

## RELAZIONE TRA PROVENIENZA GEOGRAFICA, CARATTERISTICHE GENETICHE E CARATTERI TECNOLOGICI IN CEPPI DI *SACCHAROMYCES* DI INTERESSE ENOLOGICO

Viviana CORICH<sup>1,3</sup>, Tiziana NARDI<sup>1</sup>, Milena CARLOT<sup>1</sup>, Fabio ZILIO<sup>2</sup>, Angiolella LOMBARDI<sup>2</sup>, Alessio GIACOMINI<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>CIRVE, Università di Padova, via XXVIII aprile 14, Conegliano Veneto (TV); <sup>2</sup>Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, via San Gaetano 74, Thiene (VI); <sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, viale dell'Università 16, Legnaro (PD).

Lavoro presentato ad Enoforum, 21-23 aprile 2009, Piacenza, Italia

### Riassunto

Un programma di selezione di lieviti per l'enologia prevede il reperimento di un vasto numero di ceppi da un determinato ambiente da sottoporre a test di identificazione e a varie prove per verificarne le attitudini enologiche. Nel caso di lieviti "ecotipici", dove la popolazione microbica isolata è rappresentativa di una determinata area di produzione vitivinicola, sono di particolare importanza la biodiversità genetica, la provenienza geografica degli isolati e "l'attitudine alla tipicità" dei ceppi raccolti.

Nel corso dei progetti di selezione di lieviti ecotipici condotti nelle aree di produzione delle DOC venete "Conegliano-Valdobbiadene", "Piave" e "Lison-Pramaggiore", sono stati collezionati lieviti da grappoli, fermentati singolarmente in laboratorio, di vitigni a bacca bianca (Prosecco e Tocai Lison) e a bacca nera (Raboso), in zone geograficamente distinte e differenti per caratteristiche geofisiche e di urbanizzazione. La caratterizzazione genetica e tecnologica dei ceppi raccolti ha messo in luce una marcata correlazione tra l'area di provenienza ed il livello di biodiversità dei lieviti isolati, che è a sua volta strettamente collegato alla distribuzione dei caratteri tecnologici nella popolazione. L'analisi è stata completata da dati di fermentazione, ottenuti sia mediante microvinificazioni che vinificazioni pilota, condotte in differenti annate. Questa ricerca ha fornito delle indicazioni riguardo le correlazioni tra la biodiversità microbica osservata nelle diverse regioni e le attitudini tecnologiche dei lieviti da esse isolati.

### Introduzione

Fu Müller-Thurgau nel 1890 ad introdurre il concetto di lievito selezionato in enologia, riferendosi ad un ceppo caratterizzato da proprietà fisiologiche, biochimiche ed enologiche ottimizzate in rapporto alle esigenze tecnologiche dei processi di fermentazione in purezza. Solo a partire dal 1965 però i lieviti selezionati, definiti "di prima generazione", si diffusero nel mondo enologico, scelti sulla base delle loro spiccate caratteristiche tecnologiche (vigore fermentativo, alcol-tolleranza), che garantivano una fermentazione efficiente e l'ottenimento di prodotti privi di difetti (Perez-Coello *et al.*, 1999).

Da allora i lieviti selezionati sono entrati nell'uso delle maggior parte delle cantine. Nonostante gli evidenti vantaggi, sempre più spesso però viene rilevato che il loro impiego porti ad una riduzione della biodiversità dei lieviti vinari associati all'ambiente di cantina, con una conseguente standardizzazione del prodotto, a cui si assistette in effetti negli anni '60-'70, ed un appiattimento delle caratteristiche specifiche dei vini derivati da diverse aree produttive. Per questo motivo, verso la fine del secolo scorso, furono introdotti altri criteri di selezione per i nuovi ceppi enologici (Pretorius, 2000) che includessero anche i caratteri di qualità, ovvero l'impatto, dovuto al metabolismo del singolo lievito, sulle caratteristiche chimiche ed organolettiche del vino prodotto, dando luogo alla comparsa sul mercato dei lieviti definiti di "seconda generazione". Questi starter, pur possedendo caratteri di indubbia importanza enologica, non erano tuttavia sempre capaci di sviluppare completamente i sapori e gli aromi tipici di un vino, in quanto generalmente provenienti da ambienti vitivinicoli lontani e differenti (Pretorius, 2000); al contrario il loro utilizzo ha spesso portato alla diffusione di aromi fermentativi "universali" che poco si adattano al bouquet tipico di un vino a denominazione di origine ed al suo *terroir*.

Per cercare di superare questo problema, le ricerche più recenti hanno puntato sull'introduzione di starter "ecotipici" composti da lieviti autoctoni, isolati da territori a forte vocazione vitivinicola, in grado di esaltare le caratteristiche di tipicità del prodotto locale. Questi ceppi vengono scelti tra i

lieviti che originariamente davano luogo alla fermentazione spontanea in specifiche zone contribuendo a definire le caratteristiche aromatiche tipiche di quel vino. In questo modo si tende a mantenere il naturale connubio tra l'uva prodotta in una determinata zona ed il lievito che l'ambiente le aveva associato. Un programma di selezione di lieviti enologici parte dal reperimento di un vasto numero di ceppi mediante isolamento da ambienti naturali circoscritti, che sono poi sottoposti a test di identificazione e a varie prove per verificarne le attitudini enologiche. Nel caso della selezione di lieviti ecotipici, sono di particolare importanza la biodiversità genetica, la provenienza e la distribuzione geografica e "l'attitudine alla tipicità". In questo lavoro sono riportati i risultati relativi ai progetti di selezione di lieviti ecotipici nelle zone venete a Denominazione di Origine Controllata (DOC) di "Conegliano-Valdobbiadene", "Piave" e "Lison-Pramaggiore" e sono discussi e confrontati i dati relativi alla biodiversità microbica osservata e le attitudini tecnologiche dei lieviti isolati dalle diverse regioni.

## Campionamento sul territorio

Nel corso dei progetti di selezione di ceppi ecotipici nelle DOC Venete "Conegliano-Valdobbiadene", "Piave" e "Lison Pramaggiore", sono stati isolati lieviti da grappoli, fermentati singolarmente in laboratorio, di vitigni a bacca bianca (Prosecco e Tocai Lison) e a bacca nera (Raboso). Tali regioni a forte vocazione vitivinicola (Fig.1) sono tra le più importanti nel Veneto e si possono considerare tra loro differenti sia per caratteristiche geofisiche che per livello di antropizzazione.

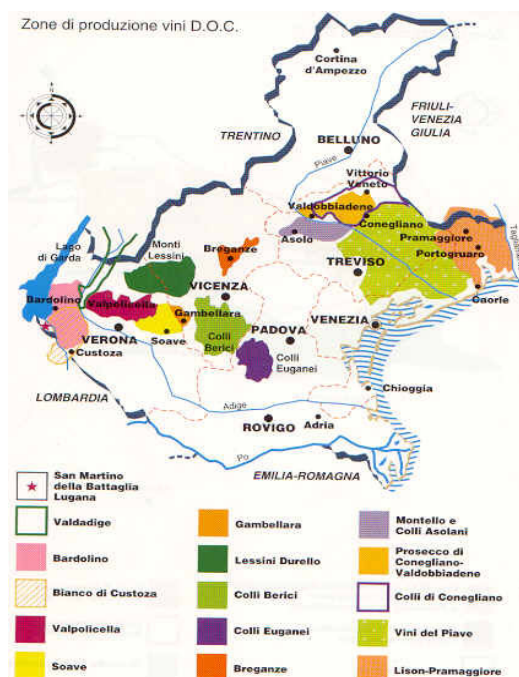


Fig. 1. Collocazione topografica delle produzioni di vini DOC esistenti nella regione Veneto (U.Vi.Ve) Le tre zone interessate dallo studio si trovano nella fascia nord-orientale della Regione.

La zona di produzione della DOC Conegliano-Valdobbiadene si estende prevalentemente nella fascia collinare della provincia di Treviso (un insieme di colline con direzione est-ovest che raggiungono le Prealpi); solo verso Conegliano i vigneti sono piantati in zone più pianeggianti. La vite viene coltivata solo nella parte più soleggiata dei colli, ad un'altitudine compresa tra i 50 e i 500 metri sul livello del mare. L'area compresa nella DOC Piave si estende per metà nella provincia di Treviso, e per l'altra metà, nella provincia di Venezia ed è caratterizzata dall'essere solcata dal fiume Piave che, con la sua presenza, ha notevolmente condizionato la pedologia dei terreni circostanti (suoli sassoso-alluvionali di natura prevalentemente argillosa, a cui la varietà Raboso si è ben adattata). L'area della DOC "Lison-Pramaggiore" è situata nell'estrema parte orientale della provincia di Venezia e comprende anche sei comuni del Friuli occidentale appartenenti alla provincia di Pordenone. La zona è caratterizzata da terreni pianeggianti venutisi a

creare nel corso dei millenni ad opera delle glaciazioni e dei successivi depositi alluvionali, trasportati dalle acque di scioglimento degli antichi ghiacciai che andavano ritirandosi.

Il fiume Tagliamento, durante le antiche alluvioni ed i frequenti cambi di alveo, ha contribuito in modo determinante nella formazione pedologica della zona. Inoltre per effetto delle pendenze e del trasporto differenziato, si sono venute a depositare in questo territorio le minute particelle di argilla calcarea che caratterizzano la maggior parte dei terreni dell'area viticola.

La scelta di campionare grappoli d'uva direttamente da vigneto, in punti possibilmente molto distanti dalle cantine, è stata volta a ridurre il rischio di raccogliere dei ceppi commerciali, di cui le aziende vitivinicole della zona ormai da parecchio tempo fanno uso. L'isolamento condotto sul fermentato proveniente da un singolo grappolo non solo riduce possibili inquinamenti dovuti alla presenza di lieviti commerciali ma favorisce il recupero di ceppi meno competitivi, ma con eventuali caratteristiche interessanti (valorizzazione degli aromi primari, produzione di aromi secondari) i quali avrebbero forte probabilità di essere soppiantati da ceppi più competitivi in una fermentazione in grandi volumi.

I campioni raccolti in vigneto sono stati trasferiti in laboratorio dove è stata aggiunta anidride solforosa (50 ppm) per favorire lo sviluppo di lieviti enologici, appartenenti cioè al gruppo *Saccharomyces sensu stricto*, di cui fanno parte *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, che sono le specie su cui si concentra il programma di selezione.

### Diffusione dei lieviti *Saccharomyces* di interesse enologico

A fine fermentazione mediante una serie di diluizioni e successivo trasferimento di aliquote su terreno di crescita, è stato possibile isolare i lieviti indigeni e mediante conta su piastra stabilire la loro concentrazione nei mosti fermentati, che si attestava in un intervallo compreso tra  $10^6$  e  $10^7$  ufc/ml. Il terreno di coltura WL (Wallerstein Laboratory), contenente il colorante verde di bromocresolo, è stato usato per la sua capacità di essere assorbito in modo selettivo da lieviti diversi, rendendo possibile una prima caratterizzazione dei microrganismi in base alla morfologia di colonia e alla sua colorazione. I principali lieviti di vigneto hanno la capacità di assorbire molto bene il colorante: il genere *Hanseniaspora*, il più diffuso sul grappolo, assume una colorazione verde intenso facilmente distinguibile dal gruppo *Saccharomyces sensu stricto*, che rimane di colore bianco (Cavazza et al., 1992).

In totale sono analizzati 351 grappoli di Prosecco, 78 di Raboso e 31 di Tocai.

Successivamente, per l'identificazione degli isolati appartenenti al gruppo *S. sensu stricto*, è stato utilizzato un metodo basato sull'analisi del DNA che impiega la tecnica PCR, precedentemente messo a punto dai ricercatori di questo gruppo (Nardi et al., 2006). Come mostrato in Tabella 1, non tutti i grappoli fermentati hanno permesso di isolare lieviti autoctoni appartenenti al gruppo *S. sensu stricto*. Inoltre, numerose attribuzioni ottenute mediante osservazioni morfologiche sul terreno di crescita WL non sono risultate corrette. L'indagine genetica si è rivelata indispensabile per una corretta attribuzione e di grande utilità in quanto estremamente rapida e di facile esecuzione. Il valore dei campioni contenenti ceppi enologici oscilla tra 69,2% della zona DOC "Piave" e l'8,5% della zona "Conegliano-Valdobbiadene". Il numero degli isolati, inoltre, non sembra essere correlato al numero totale dei campioni raccolti. In generale si evidenzia una maggiore diffusione dei lieviti di rilevanza tecnologica nei vigneti della varietà a bacca nera (Raboso) rispetto alle altre a bacca bianca.

Tab. 1. Quantificazione dei campioni contenenti *Saccharomyces sensu stricto* in base alla identificazione morfologica (WL) e genetica (multiplex PCR)

|          | <b>Campioni</b><br>(grappoli) | <b><i>S. sensu stricto</i></b><br>(WL) | <b><i>S. sensu stricto</i></b><br>(multiplex PCR) | <b><i>S. sensu stricto</i></b><br>(%) |
|----------|-------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Prosecco | 354                           | 49                                     | 30                                                | 8,5                                   |
| Tocai    | 31                            | 11                                     | 3                                                 | 9,7                                   |
| Raboso   | 78                            | 62                                     | 54                                                | 69,2                                  |

Mettendo in relazione la distribuzione dei campioni (grappoli) alle località di campionamento delle zone di produzione (Fig. 2), emerge che la diffusione dei ceppi di interesse enologico (*S. sensu stricto*) nei vigneti di Tocai e Prosecco non è omogenea, ma concentrata in alcune località con frequenze molto basse, mentre nel caso del Raboso si nota il contrario, con presenza di *S. sensu stricto* in 16 località sulle 17 analizzate.

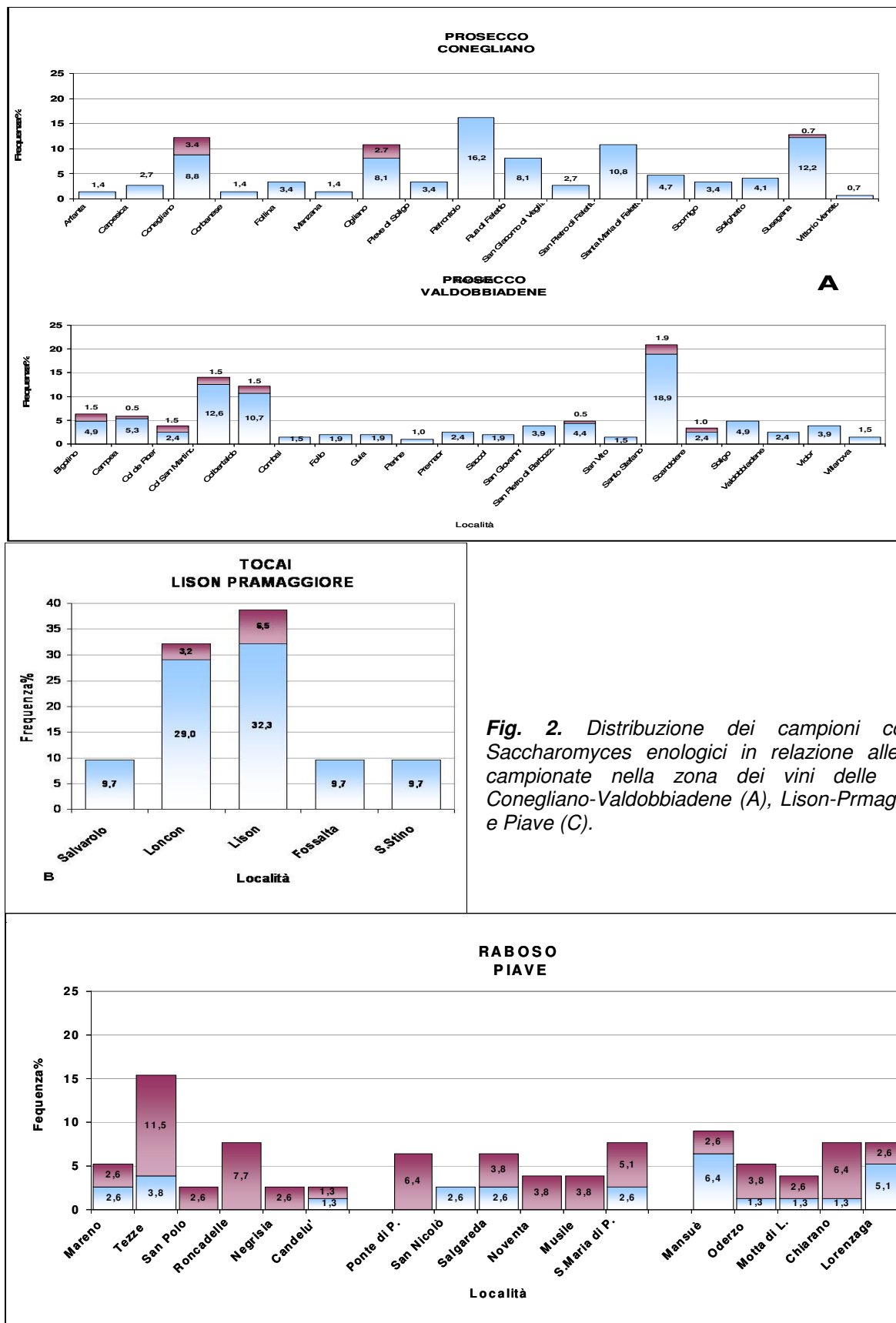


Fig. 2. Distribuzione dei campioni contenenti *Saccharomyces enologici* in relazione alle località campionate nella zona dei vini delle DOC di Conegliano-Valdobbiadene (A), Lison-Pramaggiore (B) e Piave (C).

Nella DOC Lison-Pramaggiore (Tocai) solo due delle 5 località campionate contribuiscono (rispettivamente con il 3,2% e il 6,4% degli isolati totali) alla raccolta di *S. sensu stricto*. Nella DOC Conegliano-Valdobbiadene (Prosecco), nella macroarea di Valdobbiadene, 8 delle 20 località campionate presentano *S. sensu stricto* con frequenze variabili dallo 0,5% al 2% mentre in quella di Conegliano solo 3 delle 17 località hanno permesso l'isolamento di lieviti enologici, con frequenze che variano dall'1% al 3%. I risultati ottenuti sono imputabili alle diverse condizioni pedoclimatiche caratteristiche delle zone campionate: basti pensare alle differenze tra il terreno pianeggiante ed argilloso della zona (più umida) del Piave e quello collinare e ghiaioso della zona (più ventilata) di Valdobbiadene. Un altro fattore che ha grande importanza nella costituzione di una nicchia ecologica e quindi in grado di influenzare la biodiversità microbica è la rusticità del vitigno, intesa come resistenza a malattie fungine che riduce il numero di trattamenti necessari in vigneto e quindi favorisce una maggiore presenza di microrganismi e di lieviti in particolare. Sembra essere questo il caso del Raboso, varietà più resistente rispetto al Prosecco, per le caratteristiche genetiche e fenologiche della pianta e dell'acino. E' interessante infine rilevare come le varietà a bacca bianca diano risultati più vicini tra loro se confrontate con quella a bacca nera. Inoltre, i risultati relativi alla distribuzione di *S. sensu stricto* nei vigneti dei territori campionati sembrano indicare che i lieviti enologici sono più presenti su varietà a bacca nera e perciò suggeriscono che sia possibile ridurre in tali casi l'entità del campionamento

### Biodiversità dei lieviti *Saccharomyces* enologici nelle aree DOC campionate

Per ottenere una caratterizzazione della diversità a livello di ceppo degli isolati identificati come *S. sensu stricto*, è stato scelto un metodo consolidato (Querol & Ramon, 1996) che prevede l'analisi genetica del DNA mitocondriale (mtDNA RFLP). Questo è il sistema di caratterizzazione genetica più utilizzato per valutare il livello di biodiversità di una popolazione di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* (Lopez *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2005) per la sua riproducibilità e rapidità di esecuzione.

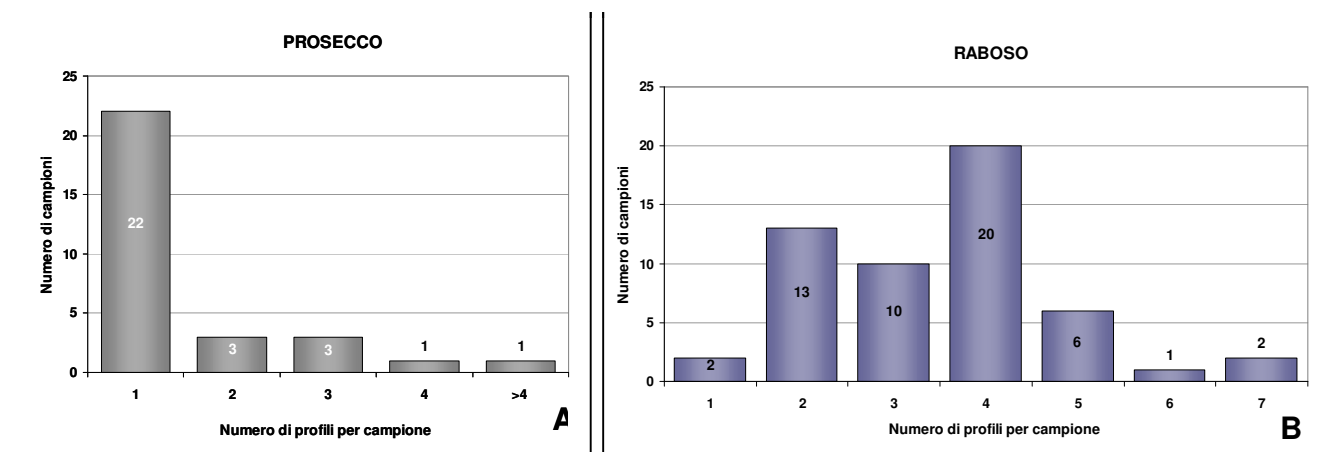
Come illustrato in Tabella 2, il numero dei lieviti isolati appartenente al gruppo *S. sensu stricto*, rispetto al totale dei microrganismi valutati, nei vigneti di Raboso è notevolmente più alto rispetto a quanto ottenuto per le varietà Prosecco e Tocai (34,2% contro 9,5% e 13%). L'analisi del DNA mitocondriale rivela una biodiversità a livello di ceppo notevolmente superiore nei vigneti di Raboso (130 individui geneticamente distinti rispetto ai 38 rinvenuti per il Prosecco). I dati relativi alla varietà Tocai non sono ancora disponibili, in quanto il campionamento di tutta l'area è previsto con la vendemmia 2009. Inoltre, nei caso della DOC Piave è stato possibile individuare buona parte della biodiversità presente nel territorio campionando meno grappoli di uva rispetto alle due varietà a bacca bianca .

Tab.2. Quantificazione dei lieviti isolati in base alla identificazione morfologica (WL), genetica (multiplex PCR) e alla caratterizzazione ceppo-specifica (analisi di restrizione del DNA mitocondriale, mtDNA RFLP); ND: non determinato.

|                 | Lieviti isolati | <i>S. sensu stricto</i><br>(WL) | <i>S. sensu stricto</i><br>(multiplex PCR) | <i>S. sensu stricto</i><br>(%) | Ceppi<br>(mtDNA RFLP) |
|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| <b>Prosecco</b> | 3120            | 484                             | 296                                        | 9,5                            | 38                    |
| <b>Tocai</b>    | 230             | 102                             | 30                                         | 13,0                           | ND                    |
| <b>Raboso</b>   | 760             | 304                             | 260                                        | 34,2                           | 130                   |

Esaminando la presenza contemporanea di ceppi diversi sui singoli grappoli campionati si osservano sensibili differenze tra la biodiversità osservata nelle due aree DOC (Fig.3A e 3B). Considerando i 30 campioni di uva Prosecco contenenti *S. sensu stricto*, ben il 73% era caratterizzato da isolati riconducibili ad uno stesso gruppo, indicando che la fermentazione di quel grappolo era stata condotta da un solo ceppo dominante, mentre l'1% dei grappoli positivi ne conteneva due, un ulteriore 1% ne conteneva tre ed in un solo caso ne sono stati trovati 4 ed

eccezionalmente, in un solo campione ne sono stati isolati 9. Questa situazione risulta molto diversa da quella ottenuta nelle fermentazioni dei grappoli di Raboso, dove la maggior parte dei campioni conteneva da due a quattro ceppi diversi. Infatti, considerando i 54 campioni da cui sono stati isolati lieviti appartenenti al gruppo *S. sensu stricto*, il 37% conteneva isolati riconducibili a quattro diversi ceppi, mentre il 24% e il 18,5% riconducibili rispettivamente a due e a tre diversi ceppi. In due campioni si sono osservati ben 7 ceppi diversi. Solamente il 3,7% dei campioni conteneva un solo ceppo. La fermentazione dell'uva Raboso, quindi è stata condotta in circa l'80% dei casi osservati da più di un lievito, evidenziando l'assenza di una netta dominanza durante la stessa fermentazione alcolica spontanea.



**Fig. 3** Distribuzione del numero di ceppi diversi riscontrati nello stesso grappolo in Prosecco (A) e Raboso (B).

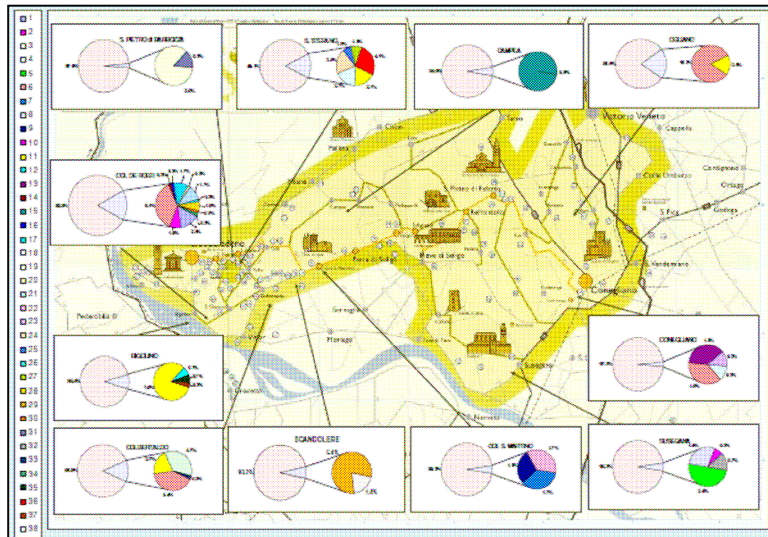
Nel caso del Prosecco è quindi possibile ipotizzare la presenza di pochissimi ceppi diversi su ogni grappolo, e più spesso di un solo ceppo, che sono riusciti facilmente ad affermarsi non avendo competitori, oppure in alternativa la presenza di più ceppi per grappolo di cui solo uno molto "aggressivo". La situazione risulta molto diversa nei vigneti della DOC Piave, dove si osserva la co-presenza di più ceppi in grado di condurre la fermentazione. Le caratteristiche del succo di questa varietà (bassi valori di pH, elevata acidità totale, alto contenuto in zuccheri) sicuramente hanno operato di per sé una selezione nei confronti di ceppi meno resistenti, favorendo lo sviluppo di lieviti particolarmente robusti in grado di fermentare anche in condizioni particolarmente difficili. Una distribuzione complessiva della biodiversità dei ceppi di lievito selezionati in relazione alla provenienza geografica è riportata in Fig. 4.

Dalle rappresentazioni grafiche riportate in Fig. 4 si osserva come la biodiversità della DOC Conegliano-Valdobbiadene sia concentrata nella zona collinare di Valdobbiadene mentre nella zona più pianeggiante di Conegliano la variabilità è molto più contenuta. Nella regione di coltivazione della varietà Raboso il grado di biodiversità non solo è maggiore ma anche omogeneamente distribuito sul territorio.

Inoltre, indagini genetiche effettuate hanno evidenziato che le popolazioni di lieviti provenienti dalle due aree geografiche si dimostrano geneticamente molto diverse: solo 2 ceppi su 167 sono stati ritrovati contemporaneamente nelle due DOC (Conegliano-Valdobbiadene e Piave), indicando dunque un'evoluzione indipendente dei lieviti indigeni.

Infine è stata effettuata anche l'analisi del DNA mitocondriale dei principali lieviti selezionati commerciali utilizzati dai produttori delle due regioni, che ha permesso di rilevare la presenza alcuni di tali lieviti in 11 campioni distribuiti nelle diverse sottoaree, evidenziando una contaminazione da parte di questi lieviti del territorio anche a distanza considerevole dalle cantine, come peraltro già osservato in altri Paesi da precedenti lavori (Valero *et al.*, 2005).

A



B

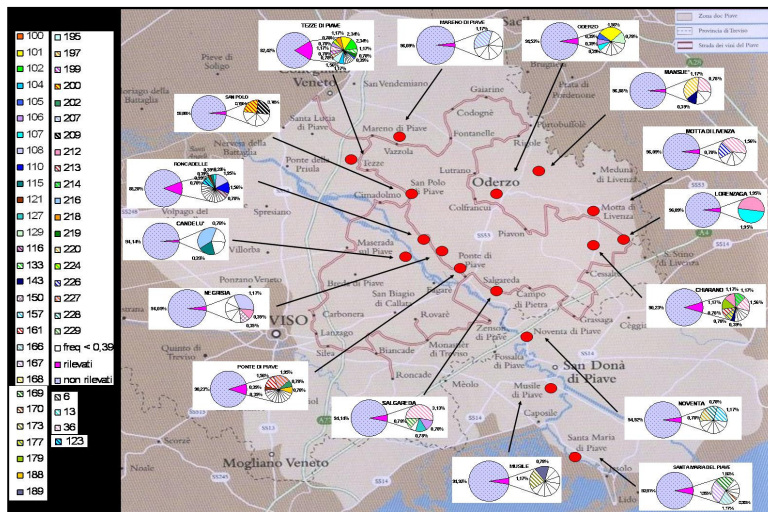
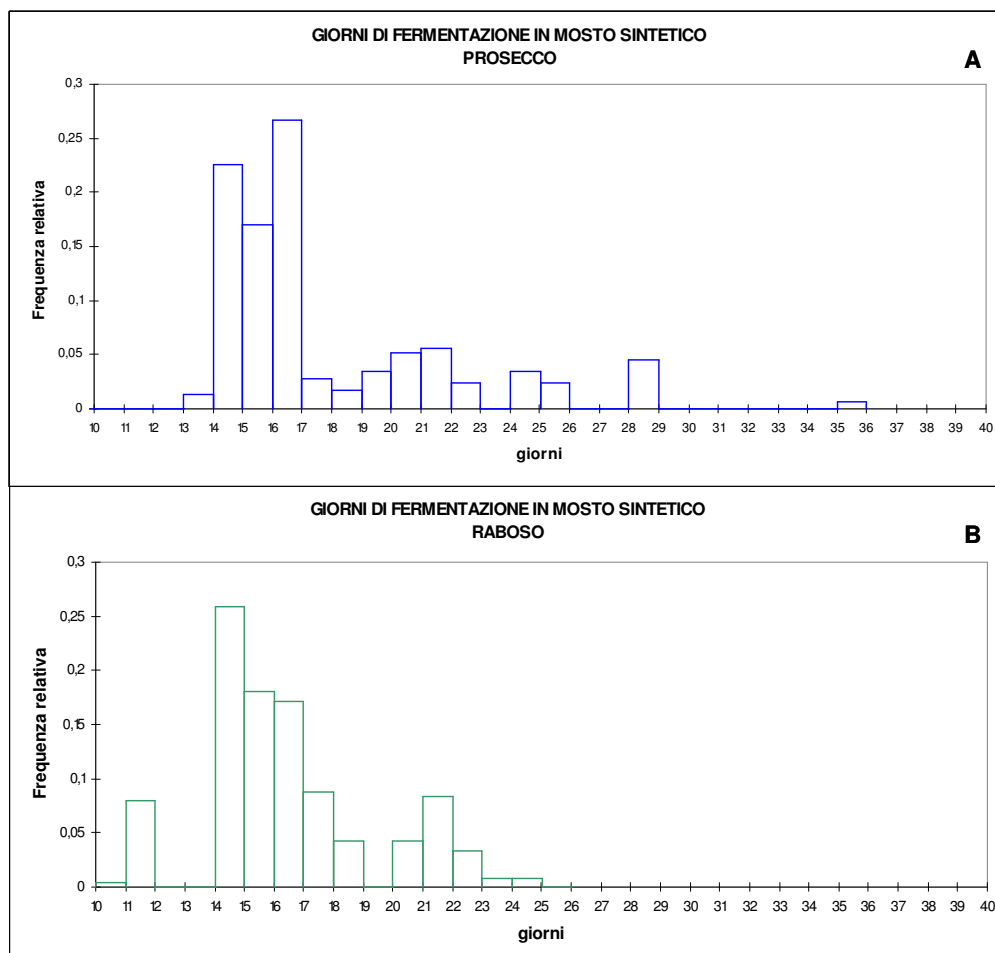


Fig. 4 Frequenza dei singoli ceppi sul totale degli lieviti isolati appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* in relazione alle località campionate nelle aree DOC Conegliano - Valdobbiadene (A) e Piave (B).

### Caratterizzazione tecnologica dei lieviti *Saccharomyces* enologici

La caratterizzazione tecnologica è stata al momento affrontata solo per i lieviti raccolti nelle DOC Conegliano-Valdobbiadene e Piave. Gli isolati ottenuti nelle fasi precedenti di campionamento e caratterizzazione genetica (308 per il Prosecco e 239 per il Raboso) sono stati sottoposti a fermentazione simulando condizioni enologiche (Vincenzini *et al.*, 2005). Ciascun isolato è stato inoculato ad una concentrazione di circa  $1,5 \times 10^6$  ufc/ml in una beuta contenente 200 ml di mosto sintetico (Delfini, 1995) e sono stati valutati i principali caratteri tecnologici durante il processo fermentativo. Il vantaggio di utilizzare mosto sintetico, rispetto a quello naturale, per una prima valutazione fisiologica, sta nella possibilità di controllare completamente l'ambiente di sviluppo e di facilitare notevolmente le operazioni di monitoraggio giornaliero della crescita.

In primo luogo è stato valutato il vigore fermentativo, calcolato come quantità di zucchero consumato nelle prime 48 ore di sviluppo, ovvero la prontezza con cui il ceppo dà inizio alla fermentazione. Successivamente è stato rilevato il consumo di zucchero a 7 giorni ed è stata registrata per ogni prova la durata (in giorni) della fermentazione, in base al momento in cui viene esaurito lo zucchero presente. I risultati relativi a questi due importanti parametri evidenziano una notevole diversità di comportamento tra le popolazioni provenienti dalle due regioni.



**Fig. 5** - Distribuzione dei ceppi provenienti da Prosecco (A) e da Raboso (B) in base alla durata della fermentazione.

Considerando la durata della fermentazione (Fig. 5) si osserva che le classi di maggior frequenza sono quelle costituite dagli isolati provenienti da Prosecco (Fig. 5A) che raggiungono la massima quantità di zucchero consumato in 16 (26,7%), 15 (17%) e 14 (22,6%) giorni. Tuttavia in questo gruppo ben il 33,2% dei ceppi sono caratterizzati da tempi di fermentazione che vanno da 17 a 28 giorni. In un solo caso sono stati necessari 35 giorni per chiudere la fermentazione.

I lieviti isolati da Raboso invece (Fig. 5B) sono caratterizzati per la maggior parte da tempi di fermentazione compresi tra 14 e 17 giorni (74% del totale, con il 26% a 14 giorni, 18% a 15 giorni e 17% a 16 giorni), mentre soltanto il 17% dei ceppi necessita di tempi superiori a 18 giorni, non superando peraltro mai i 25 giorni.

Se si esamina la quantità di zuccheri consumata durante la fermentazione a 2, 7 giorni dall'inoculo, e a fine fermentazione (Fig.6) si possono osservare ulteriori differenze tra le due popolazioni di lieviti.

Dall'analisi di questi dati si osservano notevoli differenze tra le due popolazioni. I lieviti provenienti da Prosecco (Fig. 6A) sono distribuiti su un *range* decisamente più ampio rispetto a quelli isolati da Raboso (Fig. 6B), soprattutto per quanto riguarda la quantità di glucosio fermentata a 7 giorni dall'inoculo. E' tuttavia interessante notare che la quantità di zuccheri effettivamente consumati a fine fermentazione è più alta per gli isolati dal Prosecco (dove il 62,8% consuma, in queste condizioni sperimentali, 185 g/l dei 200 disponibili) che per quelli da Raboso (che nel 79% dei casi consumano 115 g/l su 200). Quest'ultimo risultato, tuttavia, potrebbe essere parzialmente imputabile anche alle caratteristiche dei due mosti sintetici utilizzati nelle prove di fermentazione, volti a simulare le diverse caratteristiche dei due mosti naturali e delle due tipologie di vinificazione,

in particolare il pH (3,2 per il Prosecco e 2,9 per il Raboso) che, nel caso degli isolati provenienti dal vitigno a bacca nera, può aver indotto condizioni di maggiore stress.

Inoltre appare evidente che, per quanto riguarda la durata della fermentazione, vi è una maggiore eterogeneità nella popolazione proveniente da Prosecco (Fig. 5A e 6A) rispetto a quella proveniente da Raboso (Fig. 5B e 6B).

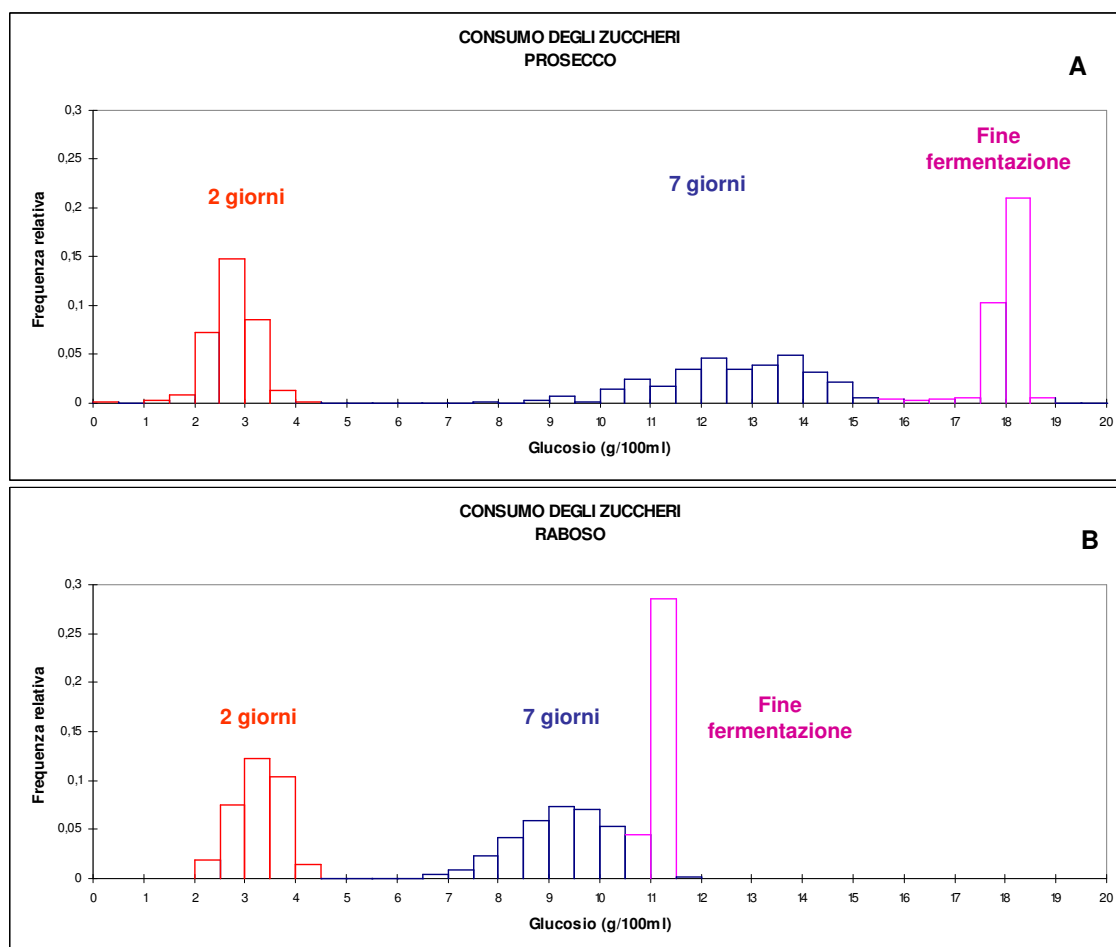


Fig. 6. - Distribuzione degli isolati da Prosecco (A) e Raboso (B) in base alle velocità del consumo di zucchero durante la fermentazione.

Per quanto riguarda la modalità di sviluppo, gli isolati provenienti dai territori di entrambe le DOC hanno dimostrato una prevalente crescita a cellule disperse (sviluppo polverulento). In relazione a questo comportamento è stato valutato anche il tempo di illimpidimento per ciascun ceppo con lo scopo di determinare le relative velocità di sedimentazione (Fig. 7).

Anche per questo parametro si osservano differenze tra le due popolazioni: nel caso dei lieviti ottenuti da Prosecco una parte considerevole di isolati (36%) presenta un tempo di illimpidimento compreso tra 6 e 8 giorni mentre il resto della popolazione mostra una distribuzione intorno ad un valore medio di 13 giorni, con un massimo di 24. Per il Raboso invece il valore medio è di 9,5 giorni, la popolazione si distribuisce in maniera più disomogenea ed il tempo massimo è di 22 giorni.

Infine, non sono state riscontrate differenze degne di nota tra le due popolazioni nella quantità di schiuma prodotta (misurata in millimetri) durante la fermentazione (Fig. 8), così come si sono avuti risultati simili nella produzione di idrogeno solforato (Fig. 9), determinato mediante crescita dei lieviti su terreno colturale "Biggy agar".

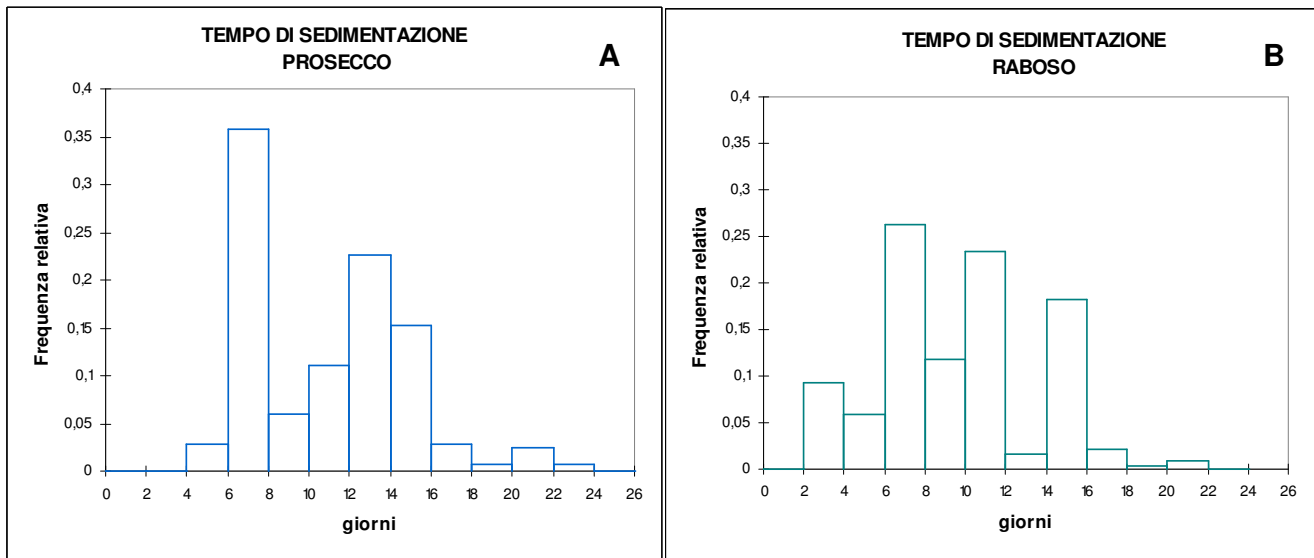


Fig. 7 - Distribuzione degli isolati da Prosecco (A) e Raboso (B) in base al tempo di illimpidimento durante la fermentazione.

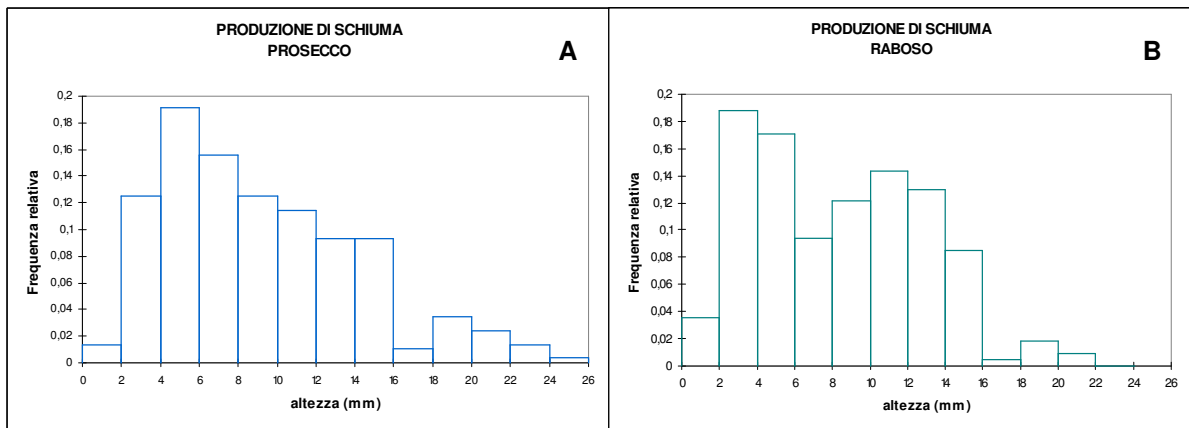


Fig. 8 - Distribuzione degli isolati da Prosecco (A) e Raboso (B) in base alla quantità massima di schiuma prodotta (misurata in millimetri) durante la fermentazione.

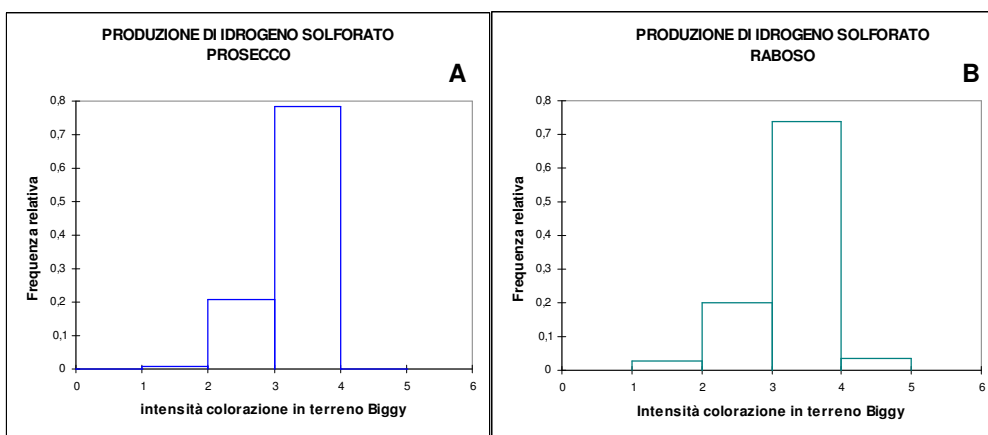


Fig. 9 - Distribuzione degli isolati da Prosecco (A) e Raboso (B) in base alla produzione di idrogeno solforato (terreno "Biggy agar")

## Conclusioni

Mediante un approccio combinato di analisi molecolari, impiegate per una caratterizzazione genetica dei lieviti raccolti, e fenotipiche, volte a definire le caratteristiche tecnologiche da questi possedute, lo studio in oggetto ha voluto indagare la relazione esistente tra la biodiversità microbica rilevata e le caratteristiche del sito di campionamento. Il complesso quadro che ne emerge, e che è tuttora oggetto di studio e approfondimento, ha evidenziato il ruolo dell'area di provenienza (intesa nel suo complesso come effetto del territorio, varietà d'uva, eventuali trattamenti tecnologici) nell'influenzare il grado di biodiversità microbica e la distribuzione dei caratteri tecnologici nelle popolazioni di lieviti analizzate. In particolare, in relazione alle tre aree DOC indagate (Conegliano-Valdobbiadene, Piave, Lison-Pramaggiore) è stata osservata, dal punto di vista quantitativo, una maggior presenza di *Saccharomyces* di interesse enologico (*Saccharomyces sensu stricto*) nei campioni provenienti dal vitigno a bacca rossa Raboso con spiccate caratteristiche di rusticità. Infatti in questo caso il 69,2% dei grappoli fermentati contiene lieviti del gruppo *Saccharomyces*, percentuale che si abbassa notevolmente per le varietà Tocai (9,7%) e Prosecco (8,5%).

Ulteriori indagini genetiche sugli isolati volte ad individuare il numero di ceppi presenti ha evidenziato, oltre ad una notevole diversità tra le popolazioni delle due zone, come il vitigno a bacca rossa è risultato associato non solo ad una maggiore quantità di *Saccharomyces* ma anche ad un livello di biodiversità decisamente più elevato (107 ceppi diversi rispetto ai 37 ottenuti da Prosecco di cui solo 2 presenti in entrambi i territori). Inoltre, nel caso del Prosecco è stata osservata una concentrazione della biodiversità principalmente nella zona più collinare (Valdobbiadene). Le ragioni di queste differenze possono essere ricercate nelle caratteristiche di rusticità del vitigno a bacca rossa che comportano una minor richiesta di trattamenti fungicidi (con effetti ben documentati anche sulle popolazioni di lievito) rispetto a varietà a bacca bianca dotate di una buccia meno spessa quali Prosecco e Tocai.

Inoltre, sempre l'uso dei fungicidi potrebbe fornire una spiegazione alle differenze di biodiversità riscontrate tra la zona di Conegliano (più pianeggiante, generalmente più umida e quindi con maggiore necessità di trattamenti) e la zona di Valdobbiadene (collinare, generalmente più ventilata e secca, e quindi con minore necessità di trattamenti). Anche la successiva caratterizzazione tecnologica ha evidenziato notevoli differenze tra le popolazioni isolate dai vigneti delle DOC Conegliano-Valdobbiadene e Piave. In particolare i lieviti provenienti da Prosecco hanno una maggiore variabilità fenotipica soprattutto per quanto riguarda lo zucchero consumato durante la fermentazione, i giorni necessari a completare la fermentazione e la velocità di sedimentazione.

I valori ottenuti si distribuiscono in un intervallo decisamente più ampio rispetto a quanto riscontrato in Raboso. Questi risultati, valutati anche in relazione alle informazioni genetiche disponibili, permettono di definire in modo più preciso il rapporto lievito-provenienza che caratterizza le due aree. Il particolare, le fermentazioni dei singoli grappoli necessarie per l'isolamento di *Saccharomyces* da uve Raboso sono state condotte generalmente in presenza di un buon numero di lieviti autoctoni che hanno incontrato condizioni piuttosto ostili per il loro sviluppo (pH basso, elevato contenuto polifenolico e alto potenziale alcolico). Questa situazione ha favorito lo sviluppo e quindi l'isolamento dei ceppi tecnicamente più robusti e competitivi. La situazione opposta si è verificata durante le fermentazioni dei singoli grappoli di Prosecco, in cui le condizioni di sviluppo (pH più elevato, moderato contenuto polifenolico e minor potenziale alcolico) hanno permesso la crescita di tutti i pochi ceppi presenti, anche quelli con scarse attitudini tecnologiche.

I ceppi scelti sulla base dei dati riportati sono stati testati ulteriormente mediante prove di crescita in mosto di Prosecco o di Raboso, i cui prodotti finali sono stati sottoposti ad analisi e a degustazione. Sui ceppi più interessanti sono state quindi condotte fermentazioni in bioreattore per verificarne la velocità di fermentazione e le necessità in azoto. Tramite prove di microvinificazione (condotte anche sulle vendemmie 2008) è infine stato possibile ottenere informazioni sull'attitudine di crescita e fermentazione dei migliori ceppi in condizioni di cantina. Questi dati costituiranno i

presupposti per la scelta dei ceppi più adeguati da utilizzare come lieviti autoctoni (selezionati) per esaltare le caratteristiche delle produzioni dei territori da cui sono stati isolati.

### Bibliografia

- Cavazza A, Grando MS & Zini C (1992) Rilevazione della flora microbica di mosti e vini Vignevini **9**: 17-20.
- Delfini C. (1995) Scienza e tecnica di microbiologia enologica. Edizioni Il Lievito, Asti.
- Lopez V, Querol A, Ramon D & Fernandez-Espinar MT (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts Int J Food Microbiol **68**: 75-81.
- Nardi T, Carlot M, De Bortoli E, Corich V & Giacomini A (2006) A rapid method for differentiating *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment FEMS Microbiol Lett **264**: 168-173.
- Perez-Coello MS, Briones Perez AI, Ubeda Iranzo JF & Martin Alvarez PJ (1999) Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region Food Microbiol **16**: 563-573.
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking Yeast **16**: 675-729.
- Querol A & Ramon D (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology Trends Food Sci Technol **7**: 73-78.
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B & Lonvaud A (2007) *Traite d'œnologie I*. Dunod, Paris.
- 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 Res **5**: 959-969.
- Vincenzini M, Romano P & Farris GA (2005) *Microbiologia del vino*. Casa editrice ambrosiana, Milano.