

L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEI LIEVITI DI INTERESSE ENOLOGICO

Olta Noti, Riccardo Ricci, Roberto Chicco, Enrico Vaudano ed Emilia Garcia-Moruno

CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia

Via P. Micca, 35 14100 Asti

Attraverso le metodologie di analisi basate sul DNA, oggi è possibile identificare i microrganismi presenti nel vino con un'affidabilità e una rapidità difficilmente raggiungibili con le tecniche microbiologiche "classiche". L'esperienza del CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia nella discriminazione tassonomica dei lieviti utili e contaminanti.

Introduzione

Nell'ambito enologico i microrganismi ricoprono un ruolo indispensabile essendo i primi attori nella trasformazione dell'uva in vino. In particolare, i lieviti, funghi unicellulari, sono i responsabili della fermentazione alcolica, mentre i batteri lattici compiono la fermentazione malolattica, che porta alla trasformazione dell'acido malico dell'uva in acido lattico, d'importanza fondamentale sia per quanto riguarda l'aspetto organolettico sia per l'ottenimento di un prodotto stabile microbiologicamente. Oltre a questo ruolo, negli ultimi anni è stata chiarita l'influenza che i microrganismi possono avere, nella loro naturale variabilità metabolica, sulle caratteristiche organolettiche del vino. Attraverso un'azione diretta su numerose classi di molecole presenti nell'uva e la produzione di molecole derivanti dal proprio metabolismo, essi generano tutta una serie di composti che, insieme ai prodotti principali della fermentazione, caratterizzano il vino prodotto con un'influenza di tipo ceppo-dipendente. Questa importanza è stata ben compresa dalle industrie produttrici di LSA (lievito Secco Attivo, ceppi di lievito venduti in forma disidratata) che, infatti, propongono sul mercato centinaia di ceppi di lievito diversi, di solito appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, che possono concorrere a produrre vini con caratteristiche particolari. Consapevoli dell'importanza dei microrganismi nella vinificazione, il CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia ha da tempo dato vita ad una collezione di lieviti e batteri di interesse enologico. Da alcuni anni la collezione partecipa al progetto nazionale COLMIA (collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale) finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF) con lo scopo di conservare ed ampliare le collezioni dei microrganismi di interesse agrario ed industriale presenti nei diversi centri dell'ente di ricerca nazionale CRA-Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (Barba *et al*, 2011).

La collezione del CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia

La Collezione presente presso il CRA-Centro di ricerca per l'Enologia è stata costituita a partire dagli anni '70 del secolo scorso. Nel 1989 è stata denominata con il nome di "Collezione Nazionale dei Lieviti e dei Batteri Selezionati Dal Vino - Istituto Sperimentale per l'Enologia" (CNLBSV-ISE).

Ad oggi la collezione conta 1490 isolati (ceppi conservati come coltura pura) di lieviti e 280 isolati di batteri lattici raccolti in ambito enologico durante fermentazioni alcoliche e malolattiche, in vigneti o ambienti di cantina. I ceppi sono catalogati utilizzando il prefisso ISE (ad esempio *ISE1145*) acronimo di Istituto Sperimentale per l'Enologia, la precedente denominazione del Centro.

In questo grande numero di isolati sono rappresentate tutte le principali specie di interesse enologico. Per quanto riguarda i lieviti la maggior parte dei ceppi è rappresentata dal genere *Saccharomyces* nelle sue due principali specie protagoniste della fermentazione alcolica *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Accanto a questi sono stati raccolti i lieviti presenti nelle prime fasi fermentative, nelle alterazioni e rifermentazioni per un totale di circa 35 specie diverse. Tra questi

ceppi sono presenti alcuni *type strains* cioè i “ceppi tipo” di riferimento tassonomico internazionale conservati presso le più importanti collezioni di microrganismi quali la ATCC statunitense, la CBS olandese o la DBVPG dell’Università di Perugia, che sono stati inseriti nella collezione grazie a scambi o acquisizioni.

I batteri lattici presenti nella collezione sono per la gran parte appartenenti alla specie *Oenococcus oeni* e al genere *Lactobacillus*, responsabili delle fermentazioni malolattiche. Oltre a questi sono presenti alcune specie considerate come dannose nei vini quali, ad esempio, *Pediococcus damnosus* e *Pediococcus pentosaceus* responsabili del difetto del vino detto “filante”, o ceppi del genere *Lactobacillus* in grado di generare ammine biogene.

Tecniche di isolamento, conservazione e propagazione.

L’acquisizione di nuovi isolati fungini e batterici avviene essenzialmente in due modi. Il primo largamente minoritario, consiste nello scambio di ceppi con altri ricercatori in tutto il mondo o attraverso l’acquisto diretto presso le collezioni internazionali. In questo caso il ceppo perviene al centro già sottoforma di coltura pura in forma liofilizzata o su substrato agarizzato.

Nella maggior parte dei casi l’acquisizione avviene attraverso l’isolamento dall’ambiente. In questo caso è interessante descriverne rapidamente il procedimento. Il campione, proveniente da vino, mosto o altra matrice, viene diluito in acqua peptonata sterile e disseminato su terreno selettivo. Nel caso di isolamento di specie fungine ed in particolare di lieviti, il terreno agarizzato (di solito YPGA Yeast Peptone Glucose Agar) viene addizionato di una sostanza antibatterica come l’ampicillina. Questo permette la crescita selettiva dei lieviti ed impedisce la crescita batterica. Le colonie così cresciute vengono ulteriormente disseminate singolarmente su YPGA ed una colonia cresciuta su quest’ultima piastra viene seminata su tubo a becco di clarino che sarà fonte di cellule vive per le successive analisi tassonomiche. Parallelamente il ceppo in coltura pura viene inoculato in YPG liquido e, una volta cresciuto, miscelato a glicerolo sterile e conservato a -80°C in tubi adatti alla crioconservazione. Per quanto riguarda i batteri il procedimento è simile a quanto visto prima con la differenza che, in questo caso, è necessario inibire i lieviti e favorire la crescita batterica utilizzando un terreno agarizzato specifico per i batteri quali MRS a pH 5.0 addizionato di cicloesimide, un potente antifungino. Le procedure successive, per l’ottenimento di una coltura pura, sono simili a quelle viste per i lieviti ma in questo caso si preferisce utilizzare un terreno in forma liquida, in quanto i batteri lattici, soprattutto *O. oeni*, crescono in modo stentato su substrato agarizzato.

Terminate le analisi tassonomiche e giunti alla classificazione specifica, il ceppo può entrare ufficialmente nella collezione attraverso l’assegnazione di un codice e l’inserimento nella banca dati. Per ogni isolato vengono preparate tre copie conservate in distinti congelatori a -80°C (Fig. 1).

Le analisi microbiologiche di identificazione e caratterizzazione dei lieviti vinari

La classificazione tassonomica rappresenta ancora oggi una delle sfide più interessante per i microbiologi. Nel corso degli anni le tecniche microbiologiche basate sull’osservazione micro e macroscopiche si sono raffinate e completate con moderni test fisiologici fino ad arrivare, recentemente, alle analisi del DNA. Queste ultime permettono in breve tempo di determinare la specie (identificazione o discriminazione interspecifica) ed in alcuni casi, distinguere il ceppo (caratterizzazione o discriminazione intraspecifica).

Le “classiche” tecniche di analisi microbiologica rimangono comunque la base di partenza per l’identificazione, tenendo presente che, anche in un moderno laboratorio di analisi enologiche, raramente, almeno per ora, sono a disposizione competenze e strumentazioni necessarie alle recenti analisi molecolari, mentre la disponibilità di un microscopio e di altre attrezzature di base per la microbiologia è ampiamente alla portata dell’enologo. La possibilità di reperire in

commercio terreni solidi in piastra già preparati e pronti all'uso semplifica ulteriormente l'analisi microbiologica in laboratorio.

Rimanendo nel campo dei lieviti è interessante vedere come si svolge il processo di identificazione. Innanzitutto è necessario raccogliere la maggiore quantità di informazione sul campionamento da cui si è ottenuta la coltura pura. Se il campione viene prelevato in fermentazione è utile conoscere alcuni dati del mosto-vino come la gradazione alcolica, se si tratta di mosto appena pigiato, o in attiva fermentazione o in arresto fermentativo. Questo approccio "epidemiologico" può essere molto utile per indirizzare il lavoro nella successiva determinazione tassonomica.

L'analisi microscopica è la prima tappa di questo percorso. L'osservazione microscopica della coltura pura raramente permette di identificare alla specie ma può essere utile per l'identificazione di alcuni generi con caratteristiche microscopiche particolari, che si discostano dall'"anonima" forma ovoidale o ellissoidale che caratterizza buona parte dei lieviti enologici. Ad esempio, il genere *Schizosaccharomyces* con la sua specie più frequente, *S. pombe*, è caratterizzato da una evidente divisione per scissione (Fig. 2a). L'osservazione di cellule apiculate, a forma di limone, porta all'identificazione del genere *Hanseniaspora* (forma sporigena di *Kloeckera*) caratterizzata da una gemmazione bipolare che produce i caratteristici umboni (Fig. 2b). Questa peculiarità non è però unica tra le specie di interesse enologico in quanto anche *Saccharomyces ludwigii*, unico rappresentante del suo genere, presenta le stesse caratteristiche. Questa specie, molto resistente alla SO₂, frequente nel caso di rifermentazioni di vini dolci ad elevata concentrazione di etanolo e di mosti muti, può essere distinta al microscopio grazie alle dimensioni più grandi rispetto ad *Hanseniaspora*. Anche il genere *Dekkera/Brettanomyces* può essere identificato grazie alla forma ogivale, a volte "a botte" (Fig. 2c) che può presentare soprattutto nell'osservazione di cellule provenienti da colonie cresciute su agar; questo genere tende però ad avere un notevole polimorfismo se osservato in mosti o vini e la sua identificazione deve essere confermata con ulteriori analisi.

Ulteriori informazioni a livello microscopico possono essere fornite anche dalla capacità di formare miceli e pseudo miceli da parte delle cellule poste in determinate condizioni, utilizzando la tecnica denominata *Dalmau plate*. Sopra uno striscio di colonia fresco fatto su terreno agarizzato viene posto un vetrino copri-oggetto sterile; questa operazione induce le cellule delle specie che ne sono in grado, a crescere in modo direzionale, sviluppando cellule allungate che hanno lo scopo di uscire dalla zona coperta dal vetrino. In questo modo almeno alcune cellule fuoriescono e possono trovarsi in condizioni ambientali più favorevoli (Fig. 3a, b).

Il numero di spore, la loro forma e la forma dell'asco (il sacchetto che contiene le spore), la persistenza o l'evanescenza dell'asco sono tutte caratteristiche specifiche che si possono osservare al microscopio inducendo la sporificazione. A questo scopo vengono utilizzati terreni specifici, di solito minimi, che inducono la cellula a riprodursi sessualmente ed a sporificare.

L'analisi macroscopica

L'analisi viene eseguita per inoculo della coltura pura su terreno liquido YPG in provetta e per disseminazione su terreno solido WL (Wallerstein Laboratory) (Green e Gray, 1950). Mentre la semina in terreno liquido, anche se molto semplice, presenta tempi di osservazione lunghi ed è poco discriminante (se si eccettua l'identificazione del genere *Pichia* che forma una vistosa membrana superficiale), la semina su piastra WL può dare indicazioni interessanti per le differenze riscontrabili nel colore, dovute alla presenza del colorante indicatore verde di bromo cresolo che viene o meno assimilato e metabolizzato dalle cellule durante la crescita, nelle dimensioni, margini ed elevazione delle colonie (Fig. 4).

L'analisi fisiologica

L'analisi fisiologica rappresenta una tappa fondamentale del processo di identificazione con metodologie classiche. La capacità di fermentare diversi zuccheri, assimilare determinate fonti di

carbonio e di crescere in assenza di vitamine od a temperature elevate sono tutte caratteristiche determinate geneticamente dalla specie. Negli ultimi anni l'introduzione dei test di assimilazione standardizzati monouso quali le gallerie ID 32 Biomerieux ha permesso di velocizzare i tempi di analisi ottenendo risultati attendibili (Fig. 5). E' da ricordare che l'affidabilità delle analisi fisiologiche è legata alla rigosità delle operazioni da compiere a partire dall'utilizzo di materiale cellulare fresco cresciuto in condizioni ottimali.

Tecniche di analisi molecolari

Sebbene la caratterizzazione fenotipica, basata sulle proprietà morfologiche e fisiologiche dei lieviti sia ancora la base per l'identificazione delle specie di microrganismi, è noto che essa può essere fortemente influenzata dalle condizioni fisiologiche del ceppo. Questa variabilità ha indotto i microbiologi a rivolgersi a tecniche di discriminazione a livello molecolare dapprima con l'analisi di enzimi, metaboliti secondari o molecole strutturali quali quelle che compongono la parete cellulare senza tuttavia risolvere i problemi dovuti all'affidabilità e al potere discriminante legati alle condizioni fisiologiche dei microrganismi. Successivamente, a partire dagli anni '80, l'introduzione delle tecniche basate sull'analisi del DNA ha fatto compiere alla analisi tassonomica un enorme avanzamento in termini di attendibilità e discriminazione.

Il DNA, infatti, è caratteristico di ogni specie, non varia con il modificarsi delle condizioni metaboliche della cellula, è facilmente estraibile e conservabile. Le prime metodologie genetiche, in parte ancora utilizzate oggi, si basavano sull'analisi del DNA nucleare e mitocondriale nella loro interezza come, ad esempio, l'analisi di restrizione, cioè la digestione da parte di enzimi del DNA che genera un profilo specifico per ogni specie, oppure la percentuale di riassociazione DNA-DNA (Vaughan-Martini e Kurtzman, 1985) per la differenziazione delle specie nell'ambito del genere *Saccharomyces*, o ancora, la cariotipizzazione cioè l'analisi elettroforetica dell'intero set di cromosomi (Carle e Olson, 1985). L'invenzione della reazione a catena della Polimerasi (PCR: Polymerase Chain Reaction) da parte di Kary B. Mullis nei primi anni '80, ha ulteriormente ampliato le tecniche a disposizione del tassonomista molecolare andando oltre l'analisi del DNA totale. Con questa tecnica è possibile amplificare selettivamente una regione di DNA altamente informativa dal punto di vista discriminativo, per poi analizzarla nella sua dimensione, tagliarla con enzimi di restrizione ed osservarne il profilo elettroforetico, o, ancora, analizzarne la sequenza base per base. Inoltre, l'introduzione di queste metodologie ha reso possibile, almeno per alcune specie, la discriminazione a livello intraspecifico, rendendo cioè distinguibili diversi ceppi appartenenti ad una stessa specie.

Tra le diverse tecniche molecolari a disposizione, possono essere distinte le metodiche utilizzate per l'identificazione cioè la discriminazione a livello di specie, e quelle applicate alla caratterizzazione, cioè la distinzione a livello di ceppo.

Per il primo tipo di analisi l'esperienza presso il Centro ha dimostrato la buona affidabilità delle metodologie basate sulla restrizione dopo amplificazione delle sequenze 5,8S-ITS (Internal transcribed Spacers) (Esteve-Zaroso *et al*, 1999) del DNA ribosomiale, che hanno mostrato avere sequenze caratteristiche per ogni specie di lievito (Fig. 6).

Il profilo ottenuto dopo l'amplificazione e la digestione con diversi enzimi, viene confrontato con i profili ottenuti dai type strains di riferimento. La robustezza di questa tecnica e' testimoniata dal fatto che essa è applicabile direttamente alle colonie cresciute su piastra, eliminando la necessità di estrarre e purificare il DNA. Altri metodi testati presso i nostri laboratori, come ad esempio la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al*, 1990) hanno mostrato l'inconveniente di essere fortemente dipendenti dal grado di purezza e dalla quantità di DNA utilizzato. I casi dubbi possono essere risolti attraverso una analisi genetica più approfondita che consiste nel sequenziamento, cioè nella lettura completa base per base, della sequenza dei domini D1/D2 della

sub-unità 26S del DNA ribosomiale, anche questa molto discriminante dal punto di vista della specie (Kurtzman e Robnett, 1998) (Fig. 8).

Per quanto riguarda l'analisi di caratterizzazione intraspecifica, questa viene fatta, per adesso, solo sui ceppi appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, la più importante dal punto di vista enologico e la cui distinzione riveste maggiore interesse.

La metodologia messa a punto presso il Centro si basa sul polimorfismo dei loci microsatellitari (Fig. 7) ed è stata descritta in una precedente comunicazione (Vaudano e Garcia-Moruno, 2008). Con questa tecnica, specie-specifica, poco costosa, veloce ed applicabile direttamente su colonia, non solo è possibile la distinzione affidabile a scopi scientifici, ma presenta interessanti risvolti applicativi. Tra questi basti ricordare la possibilità di verificare la dominanza in fermentazione del ceppo inoculato attraverso un semplice campionamento delle fecce a fine fermentazione.

Utilizzando queste tecniche molecolari, è attualmente in atto una revisione tassonomica di tutti i ceppi della collezione. Questa impresa, finanziata dal progetto nazionale COLMIA, prevede una prima estrazione del DNA dei ceppi in coltura pura, la successiva purificazione e la conservazione a -80°C, onde preservarne l'integrità. Considerando l'abbondanza dei ceppi classificati come *S. cerevisiae* attraverso le analisi fenotipiche, viene effettuata innanzitutto l'analisi dei loci microsatellitari che permette di avere due tipi di informazione: in primo luogo, essendo specie-specifica permette la sicura assegnazione alla specie *S. cerevisiae* in quanto solo i ceppi appartenenti a questa specie amplificano e generano un profilo elettroforetico; in seconda battuta l'analisi discrimina a livello intraspecifico i diversi ceppi della collezione (Fig. 7). I ceppi che in questa prima determinazione risultano negativi, vengono analizzati con le tecniche di discriminazione specifica RFLP delle sequenze 5,8S-ITS, attraverso l'amplificazione con i primer ITS1 e ITS4 e la successiva digestione dell'amplificato ottenuto con gli enzimi *HaeIII*, *HinfI* e *CfoI*. Successivamente, se l'RFLP non è sufficiente per l'identificazione, si passa al sequenziamento del DNA ribosomiale come descritto sopra. Questa metodologia di lavoro "inversa", che prevede prima la caratterizzazione del ceppo e poi l'identificazione della specie permette di razionalizzare tempi e costi del progetto.

Attraverso le analisi genetiche sarà possibile verificare, oltre all'assegnazione alla specie degli isolati, anche la ridondanza dei ceppi di *S. cerevisiae* (cioè la frequenza dei ceppi identici) presenti nella collezione, causata dalla scarsa efficacia dei metodi di analisi fenotipica nella distinzione intraspecifica. Dalle analisi svolte fino ad ora, il numero di queste "ripetizioni" appare comunque limitato.

Conclusioni

Il mantenimento della collezione e il suo arricchimento con nuovi isolati, lungi da essere una semplice curiosità scientifica, si deve porre alcuni importanti obiettivi.

Il primo è quello di raccogliere e conservare la biodiversità microbica in ambito enologico. Anche questa, come quella degli organismi superiori, subisce un lento deterioramento, causato, in certi ambienti, dall'uso di antifungini ed, in cantina, dall'utilizzo degli starter commerciali che sono fortemente competitivi nei riguardi della flora microbica autoctona. Altro scopo fondamentale è quello di essere fonte di materiale vitale, identificato e caratterizzato geneticamente, su cui intraprendere studi di tipo applicativo oltre che di ricerca pura, quali l'identificazione di nuove metodologie di analisi o la ricerca di ceppi specifici adatti a determinate fermentazioni ed a specifici vitigni. Inoltre, il mantenimento di svariate specie in condizione di coltura pura e geneticamente caratterizzata, si rivela molto utile nella rapida identificazione di microorganismi contaminanti, che determinano intorbidamenti, precipitazioni ed alterazioni organolettiche dei vini durante l'intero ciclo di produzione, dalla fermentazione fino all'imbottigliamento. Grazie all'esperienza acquisita in questo tipo di analisi, il CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti

mette a disposizione alle aziende ed agli enologi le proprie conoscenze e strumentazioni nel campo della microbiologia e biologia molecolare applicate in cantina.

Bibliografia

1. Carle, G. e Olson, M. (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3756-3760.
2. 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.
3. Green, S.R., e Gray, P.P. (1950). A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Lab. Comm.*, 13; 357-366.
4. Kurtzman, C.P., e Robnett, C.J. (1998). Identification on phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
5. Vaudano E, Garcia-Moruno E, (2008). Discriminazione intraspecifica di *Saccharomyces cerevisiae* con la tecnica PCR multiplex di microsatelliti. *L'Enologo* 10, 95-107.
6. Vaughan Martini, A. e Kurtzman C.P. (1985) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces* sensu stricto. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:508-511.
7. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res*, 18, 6531-6535.
8. Barba, M., Belisario, A., Luongo, L. (2011). Collezioni di Microorganismi di interesse agrario, industriale e ambientale- COLMIA: Manuale d'uso. *Petria*, 21 1-164.