni di nuovi alleli	“	v	Borneman et al., 2008; Dunn et al., 2005
Cambiamento del numero di copie geniche	Variazione nel numero di copie di geni generalmente subtelomerici o vicini ad elementi trasposonici Ty						
<i>a) Duplicazioni</i>	Incremento del numero di copie geniche						
- <i>Extra copie dei geni ADH2 e ADH3</i>		<i>ADH2, ADH3</i>	XIII	alcol deidrogenasi	Ceppi isolati da vino Sherry	ossidazione dell'etanolo durante l'invecchiamento dei vini	Guijo et al. (1997)
<i>b) Delezioni</i>	Diminuzione del numero di copie geniche						
- <i>Delezioni dei geni ASP</i>		<i>ASP3</i>	XII	asparaginasi	Starter commerciali da vino	nd	Dunn et al. 2005
- <i>Delezioni dei geni HXT</i>		<i>HXT9, HXT11, HXT12</i>	X, XV, IX	trasportatori di esosi	“	nd	Dunn et al. 2005
Riarrangiamenti genici massivi							
- <i>Traslocazione fra il promoter del gene ECM34 e la regione 5' del gene SSU</i>	Promoter del gene <i>ECM34</i> controlla l'espressione del gene <i>SSU</i>	<i>SSU e ECM34</i>	XVI-VIII	<i>SSU</i> : Trasportatore transmembrana dei solfiti necessario per l'efficiente effuso dei solfito <i>ECM34</i> : funzione sconosciuta	Ceppo da vino T73	resistenza ai solfiti	Perez-Ortin et al., 2002
Presenza di nuovi geni	Geni presenti in ceppi industriali ed assenti in ceppi di laboratorio	<i>SDL1</i>	IX	serina deidratasi	Ceppo da vino AWRI1631	nd	Borneman et al., 2008
<i>v: localizzazione variabile, nd: non determinato</i>							

ultimi 100 anni, la sua classificazione sono suddivise in specie sono da sempre oggetto di continue revisioni (Ranieri e Pretorius, 2000). Attualmente il genere è suddivi-

so, in maniera non formale, in *Saccharomyces sensu stricto* e in *Saccharomyces sensu lato* (van der Walt, 1970). I *Saccharomyces sensu stricto* comprendono i lieviti che

danno le fermentazioni alcoliche più vigorose e più intense, quelli tipici del vino, della birra e del pane. I *Saccharomyces sensu lato* sono costituiti da diverse specie che

possiedono le caratteristiche tassonomiche del genere ma che non sono altrettanto vigorosi come i precedenti ed hanno altri habitat. Allo stato attuale (Kurtzman,

2003), il gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto* comprende 7 specie:

>>1. *Saccharomyces bayanus* Saccardo (1895);

>>2. *Saccharomyces cariocanus* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000);

>>3. *Saccharomyces cerevisiae* Mayen ex E.C. Hansen (1883) (type species of the genus *Saccharomyces*).

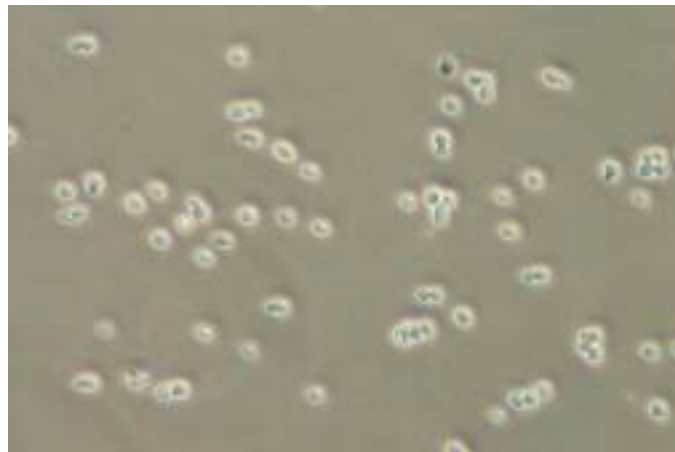
>>4. *Saccharomyces kudriavzevii* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000).

>>5. *Saccharomyces mikatae* Naumov, James, Naumova, Louis & Roberts (2000).

>>6. *Saccharomyces paradoxus* Bachinskaya (1914).

>>7. *Saccharomyces pastorianus* E.C. Hansen (1904).

Saccharomyces cerevisiae rimane la specie più importante che include la maggior parte delle razze fisiologiche e dei ceppi delle precedenti



>> Fig. 3 / Cellule di *Candida stellata* fotografate al microscopio ottico (ingrandimento 40x) coltivate in terreno YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) ed incubate a 27 °C per 48 ore.

classificazioni. I continui cambiamenti tassonomici hanno indotto spesso a numerose confusioni in campo enologico, per cui è frequente usare nomi di specie non più riconosciute, o ancor più grave usare omonimi per specie con caratteristiche tecnologiche opposte. Ad esempio, la specie *Saccharomyces bayanus* è stata de-

classata a razza fisiologica e poi nuovamente elevata alla piena dignità di specie. Ciò che ancor più complica la vita ai non addetti ai lavori è che alla specie sono stati in passato attribuiti ceppi molto alcool tolleranti ed indicati per le fermentazioni di vini molto alcolici, mentre attualmente la specie *S. bayanus* comprende anche ceppi melibiosio positi-

vi e criotolleranti che spesso hanno una bassa alcool tolleranza (Giudici et al. 1999; Rainieri et al. 1999). In aggiunta, tali ceppi hanno proprietà tecnologiche del tutto particolari: producono alte quantità di glicerolo, di acido succinico e di acido malico e quantità di acido acetico estremamente basse (Zambonelli et al., 1993; Kishimoto et al., 1994; Zambonelli et al., 1997; Rainieri et al., 1998; Castellari et al. 2002). Tali ceppi costituiscono un gruppo omogeneo dal punto di vista molecolare, fenotipico e tecnologico tanto che è stata proposta una specie distinta da *S. bayanus*, chiamata *S. uvarum* (Rainieri et al., 1998). Il risultato finale è che, in campo enologico, sono contemporaneamente in uso tutte le accezioni: *S. bayanus* in senso storico, *S. bayanus* comprendente il gruppo dei *S. uvarum* criotolleranti e la specie *S. uvarum*.

S.cerevisiae: origine controversa

Benché *S. cerevisiae* sia la specie responsabile della fermentazione alcolica e domini la fase finale della fermentazione, essa è difficilmente isolabile dalle bacche degli acini d'uva e dai suoli della vigna (Phaff et al. 1978; Rosini et al., 1982; Martini e Vaughan-Martini, 1990, 1995; Martini et al. 1996). Al contrario *S. cerevisiae* è estremamente abbondante su tutte le superfici della cantina (Rosini 1984; Constantini et al., 1997; Santamaria et al., 2005; Mercado et al., 2007).

Tab. 4 / Definizione di flora gastrointestinale adattata da Berg (1996).

Definizione di microflora GI secondo Dubos et al. (1965)

Autoctona	Microrganismi presenti durante l'evoluzione di un animale e perciò presenti in tutte le comunità di una particolare specie animale.
Normale	Microrganismi che si stabiliscono in tutti i membri di una particolare comunità di una specie animale ma non necessariamente in tutte le comunità di questa specie animale.
Patogena	Microrganismi acquisiti accidentalmente e perciò non normalmente presenti in tutti i membri di una comunità di una specie animale.

Definizione di microflora GI secondo Savage (1977)

Autoctona	Microrganismi residenti in tutte le comunità di una particolare specie animale con le seguenti proprietà: - possibilità di crescere nel tratto GI di un animale; - sempre presenti nel tratto GI di un normale adulto; - colonizzano particolari tratti GI, habitat o nicchie; - mantengono stabile climax GI; - spesso intimamente associati con la mucosa e l'epitelio GI.
Alloctona	Microrganismi non necessariamente presenti in tutte le comunità ne presenti in tutti i membri di una singola comunità animale.

Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che *S. cerevisiae* sia una specie “domesticata” associata all’attività antropica ed originata da *Saccharomyces paradoxus*, un lievito frequentemente associato in natura agli insetti, agli essudati delle piante (Legras et al., 2007) e agli acini d’uva (Redžepović et al. 2002). L’ipotesi della domesticazione ha suggerito che specifici ceppi di *S. cerevisiae* possono presentare un adattamento a determinati microambienti e che ceppi isolati da una data microarea sono i più idonei per produrne i vini, dando origine al mito dei lieviti autoctoni (Martini e Vaughan-Martini 1990).

Pur convenendo sull’esiguità di *S. cerevisiae* sugli acini d’uva integri (la popolazione iniziale di *S. cerevisiae* sugli acini è stata stimata essere fra 10^2 e 10^3 cellule per acino), altri autori hanno dimostrato che le cellule di *S. cerevisiae* sono numerose sulle bacche di uva alterate (10^4 - 10^5 cellule per acino), come pure negli alveari e nelle api e che pochi acini alterati possono costituire un’importante fonte di inoculo dei mosti (Mortimer e Polsinelli, 1999; Torok et al., 1996). Negli acini danneggiati l’intensa competizione con altri microrganismi porta alla selezione di ceppi di *S. cerevisiae* capaci di crescere ad alti livelli di etanolo, bassi valori di pH e in presenza di numerosi stress osmotici (Landry et al. 2006; Replansky et al. 2008). L’esistenza di *S. cerevisiae* come specie distinta non correlata ad attività umane è sta-

Tab. 5 / Modulazione della qualità dei vini mediante utilizzo di specie non-Saccharomyces in colture multistarter con *S. cerevisiae*

Genere e specie	Multistarter* in combinazione con <i>S. cerevisiae</i>	Riferimenti bibliografici
Candida		
– <i>C. pulcherrima</i>	Incremento dell’aroma fruttato, della concentrazione di alcoli superiori, terpenoli ed esteri	Rodriguez et al. (2010)
– <i>C. stellata</i>	Incremento del glicerolo, consumo del fruttosio Modulazione della componente aromatica	Ciani e Comitini (2006) Jolly et al. 2003; Soden et al. (2000)
– <i>C. cantarelli</i>	Aumento del glicerolo	Toro e Vazquez (2002)
Debaryomyces vanriji	Incremento delle β -glucosidasi, modulazione della componente aromatica (aumento geraniolo)	Garcia et al. (2002)
Hanseniaspora		
	Incremento dei composti volatili e della produzione di glicosidasi e proteasi	Capace et al. (2005)
– <i>H. guillermondii</i>	Incremento degli esteri dell’acetato	Rodriguez et al. (2010)
	Incremento degli alcoli superiori	Moreira et al. (2008)
– <i>H. uvarum</i>	Incremento degli alcoli superiori	Moreira et al. (2008)
– <i>H. uvarum/K. apiculata</i>	Incremento dei composti volatili e degli alcoli superiori	Gil et al. (1996)
Kloeckera		
– <i>Kl. apiculata</i>	Incremento del n-propanolo, riduzione dell’acetoino	Zironi et al. (1993)
– <i>Kl. apiculata/T. delbrueckii</i>	Modulazione della componente volatile	Herraiz et al. (1990)
Kluyveromyces thermotolerans	Diminuzione dell’acido acetico; incremento di terpenoidi; incremento di acido lattico	Mora et al. (1990)
Metschnikowia pulcherrima	Incremento della componente aromatica	Parapouli et al. (2009)
Pichia		
– <i>P. anomala</i>	Incremento degli esteri dell’acetato	Rojas et al. (2003)
	Incremento delle esterasi	Kurita (2008)
– <i>P. kluyveri</i>	Incremento dei tioli (3-mercaptoexanol acetato o 3MHA)	Anfang et al. (2008)
– <i>P. fermentas</i>	Incremento degli alcoli superiori	Clemente-Jimenez et al. (2005)
Schizosaccharomyces pombe	Consumo di acido malico	Silva et al. (2003)
Torulaspota delbrueckii	Diminuzione dell’acidità volatile	Moreno et al. (1991); Bely et al. (2008)
	Alta produzione di terpenoidi	King e Dickinson (2000)

*si intendono sia colture miste che inoculi sequenziali fra specie non-Saccharomyces e *S. cerevisiae*.

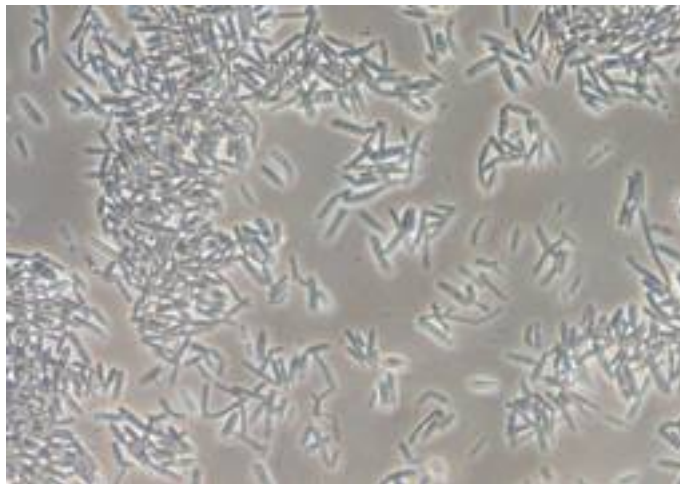
ta dimostrata in numerosi lavori. Al pari di *S. paradoxus*, *S. cerevisiae* è frequentemente associato a essudati di quercia e al suolo (Naumov et

al., 1998; Sniegowski et al. 2002) ed è stato isolato in habitat naturali distinti dall’ambiente “vigna” (Slavikova e Vadkertiova 1997). Fay e Be-

navides (2005) hanno stimato che ceppi isolati da vino potrebbero essere evolutivamente derivati da popolazioni naturali di *S. cerevisiae* non

associate con la produzione di bevande alcoliche.

Recentemente le moderne tecniche di sequenziamento hanno fornito nuove informazioni riguardanti la variabilità genetica intraspecifica ed hanno aperto la possibilità di correlare variazioni del fenotipo a variazioni del genoma. Liti et al. (2009) suggeriscono una consistente differenza evolutiva tra il lievito "selvaggio" *S. paradoxus* e il "domestico" *S. cerevisiae* (Liti et al., 2009). Benché questi studi siano ancora ad uno stadio iniziale ed il numero di individui analizzati sia ancora estremamente basso, è possibile dire che ceppi di *S. cerevisiae* ad uso enologico presentano una serie di caratteristiche genetiche distintive rispetto ai ceppi di laboratorio: sono estremamente variabili per numero di set cromosomici (ploidia), mostrano numerosi amplificazioni o delezioni geniche, cambiamenti nel numero di cromosomi e massivi riarrangiamenti cromosomici rispetto (Tab. 3). Questi dati preliminari non sostengono la tesi della domesticazione, ma suggeriscono che la plasticità genomica fornisce diversità genetica su cui i meccanismi di selezione naturale possono operare. Il vino è un ambiente estremamente selettivo che esercita una forte pressione per cui è atteso che i ceppi di *S. cerevisiae* isolati nel vino abbiano riarrangiamenti genici e proprietà genomiche differenti da ceppi di *S. paradoxus* o di *S. cerevisiae* isolati in altre nicchie. Tuttavia, non si pos-



>> Fig. 4 / Cellule di *Pichia anomala* fotografate al microscopio ottico (ingrandimento 40x) coltivate in terreno YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) ed incubate a 27 °C per 48 ore.

sono usare queste evidenze per dire che i lieviti isolati in un dato vino siano i migliori per produrre quel vino, perché non c'è nessuna pressione selettiva che guidi la selezione del ceppo che fa il vino di nostro gradimento.

Domesticazione: un po' di chiarezza

La tesi della domesticazione di *S. cerevisiae* è molto suggestiva ed ha portato all'idea dei lieviti del territorio, i cosiddetti "lieviti autoctoni", selezionati in quel particolare ambiente e che conferiscono qualità peculiari ai vini del luogo. Alcuni autori sostengono che ceppi simili possano essere riscontrati nella cantina in anni successivi e che questi ceppi "autoctoni" o "residenti" abbiano un ruolo importante nella fermentazione spontanea dei mosti (Ciani et al., 2004; Mercado et al., 2007). Altri sostengono che i dati a sostegno di queste ipotesi sono ancora estremamente limitati (Fleet 2008) e non tengono conto di molti altri

fattori che influenzano le dinamiche di popolazione durante la fermentazione spontanea, come le procedure di spremitura delle uve, il loro grado di maturazione, la macerazione a freddo, la qualità dei processi di sanitizzazione degli attrezzi di cantina (Hiero et al., 2006; Sturm et al., 2006). L'unico dato costante è sempre l'elevato numero di cellule di *S. cerevisiae* a fine fermentazione.

L'esiguità di *S. cerevisiae* sulle uve e la sua abbondanza nei mosti trova una spiegazione nella pressione selettiva esercitata dal mezzo che penalizza le specie meno idonee a vantaggio di *S. cerevisiae*. La fermentazione alcolica in cui incorrono i mosti frigoconservati fornisce un valido esempio di pressione selettiva: i ceppi isolati con grandissima frequenza e responsabili di tale fermentazione sono tutti criotolleranti ed appartenenti alla specie *S. uvarum*. Tale specie è difficilmente isolabile nel vigneto o nei mosti a temperatura am-

biente. Ciò non dimostra che sia una specie evoluta in cantina con l'impiego del freddo, ma soltanto che le basse temperature ne hanno favorito la crescita. Mosto e acini danneggiati esercitano pressioni selettive simili: in tali ambiente strettamente selettivi le specie non-*S. cerevisiae*, frequenti sulle bacche sane, risultano svantaggiate, consentendo la crescita di una specie fortemente minoritaria ma altamente alcool-tollerante come *S. cerevisiae*.

L'esistenza di *S. cerevisiae* come specie distinta in habitat naturali non correlati ad attività umane ed il ruolo della pressione selettiva come forza modificatrice del rapporto fra le specie pongono seri dubbi sulla validità della tesi della "domesticazione" in senso stretto. Il termine "domesticazione" (dal latino *domesticus*) infatti indica il processo attraverso cui una popolazione di animali o piante si adatta al controllo umano attraverso un processo di selezione artificiale. Infatti è opportuno ricordare che, al pari di una pianta o di un animale, affinché si possa definire domesticato un lievito, è necessario dimostrare che il lievito abbia acquisito caratteristiche vantaggiose per l'uomo attraverso la sua attività intenzionale o meno. Diamond (2002) fornisce un'ottima definizione di specie domesticata: è una specie allevata in cattività e perciò modificata rispetto al suo "antenato" selvaggio in un modo da essere più utile per l'uomo che ne controlla la riproduzione ed l'accesso al cibo. Domestica-

zione è perciò un concetto distinto dal mero “addomesticamento” di animali nati selvaggi. Diamond fa l'esempio di alcune specie di elefanti africani, utilizzati per secoli come animali da soma ma non per questo domesticati, non essendo la loro riproduzione sotto il controllo umano. Se consideriamo queste evidenze e le applichiamo alla microbiologia enologica, prende forza l'ipotesi alternativa alla domesticazione: le condizioni che si vengono a creare durante le fermentazioni spontanee selezionano quegli isolati naturali che presentano casualmente le migliori caratteristiche alcoligene e di alcool-tolleranza e questi isolati sono stati utilizzati dall'uomo per la produzione di bevande fermentate.

Un altro punto da sottolineare è che l'analogia lieviti piante e animali domestici non regge perché la procedura di domesticazione di piante ed animali ha richiesto l'intervento volontario, sebbene empirico, dell'uomo. La volontarietà nella scelta dei riproduttori, delle piante migliori ha di fatto determinato una forte pressione selettiva sui ricombinanti naturali guidandone l'evoluzione. Anche al giorno d'oggi, nonostante Mendel e la biologia molecolare, la strategia è sempre la stessa: isolare, produrre, selezionare ed impiegare i ricombinanti più idonei agli obiettivi desiderati.

Autoctoni ed indigeni: non solo una questione semantica

In microbiologia medica, il



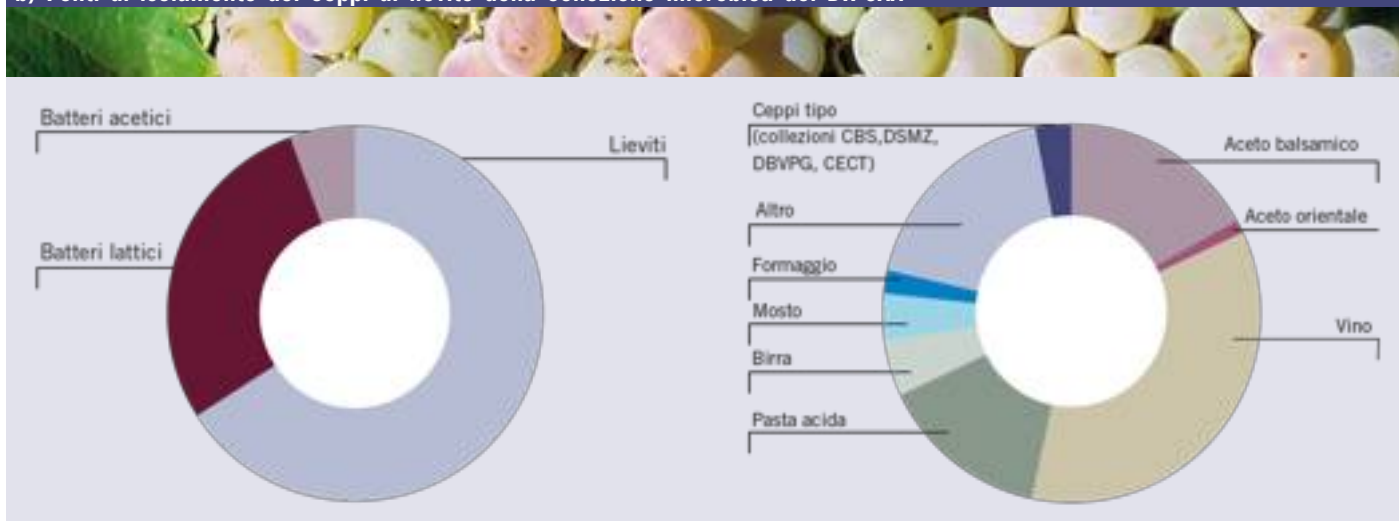
>> Fig. 5 / a) Collezione di ceppi di lievito conservata a +4 °C in terreno YPDA (Yeast Extract, Peptone, Dextrose, Agar).
b) Collezione di ceppi di batteri lattici e batteri acetici conservata a +4 °C in terreni specifici di mantenimento.

termine “autoctono” viene generalmente utilizzato per indicare microorganismi presenti in nicchie ristrette e ben definite, dove la pressione selettiva esercitata è costante nel tempo. In particolare il termine è stato inizialmente introdotto per descrivere i microorganismi del tratto gastro-intestinale (GI) e poi successivamente mutuato alla microbiologia alimentare. In Tabella 4 sono riportate le definizioni dei rispettivi termini utilizzati per descrivere la microflora del tratto GI degli animali. Per poter utilizzare l'aggettivo autoctono propriamente anche in microbiologia alimentare, un microorganismo deve sempre essere presente nell'alimento o nell'ambiente di riferimento. In campo enologico il concetto dei lieviti autoctoni è stato

spinto fino alla specificità della cantina, ipotizzando la presenza di lieviti caratteristici per ogni singola cantina. Se così fosse in ognuna dovremmo poter isolare sempre gli stessi ceppi e ciò non è dimostrato. Invece, nostre esperienze su mosti in fermentazione di diverse cantine escludono la presenza di lieviti specifici di cantina o di territorio. Inoltre la continua cross-contaminazione fra vigna e cantina, probabilmente mediata da insetti, uccelli, acque di scarico e dalle bucce degli acini nei siti di smaltimento escludono di poter considerare la cantina come nicchia ristretta e definita (Phaff e Starmer 1987; Mortimer e Polsinelli 1999; Valero et al. 2005; Ribereau-Gayon et al. 2006; Mercato et al., 2007). Altri fattori

contribuiscono a rendere difficile la colonizzazione stabile della cantina da parte di ceppi autoctoni: la discontinuità intrinseca al processo enologico e la sanitizzazione degli ambienti e degli attrezzi della cantina. Tutti questi elementi depongono a sfavore dell'utilizzo di questo termine per indicare i lieviti presenti in un vino e il termine “indigeno” sembra più corretto. Il termine “autoctono” marca troppo il rapporto tra luogo, tempo e ceppo, lasciando intendere una dipendenza non dimostrata. Il termine “indigeni” è molto più appropriato per definire i lieviti presenti in un mosto, in una cantina od in un vigneto, e con esso si intendono i lieviti presenti in un determinato momento, senza pretese di continuità temporale.

Fig. 6 / a) Composizione della collezione microbica del Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti (DIPSAA).
b) Fonti di isolamento dei ceppi di lievito della collezione microbica del DIPSAA



La selezione per caratteri

La scelta del ceppo di lievito per vinificazione è il fattore che maggiormente influenza il successo della fermentazione alcolica dei vini. La selezione ed il miglioramento genetico di uno ceppo microbico deve essere effettuato sulla base di specifiche funzioni ed abilità, piuttosto che sulla base della sua fonte di isolamento o sulla sua provenienza geografica (Giudici et al., 2005). Nel caso della vinificazione, i criteri di selezione sono stati definiti da Giudici e Zambonelli (1992) e ripresi da numerosi autori. Per le sue caratteristiche alcoligene e di alcool-tolleranza la specie d'elezione per la conduzione della fermentazione alcolica è *S. cerevisiae*, ed in genere il processo di selezione viene condotto a livello di ceppo. Un'altra specie d'interesse enologico è *S. uvarum*, il cui utilizzo in vinificazione è legato all'abilità di fermentare a basse temperature e di pro-

durre alte quantità di glicerolo e β -feniletanolo (Rainieri *et al.*, 1999).

I vini ottenuti mediante una fermentazione spontanea andata a buon fine sono una fonte preziosa di materiale biologico per lo screening di una coltura starter. Questo perché le condizioni estremamente selettive del mosto in fermentazione hanno già effettuato una pre-selezione, consentendoci di isolare solo ceppi in grado di crescere in condizioni di bassi valori di pH e di stress osmotico, termico e ossidativo. La selezione clonale rappresenta il punto di partenza per qualunque strategia di messa a punto di starter enologici. L'elevato numero e la complessità genetica di molti caratteri riducono la possibilità di riscontrare casualmente in un unico ceppo una combinazione così ampia di caratteri fenotipici e di determinanti genetici. Il ricorso a tecniche di miglioramento genetico, come la costituzione di ibridi inter ed intraspe-

cifici, consente di aumentare la diversità fenotipica della popolazione microbica e le possibilità combinatoriali dei determinanti genetici. Per questo la selezione di una coltura starter enologica, come di qualsiasi altro "biocatalizzatore", è un processo multi-disciplinare che non include solo l'isolamento, l'identificazione la caratterizzazione della performance metabolica e fermentativa dei ceppi, ma anche lo studio dei determinanti genici di ogni carattere e l'implementazione di tecniche di miglioramento genetico (Giudici et al. 2005).

Non solo *Saccharomyces*

Anche se la specie per antonomasia della fermentazione alcolica dei vini è *S. cerevisiae*, recentemente specie come *Candida stellata* (Fig.3) e *Pichia anomala* (Fig.4) ed altre appartenenti ai generi *Hanseniaspora* e *Kluyveromyces* sono state proposte

come starter con l'intento di aumentare la complessità sensoriale dei vini o di enfatizzarne la tipicità (Heard, 1999; Ciani et al., 2002; Jolly et al., 2003; Fleet 2003). I principali limiti legati alla loro utilizzazione sono rappresentati dalla loro scarsa alcool-tolleranza, dalla produzione di off-flavors e dall'incremento dell'acidità volatile che in genere caratterizza il loro sviluppo in vino. La realizzazione di starter multipli, in associazione con ceppi di *S. cerevisiae*, in genere consente di ridurre questi inconvenienti, realizzando fermentazioni controllate che portano a vini ricchi in bouquet fruttati e complessi (Tab. 5). Le tipologie di starter multiplo possono essere due: i) lo starter sequenziale prevede l'inoculo del ceppo non-*Saccharomyces* qualche giorno prima dell'inoculo di *S. cerevisiae*; ii) il coinoculo prevede l'allestimento di una coltura mista di un ceppo non-*Saccharomyces* e di un ceppo *S. cerevisiae*.

In genere l'utilizzo di uno starter multiplo può dare un prodotto finale che è differente dalla somma delle proprietà dei due vini ottenuti mediante fermentazioni monoculturali (Howell et al. 2006). La coltura mista influenza le performance metaboliche dei singoli ceppi in un modo che è spesso ancora poco compreso e non prevedibile. Per questo l'impiego di uno starter multiplo impone il controllo rigoroso dei parametri tecnologici e di fermentazione, nonché una seria valutazione sensoriale del vino per garantire la sicurezza e la qualità del prodotto (Fleet 2008).

Il ruolo delle collezioni microbiologiche

Le collezioni microbiche sono un supporto indispensabile per la selezione di colture starter, anche in campo enologico. Oltre alla conservazione fisica dei ceppi, le collezioni hanno cura di preservarne la stabilità genetica e di raccogliere le informazioni significative tipo genomico, trascrittomico, proteomico e metabolomico da cui attingere per implementare l'impiego dei microrganismi in campo biotecnologico, industriale ed alimentare. Attualmente oltre 470 collezioni di microrganismi sono state realizzate in oltre 62 Paesi con il comune intento di acquisire, autenticare, preservare e distribuire materiale biologico (fonte wdcm.nig.ac.jp). Nonostante il numero di collezioni sia in continua espansione grazie all'uso sempre più prominen-

te dei microrganismi in campo industriale, in Italia quelle riconosciute dall'Organizzazione Europea delle collezioni di colture (European Culture Collections Organisation - ECCO) e dalla Federazione Mondiale delle collezioni di colture (World Federation for Culture Collections - WFCC) risultano essere ancora piuttosto limitate. Difatti il management di una collezione rappresenta un compito molto arduo nel rispetto delle linee guida e degli standard operativi raccomandati dalle suddette organizzazioni e necessita di figure professionali qualificate dedicate alla gestione della collezione e responsabili delle pratiche riguardanti: la preparazione di terreni di crescita idonei per i diversi microrganismi; la messa a punto delle adeguate tecniche di conservazione; la verifica periodica della purezza e vitalità dei ceppi; la gestione del database informatico (Fig. 5a e 5b) (De Vero e Giudici, 2010).

La collezione dei microrganismi presente nel laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti (DIPSAA) dell'Università di Modena e Reggio Emilia, seppur piccola, attualmente vanta la presenza di circa 2400 ceppi di lieviti, batteri lattici e batteri acetici isolati da numerose matrici alimentari (Fig. 6a e 6b) ed oggetto di approfondite ricerche al fine di ottenerne un'accurata caratterizzazione fenotipica e molecolare. Alcuni ceppi di lievito ad uso enologico sono già in commercio sotto for-

ma di lievito secco attivo e attualmente sono in corso sperimentazioni su scala reale di nuovi ceppi che hanno già mostrato in laboratorio ottima attitudine alla vinificazione. Oltre ai circa 1600 lieviti, in collezione sono presenti circa 330 ceppi di batteri lattici isolati da vini durante la fermentazione malolattica. Tra questi, sono stati selezionati e caratterizzati numerosi ceppi di *Oenococcus oeni* idonei a condurre il processo malolattico (Solieri et al., 2010).

La selezione del futuro

Le caratteristiche principali richieste ad un ceppo di lievito da impiegare in vinificazione sono sensibilmente cambiate nel tempo. I primi ceppi di lievito selezionati risalgono agli anni 50-60 e dovevano possedere poche caratteristiche: una buona tolleranza alla SO₂, una buona energia fermentativa, tempi brevi di fermentazione ed assenza di aromi sgradevoli. Queste caratteristiche essenziali erano in sintonia con la tecnologia ed le esigenze dell'enologia del passato. Tuttavia, il processo di selezione e miglioramento genetico è in continuo divenire perché le innovazioni tecnologiche e le preferenze del consumatore inducono la ricerca di nuovi caratteri. L'impiego su larga scala delle fermentazioni a bassa temperatura ha determinato la richiesta di ceppi criotolleranti, mentre la necessità di eliminare i solfiti dai vini spinge oggi alla selezione di lieviti che non producono solfiti. È

intuitivo che un programma di miglioramento si basa sulla conoscenza dei tratti desiderati e geneticamente trasmissibili, mentre le tecniche e le strategie da impiegare sono successive all'individuazione delle proprietà richieste. La grande variabilità a livello del genoma genera l'eterogeneità fenotipica all'interno della specie *S. cerevisiae*. Gli studi genetici e molecolari sulla variabilità genomica e metabolica di *S. cerevisiae* non sono soltanto speculazioni accademiche, ma hanno importanti ripercussioni pratiche. In particolare, aumentano le conoscenze scientifiche necessarie per la selezione di nuovi starter ad uso enologico, consentendo di stabilire una diretta correlazione fra genotipo e fenotipo e di definire esattamente come ogni specifico starter influenza la qualità del prodotto finale. I ceppi del futuro devono essere ceppi tecnologicamente compatibili, salubri ed in grado di conferire proprietà sensoriali definite ed apprezzabili allo scopo di disegnare vini in grado di soddisfare i gusti del consumatore. Infine, non è da escludere l'impiego di ceppi di specie diverse da *S. cerevisiae*, sia direttamente che come materiale genetico nei programmi di miglioramento. La costituzione di ibridi inter ed intraspecifici sono le strategie più promettente nel breve periodo per combinare caratteri quantitativi determinati da più geni. ●

Bibliografia e summary sono disponibili a richiesta