

# Selezione e monitoraggio di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* durante la produzione di vino da uva Catalanesca

Giuseppe Blaiotta\*, Raffaele Romano, Cristina Imperato e Maria Aponte

DSA, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

\*Corresponding author: Tel. 081 25 39 451, Fax 081 25 39 407, e-mail: blaiotta@unina.it.

## Introduzione

Introdotta nelle campagne di Somma da Alfonso I d'Aragona già nel XIV secolo, la Catalanesca rappresenta oggi un vitigno a buccia bianca tipico della Campania. Tale varietà è nota ai più come vitigno da tavola e come tale è iscritta nel Registro Nazionale delle varietà di vite. Tuttavia storicamente, l'uva Catalanesca è stata adoperata per la produzione di vino che suscita l'interesse di un numero sempre crescente di estimatori

Di fatto, il mosto di Catalanesca è in grado di raggiungere un'elevata gradazione zuccherina ed, inoltre, acidità totale e pH sono tali da permettere l'ottenimento di un vino bianco secco caratterizzato da un buon equilibrio gustativo. Dal punto di vista aromatico il vino presenta note fruttate con odori tipici di albicocca secca e miele.

La "Catalanesca" a maturazione tardiva si conserva bene sulla pianta e in fruttajo, resiste bene ai trasporti e per tale caratteristica riveste interesse economico anche al di fuori dell'areale di produzione ove è utilizzata per la vinificazione da sola o con altri vitigni. Tuttavia, notevoli variazioni possono essere registrate a seconda del produttore o dell'annata.

Lo scopo di questo lavoro è stato la selezione e caratterizzazione di ceppi di *Saccharomyces (S.) cerevisiae* al fine di produrre uno starter autoctono in grado di condurre un regolare processo fermentativo ed esaltare le caratteristiche organolettiche del vino Catalanesca.

## Materiali e Metodi

*Identificazione e biotipizzazione degli isolati.* In questo studio sono stati analizzati 39 ceppi di *Saccharomyces* spp. isolati durante diverse fasi di un processo di vinificazione spontanea di uva Catalanesca e di cui 22 già oggetto di un precedente studio (Di Maro *et al.*, 2006). L'identificazione dei ceppi è stata ottenuta mediante analisi RFLP del gene 5.8S del rRNA e dei due "Internal Transcribed Spacers" ITS1 e ITS2, adoperando enzimi di restrizione (*Hae III*, *Cfo I* e *Hinf I*) secondo la metodica descritta da Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Ceppi rappresentativi di ciascun profilo PCR-RFLP sono stati sottoposti a sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rRNA (Kurtzman & Robnett, 1997) onde confermarne il taxa di appartenenza. Per la biotipizzazione molecolare dei ceppi sono stati utilizzati marcatori quali l'analisi dell'interdelta (Legras *et al.*, 2003) e dei minisatelliti (AGA1, DAN4, HSP150, SED1) (Marinangeli *et al.*, 2004).

*Selezione tecnologica dei ceppi.* Diciassette ceppi caratterizzati da differente biotipo sono stati valutati per i seguenti parametri: potere fermentativo (16°C) in mosto di Catalanesca (23°Brix e 20,1°Babo), produzione di H<sub>2</sub>S su Biggy Agar (Oxoid), attività β-glucosidasi secondo Fia *et al.* (2005), attività amilolitica mediante reattivo di Lugol, attività pectinolitica (Blanco *et al.*, 1994), resistenza all'alcol (0-13%) in YPD Broth (Oxoid), resistenza alla SO<sub>2</sub> (120 mgL<sup>-1</sup> di SO<sub>2</sub> totale) in combinazione con alcool, resistenza a diversi fitofarmaci.

*Prove di fermentazione.* Due ceppi scelti in funzione delle performances tecnologiche sono stati utilizzati per inoculare 25 L di mosto d'uva Catalanesca, cui erano stati aggiunto 30 mg/L SO<sub>2</sub>.

Mosto di Catalanesca non inoculato è stato utilizzato come controllo. La fermentazione è stata condotta in cella a 15°C. Il processo è stato monitorato al tempo 0 e dopo 2, 4, 7, 11, 17 e 100 gg.

Ad ogni prelievo sono stati valutati: microflora blastomicetica su DRBC agar (Oxoid), pH, °Brix, acidità volatile, acidità totale, zuccheri riducenti, grado alcolico, polifenoli totali, colore, SO<sub>2</sub> libera e SO<sub>2</sub> totale. Sessantatre isolati da piastre di DRBC agar sono stati

sottoposti ad analisi ITS e digestione con l'endonucleasi di restrizione *Hae* III, nonché ad analisi dell'interdelta. Per i ceppi con ITS diverso da quello previsto per *S. cerevisiae* si è proceduto all'identificazione per sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rRNA. I protocolli adoperati in questa fase sono stati i medesimi innanzi descritti.

### **Risultati e Discussione**

Trentanove dei 42 ceppi analizzati, mostravano un profilo ITS rappresentato da una sola banda di peso molecolare pari a 850 bp, i restanti 3 presentavano un ITS di 450 bp. La digestione con *Hae* III ha consentito di riferire 32 ceppi alle specie *S. cerevisiae* e a *S. paradoxus* (profilo A), mentre il profilo di 7 ceppi non coincideva con nessuno dei profili di restrizione attesi tra i *Saccharomyces* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Il sequenziamento ha rilevato l'inserzione di un nucleotide C che crea un sito di restrizione in più per *Hae* III (profilo B). L'analisi dell'interdelta ha individuato 17 profili differenti. Tale metodo ha dato risultati migliori rispetto alla tecnica RAPD-PCR utilizzata nel lavoro di Di Maro *et al.* (2006) su 22 isolati considerati anche nel presente studio. Un isolato per ciascun profilo è stato sottoposto all'analisi dei minisatelliti. Con AGA1 i ceppi analizzati risultano tutti uguali tra loro, con SED1 si ottengono solo due profili diversi, con HSP150 cinque. Il minisatellite che ha rivelato più differenze è stato il DAN4 con sei profili diversi

Per quanto riguarda la valutazione tecnologica, per prima cosa è stato valutato il potere fermentativo: due ceppi hanno prodotto una quantità di alcol (16,8° e 15,6° alcolici) superiore a quella dei ceppi commerciali testati (LSA: 190 - 191 e 192).

Sebbene a livelli differenti, tutti i ceppi sono risultati produttori di H<sub>2</sub>S e dotati di attività  $\beta$ -glucosidasi, mentre nessuno è risultato in grado di degradare l'amido e la pectina.

Riguardo alla resistenza all'alcol tutti i ceppi hanno presentato ottimo livello di crescita alle concentrazioni 7%, 8% e 9%. Al 12% di alcol solo alcuni ceppi hanno mostrato una modesta crescita. Inoltre, i ceppi non hanno mostrato differenze di crescita se in presenza di solo alcol o di alcol e anidride solforosa.

Per quanto riguarda i fitofarmaci si è notata una certa variabilità di comportamento tra i vari ceppi nei confronti del Galben 8-65BLU e del Galben 4-33 BLU, soprattutto a diluizioni meno spinte. Tutti i ceppi sono risultati sensibili alla pasta rameica azzurra e al solfato di rame pentaidrato; mentre tutti sono risultati resistenti alle varie concentrazioni testate del fitofarmaco Domark 4EL.

Due ceppi, caratterizzati dalle migliori attitudini tecnologiche sono stati adoperati come starter in una fermentazione di 25 L di mosto d'uva Catalanesca.

Dal monitoraggio della microflora blastomicetica su DRBC agar è emerso un andamento simile nei due mosti inoculati, sebbene nel campione B la fase di adattamento sia stata lievemente più lunga e nel campione A la fase di declino leggermente più ripida. Il controllo è stato caratterizzato, invece, da un iniziale abbassamento della popolazione imputabile all'azione dell'SO<sub>2</sub> sulle cellule di lievito appartenenti a specie tipiche dei primi momenti della fermentazione. Alla fine, però, è risultato avere una popolazione più alta rispetto agli altri due campioni.

Il grado alcolico raggiunto sia per il campione A sia per quello B è stato più alto di quello del controllo, in particolare il più alto si è ritrovato nel campione A, che presenta, peraltro, anche un contenuto in polifenoli totali più elevato rispetto agli altri due campioni; inoltre anche per l'acidità totale il valore più basso si è riscontrato nel campione A.

I valori di SO<sub>2</sub> libera e totale più bassi si sono ottenuti nel controllo. In generale, l'SO<sub>2</sub> totale decresce fino dal 1° giorno, per poi aumentare considerevolmente al centesimo giorno per la presumibile presenza di lieviti produttori di anidride solforosa nelle ultime fasi della fermentazione. Il valore di zuccheri riducenti maggiore si è, invece, registrato nel controllo.

Durante le fermentazioni sono state isolate 21 culture da ciascuna delle tre tesi. Per tutti gli isolati è stata effettuata un'analisi ITS-RFLP con *Hae* III. Nel campione A e B è risultato prevalente il profilo tipico dei ceppi adoperati quali inoculi; in A tuttavia sono stati tuttavia

isolati anche due ceppi con il tradizionale profilo di *S. cerevisiae*, i soli ritrovati nella fermentazione di controllo.

L'analisi interdelta sui ceppi ha consentito di verificare che i ceppi adoperati per l'inoculo avevano effettivamente preso il sopravvento in fermentazione.

Successivamente si è proceduto al sequenziamento dell'amplificato ITS degli isolati con ITS diverso da 850 bp. La maggior varietà di specie si è riscontrata nel campione B e nel controllo, anche se è nel controllo che si è avuto il numero più alto di ceppi non-*Saccharomyces*. La presenza di queste specie è indice di una buona biodiversità nella popolazione dei lieviti caratteristici delle fermentazioni spontanee ed è dovuto all'assenza di inoculo (Tabella 1). In definitiva, l'utilizzo di tecniche molecolari ha consentito di monitorare il comportamento dei lieviti utilizzati come starter in una vinificazione di uva Catalanesca, rendendo possibile seguirne l'evoluzione nel corso della fermentazione.

In tal senso, l'analisi ITS si è rivelata la tecnica migliore per raggruppare speciograficamente tra gli isolati, mentre l'analisi interdelta è risultata essere la migliore per la differenziazione intra-specifica dei ceppi afferenti alla specie *S. cerevisiae*. In altri termini, le tecniche molecolari utilizzate si sono rivelate un valido strumento di indagine e che l'analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni è un ottimo metodo per ottenere un'equivoabile identificazione. In conclusione, nel corso di questo studio è stato possibile selezionare ceppi di *S. cerevisiae* che riescono a dominare il processo fermentativo e che possono pertanto essere proficuamente impiegati nella produzione di vino da uva *Catalanesca*.

I vini ottenuti mediante l'impiego dei due ceppi autoctoni hanno presentato caratteristiche chimiche e sensoriali migliori rispetto al vino ottenuto per vinificazione spontanea.

**Tabella 1.** Taxa e relativa distribuzione dei lieviti isolati durante il monitoraggio delle 3 vinificazioni effettuate.

Fase (gg)	Campione A (Syz32a)						Campione B (Syz35b)						Campione C (controllo)								
	CFU/ml	N° ceppi isolati	<i>Campylobacter</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> A*	<i>S. cerevisiae</i> B*	CFU/ml	N° ceppi isolati	<i>M. pulcherrima</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>As. oryzae</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> A*	<i>S. cerevisiae</i> B*	CFU/ml	N° ceppi isolati	<i>M. pulcherrima</i>	<i>As. oryzae</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>S. cerevisiae</i> A*	<i>S. cerevisiae</i> B*
0	2,2*10 <sup>6</sup>	3	1	2			1,3*10 <sup>6</sup>	5						2,2*10 <sup>6</sup>	5						
3	1,7*10 <sup>6</sup>	3		1		2	3,8*10 <sup>6</sup>	2				1		0,5*10 <sup>6</sup>	3				1		
4	0,7*10 <sup>6</sup>	2		1		1	1,2*10 <sup>6</sup>	2						1,1*10 <sup>6</sup>	2						1
7	0,9*10 <sup>6</sup>	3		1		2	0,2*10 <sup>6</sup>	3			1			1,5*10 <sup>6</sup>	2						1
11	0,0*10 <sup>6</sup>	3			1	2	0,3*10 <sup>6</sup>	4						0,3*10 <sup>6</sup>	2						1
17	0,3*10 <sup>6</sup>	4			1	3	0,6*10 <sup>6</sup>	2						2,4*10 <sup>6</sup>	4						3
106	1,7*10 <sup>6</sup>	3				3	1,1*10 <sup>6</sup>	3						4,9*10 <sup>6</sup>	3						3

\*profilo ITS-RFLP con Hae III, i ceppi Syz32a e Syz35b presentano profilo "B".

## Riferimenti Bibliografici

- Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., Villa, T.G., 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 40: 974-977.
- Di Maro E., Ercolini D., Coppola S. (2006). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 201-210.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu F., Querol A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337
- Fia, G., Giovani, G. Rosi, I., 2005. Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* 99: 509-517.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1216-1223.
- Legras, J. L., Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 249-255.
- 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.