



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

GESAAF
DIPARTIMENTO DI GESTIONE
DEI SISTEMI AGRARI,
ALIMENTARI E FORESTALI

Lisa Granchi

**Sezione Scienze e
Tecnologie Alimentari e
Microbiologiche**

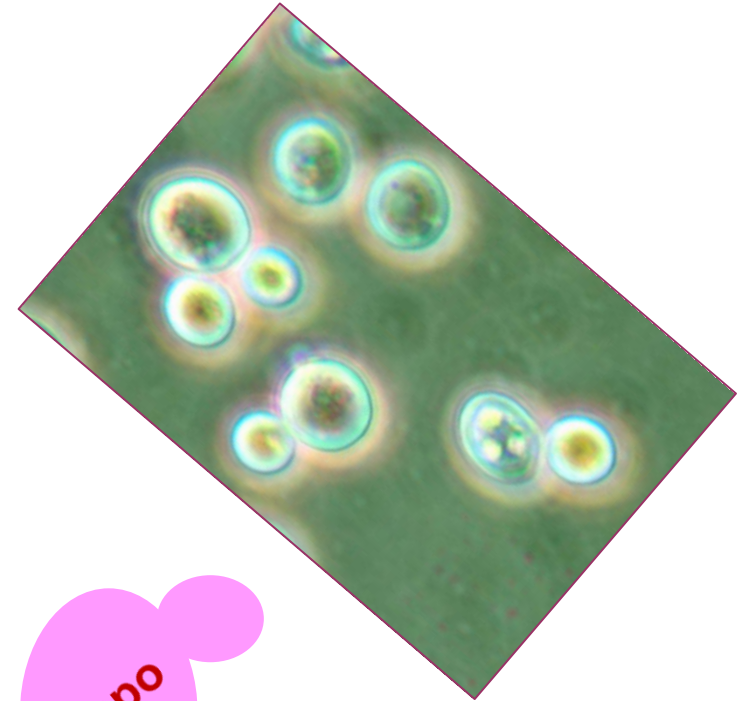
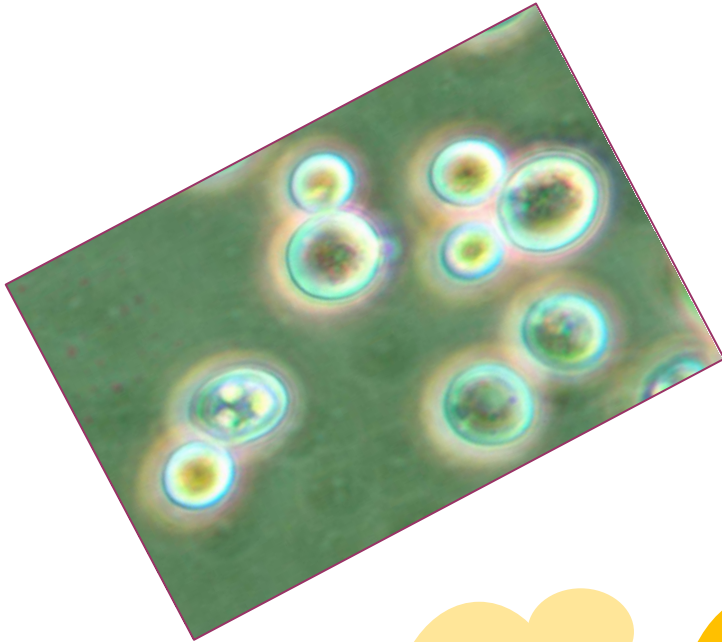
e-mail: lisa.granchi@unifi.it

Montepaldi, 5 luglio 2018

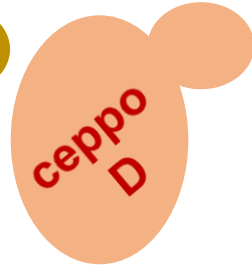


***I lieviti autoctoni:
selezione e impiego
in enologia***

Lieviti autoctoni: specie *Saccharomyces cerevisiae*



Tanti CEPPI DIVERSI



Conoscenze sulla biodiversità e sull'evoluzione delle popolazioni di *S. cerevisiae* grazie allo sviluppo di TECNICHE MOLECOLARI (studio del DNA e RNA)

IL termine «autoctono»

Dal greco αὐτόχθων, composto da αὐτός «**stesso**» e χθών «**terra**»

In microbiologia enologica:



Popolazione di lievito presente nel proprio «habitat di crescita» come frutto di una selezione naturale o di un processo di domesticazione

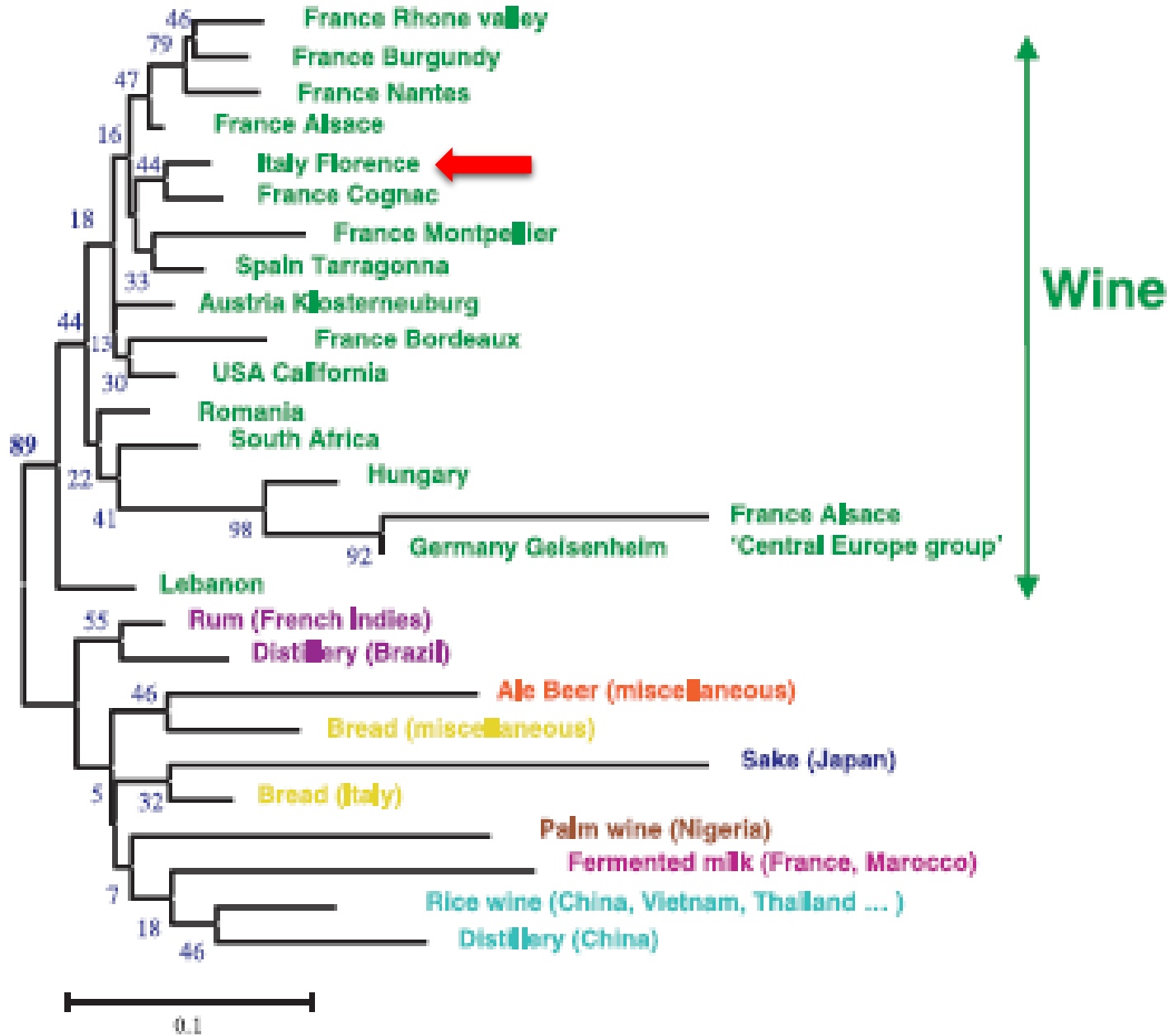
Il concetto della «domesticazione» e gli effetti sulla struttura delle popolazioni di *S. cerevisiae*



Intervento dell'uomo che condiziona l'evoluzione di *S. cerevisiae* in natura

- ❖ L'uso dei solfiti e del rame in vigneto ed in cantina ha determinato una pressione selettiva per cui il 50% dei lieviti isolati da mosti nel mondo possiede un gene, *SSU1-R*, che conferisce loro un alto livello di resistenza ai solfiti (*Perez-Ortin. 2002*)
- ❖ E' grazie all'attività dell'uomo, e non in natura, che si verificano condizioni ottimali, di nicchia per la proliferazione dei lieviti *S. cerevisiae*
- ❖ Nel vigneto, sulla superficie di acini sani, *S. cerevisiae* è poco presente
- ❖ Le popolazioni di *S. cerevisiae* sono sempre più abbondanti nelle cantine che non nei vigneti confermando il forte ruolo dell'attività umana nel condizionarne l'evoluzione

Studi basati sull'analisi della sequenza del DNA di *S. cerevisiae*



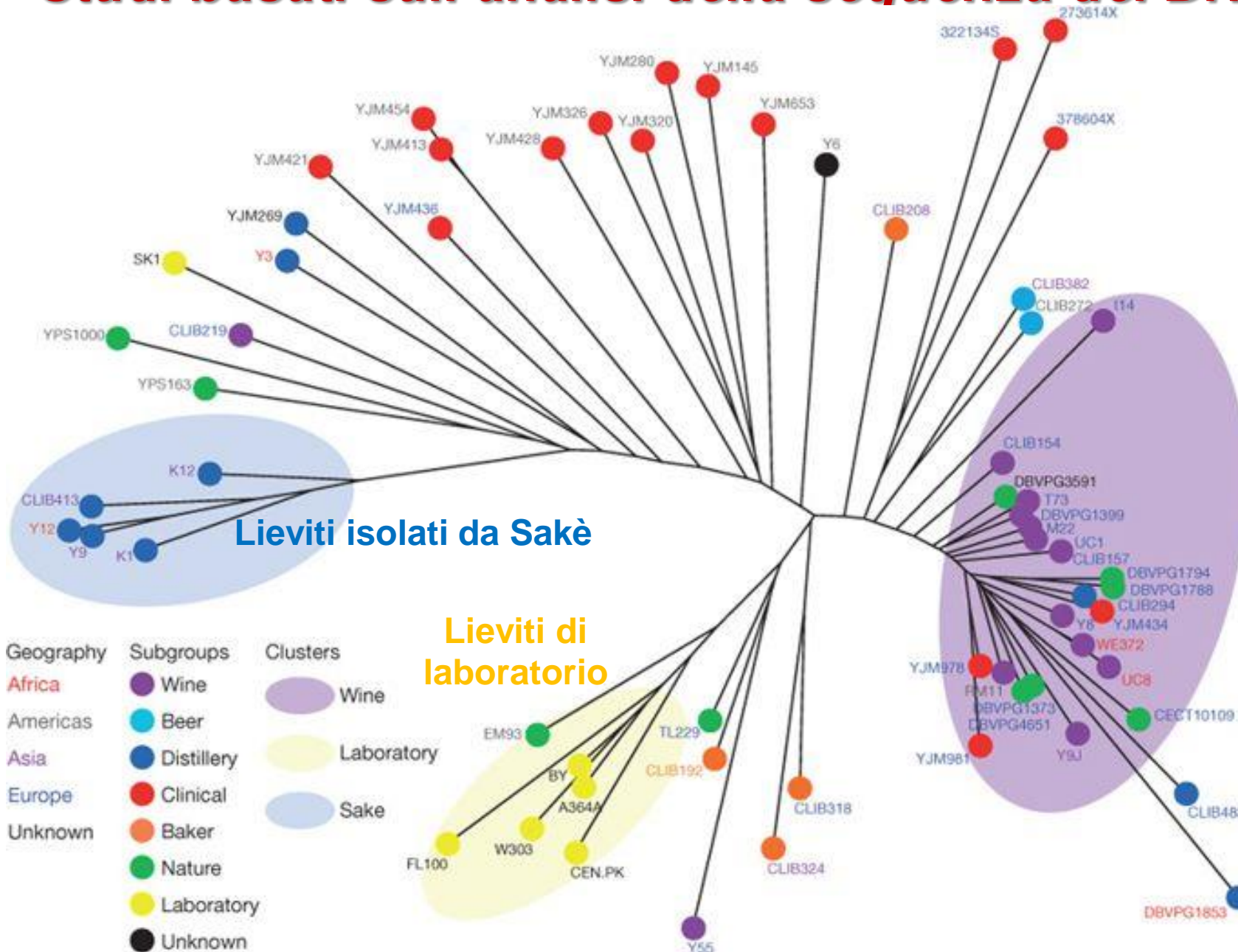
❖ Ceppi di *S. cerevisiae* isolati da mosti in diverse aree geografiche del mondo sono diversi ma raggruppabili in un unico *cluster*

❖ L'uomo, con le sue pratiche agronomiche ed enologiche, ha esercitato sulla biodiversità di *S. cerevisiae* un effetto potente che si sovrappone a quello dell'origine geografica

0.1

(Legras et al. 2007)

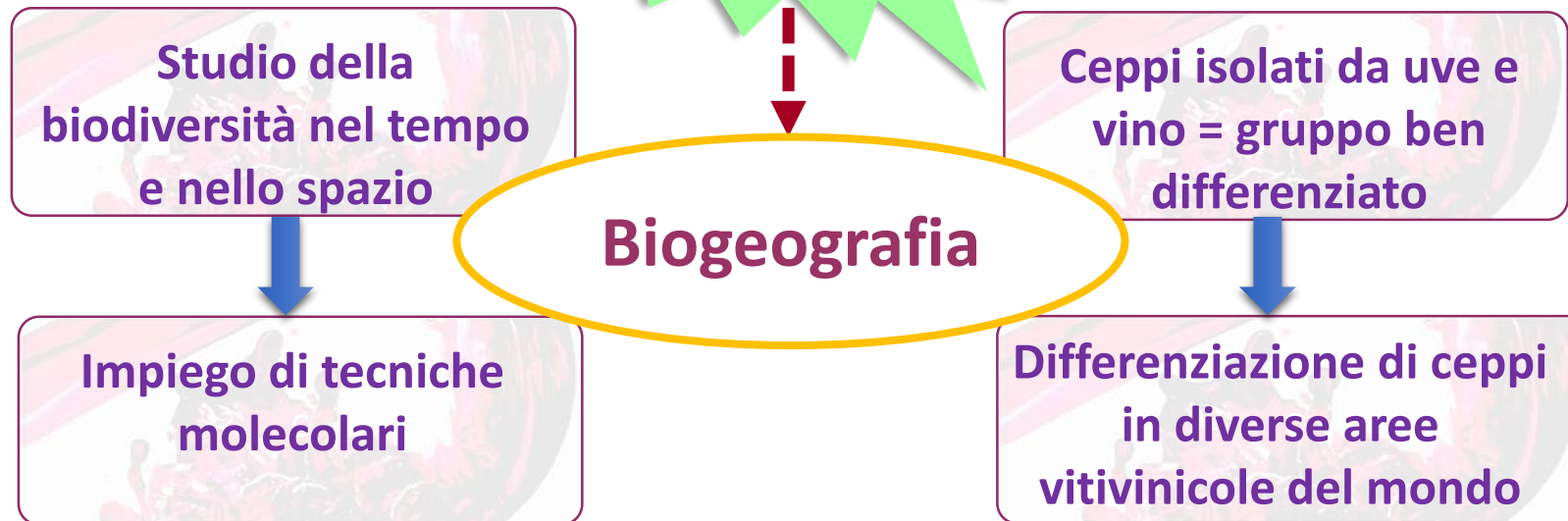
Studi basati sull'analisi della sequenza del DNA di *S. cerevisiae*



Lieviti isolati da VINO

Geography	Subgroups	Clusters
Africa	Wine	Wine
Americas	Beer	Laboratory
Asia	Distillery	Sake
Europe	Clinical	
Unknown	Baker	
	Nature	
	Laboratory	
	Unknown	

Saccharomyces cerevisiae



Richiesta di ceppi di *S. cerevisiae* indigeni che riflettano la biodiversità di una specifica area → «**TERROIR**»

TIPICITA' e QUALITA' del VINO

Valorizzazione di vini tipici prodotti con lieviti autoctoni



- ✓ “Isolamento e caratterizzazione di lieviti **ecotipici** per la valorizzazione dei vini Soave e Valpolicella *Tosi et al. 2005*
Provincia di Verona
- ✓ “Selezione di lieviti **autoctoni** *Saccharomyces* per la produzione di vino Amarone” *Malacrinò et al. 2005* Vignevini
- ✓ “Genetic and phenotypic diversity of **autochthonous** *Saccharomyces* spp. Strains associated to natural fermentation of “Malvasia delle Lipari” *Agnolucci et al. 2007* Lett. Appl. Microbiol.
- ✓ “**Indigenous** yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation” *Francesca et al. 2009* World J. Microbiol. Biotechnol.
- ✓ “Relazione tra **provenienza geografica**, caratteristiche genetiche e caratteri tecnologici in ceppi enologici di *Saccharomyces cerevisiae*” *Corich et al. 2009* Rivista Vitic. Enol.
- ✓ Progetto regionale-Università di Piacenza “ Valorizzazione dei vini doc “Ortrugo dei Colli Piacentini” e “Montuni del Reno” mediante l’impiego di **lieviti autoctoni** 2004-2006
- ✓ Progetto-Università di Napoli e Palermo “**Lieviti del territorio** per la valorizzazione dei vini irpini” 2004-2009
- ✓ Selection of an **autochthonous** *Saccharomyces cerevisiae* strain for the vinification of “Moscato di Saracena”, a southern Italy (Calabria Region) passito wine. *Blaiotta e Aponte, Università di Napoli 2016*

Qual è la «nicchia ecologica» di *S. cerevisiae* ?

- 1. L'area vitivinicola o geografica di isolamento dei lieviti ?**
- 2. Il vigneto e la varietà di uva ?**
- 3. La cantina da cui sono isolati i lieviti durante le fermentazioni nei vari vasi vinari?**

Quesiti?



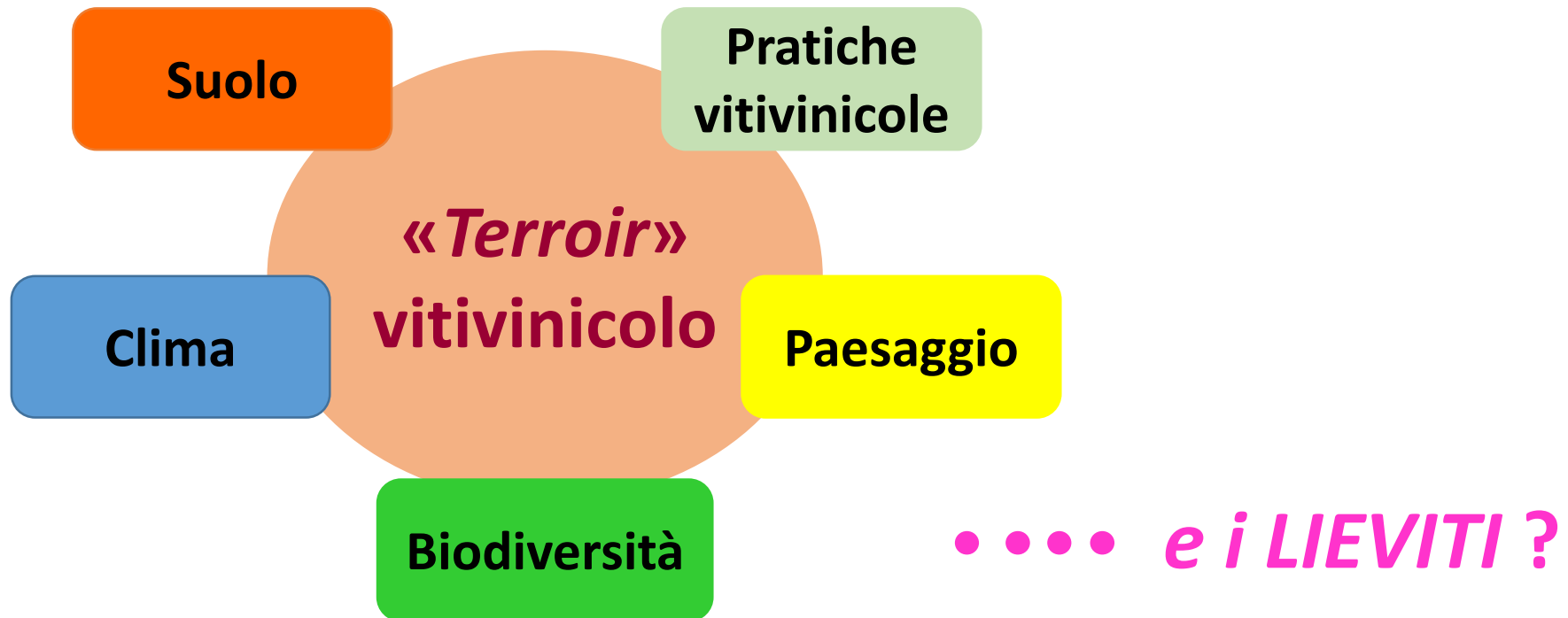
- ❖ E' possibile dimostrare la relazione tra ceppi di *S. cerevisiae* indigeni e zona enologica di provenienza ?
- ❖ Esiste una relazione tra ceppi di *S. cerevisiae* e varietà di uva vinificata?
- ❖ Qual è il contributo dei *S. cerevisiae* indigeni all'identità sensoriale di un vino?
- ❖ E' possibile individuare le proprietà metaboliche dei ceppi di lievito che determinano le caratteristiche organolettiche tipiche di un vino?

Terroir



Il **“terroir” vitivinicolo** è un concetto che si riferisce a uno spazio nel quale si sviluppa una cultura collettiva delle interazioni tra un **ambiente fisico** e **biologico identificabile**, e le **pratiche vitivinicole** che vi sono applicate, che **conferiscono caratteristiche distintive ai prodotti originari di questo spazio**.

Il **“terroir”** include caratteristiche specifiche del suolo, della topografia, del clima, del paesaggio e della biodiversità



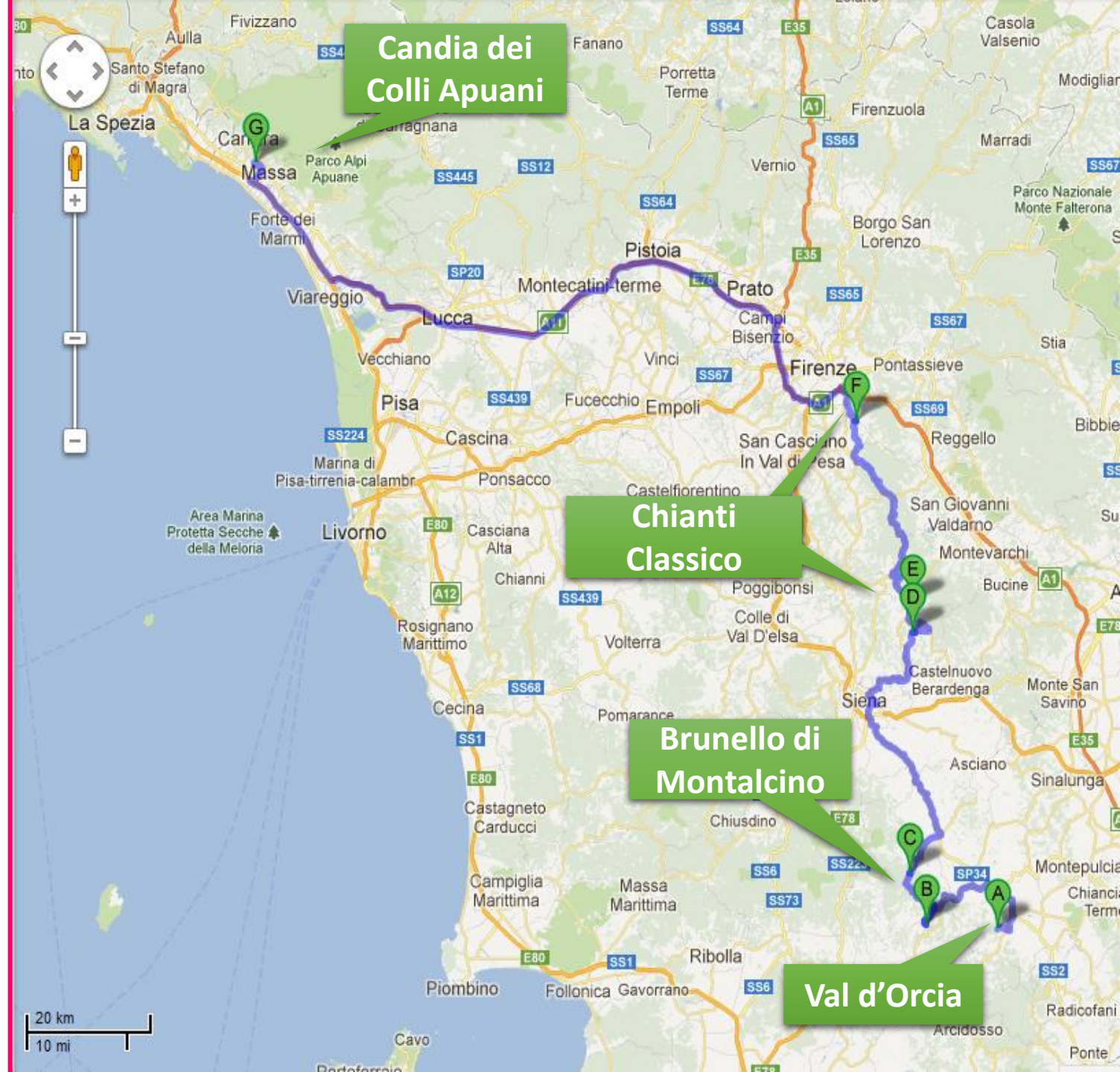
TOSCANA

7 Cantine

4 zone di produzione

2 DOCG

2 DOC



CANTINE

A Sangiovese
Merlot
Pinot nero

B Sangiovese

C Sangiovese
Merlot

D Sangiovese
Merlot

E Sangiovese
Merlot
Cabernet

F Sangiovese
Cabernet

G Vermentino nero
Vermentino bianco



2
2
2

2

4
4

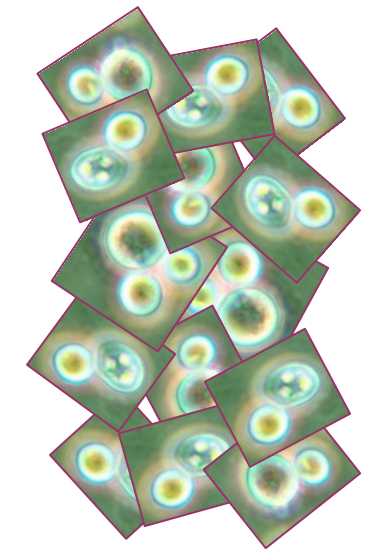
4
2

1
2
1

1
1

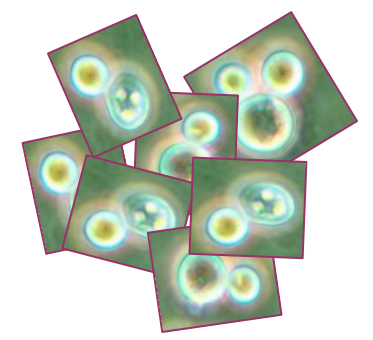
3
3

VASSI
VINARI

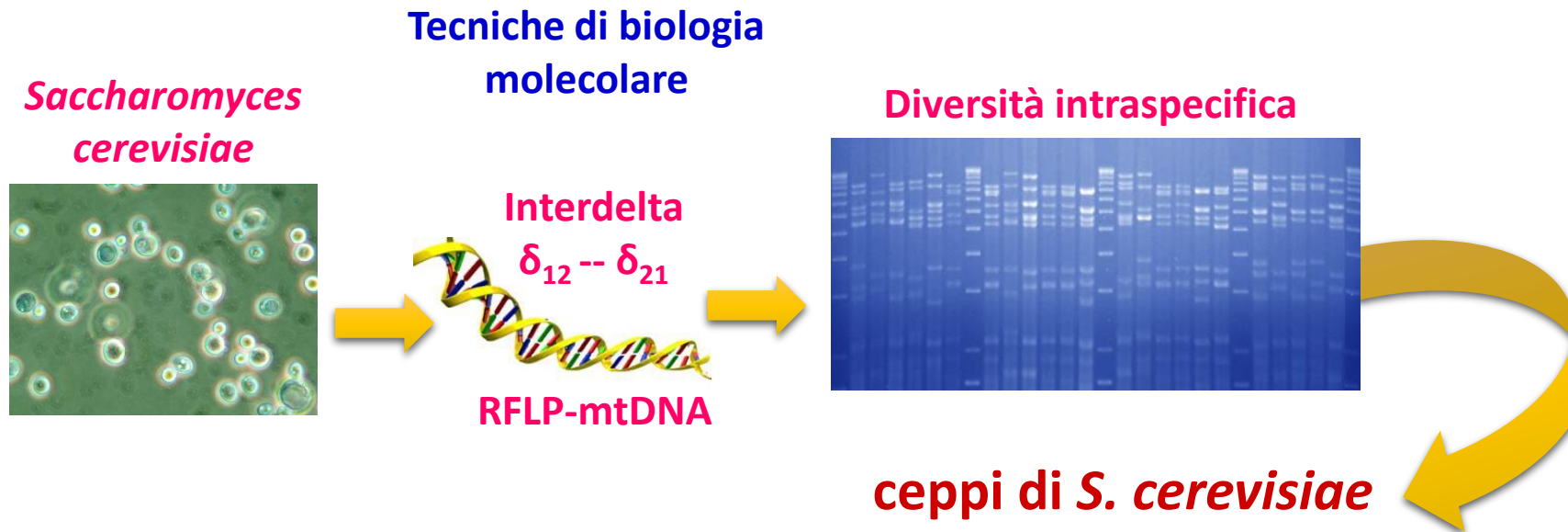


= 670

isolati di *S. cerevisiae*



Schema sperimentale: coltura dipendente





Sangiovese

Merlot

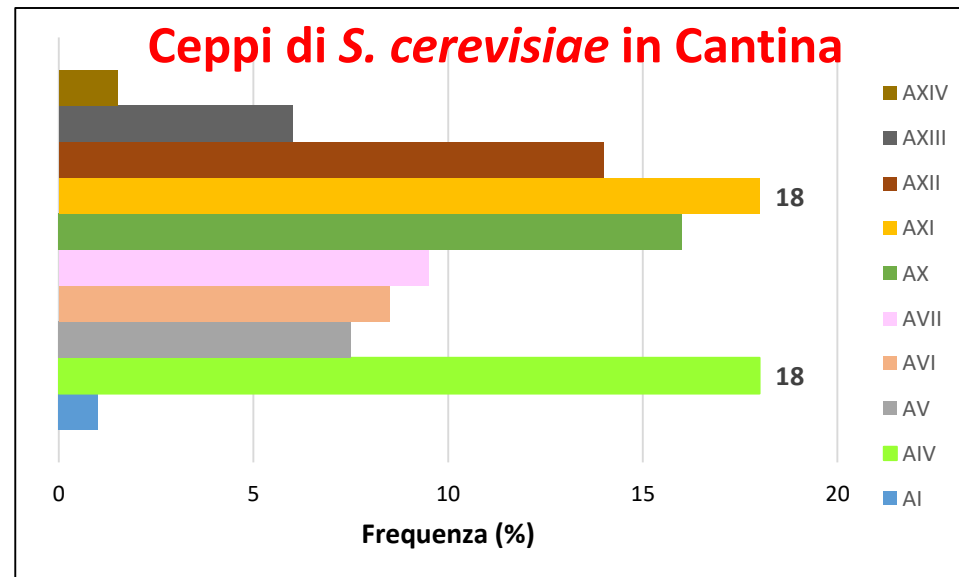
Pinot nero

Val d'Orcia

Vasca	Profilo molecolare	Frequenza (%)
AS1	AIV - AV - AVI - AVII - AXII - AXIII	46 - 17 - 17 - 4 - 8 - 8
AS2	AIV - AV - AVI - AVII - AXII - AXIII	29 - 8 - 21 - 17 - 12.5 - 12.5
AM1	AI - AIV - AV - AVII - AX AXII AXIV	4 - 4 - 13 - 13 - 36 - 26 - 4
AM2	AVI - AVII AX - AXIV	4 - 12.5 - 79.5 - 4
AP1	AX - AXI	90 - 10
AP2	AIV - AX - AXI - AXII - AXIII	16.5 - 16.5 - 8.5 - 42 - 16.5

Stessi ceppi in vasche con diverse varietà di uva

1 ceppo predominante in ciascuna vasca



2-3
ceppi dominanti

Brunello di Montalcino

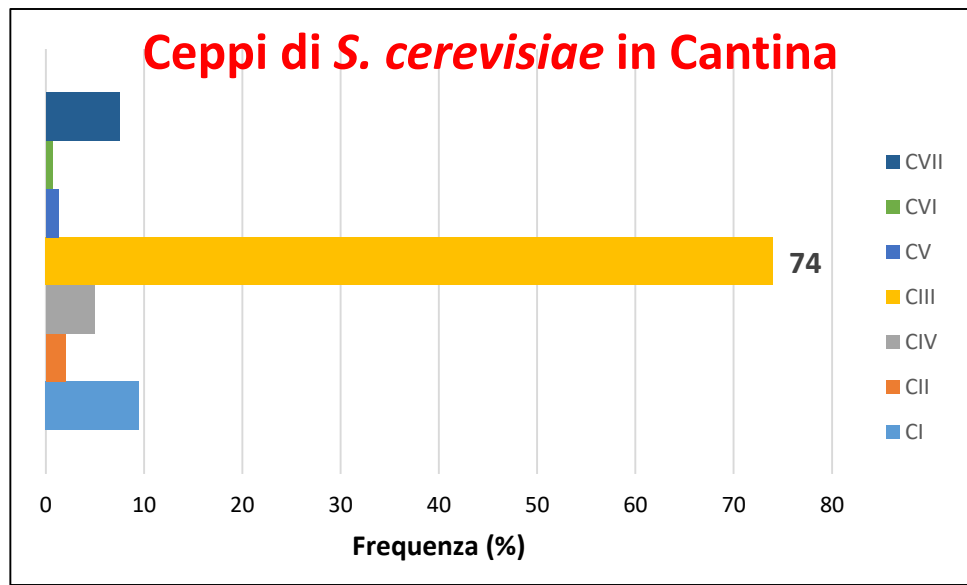
B Sangiovese

BS1	BI - BII - BIII - BIV - BVII - BVIII - BIX	10 - 35 - 5 - 35 - 5 - 5 - 5
BS2	BII - BIV - BV - BVI - BVII - BVIII - BX - BXI - BXII - BXIII - BXIV - BXV - BXVI	20.2 - 3.8 - 3.8 - 15.2 - 11.4 - 7.6 - 3.8 - 3.8 - 15.2 - 3.8 - 3.8 - 3.8 - 3.8

3 ceppi dominanti

C Sangiovese Merlot

CS1	CI - CII - CIII - CIV - CVI - CVII	10 - 5 - 10 - 25 - 5 - 45
CS2	CI - CII - CIII - CIV - CV - CVII	10 - 5 - 60 - 5 - 5 - 15
CS3	CI - CIII - CIV - CV	10.6 - 73.5 - 10.6 - 5.3
CS4	CI - CIII	10 - 90
CM1	CI - CIII	10 - 90
CM2	CI - CIII	5 - 95
CM3	CI - CIII	16 - 84
CM4	CI - CIII	5 - 95



1 ceppo dominante

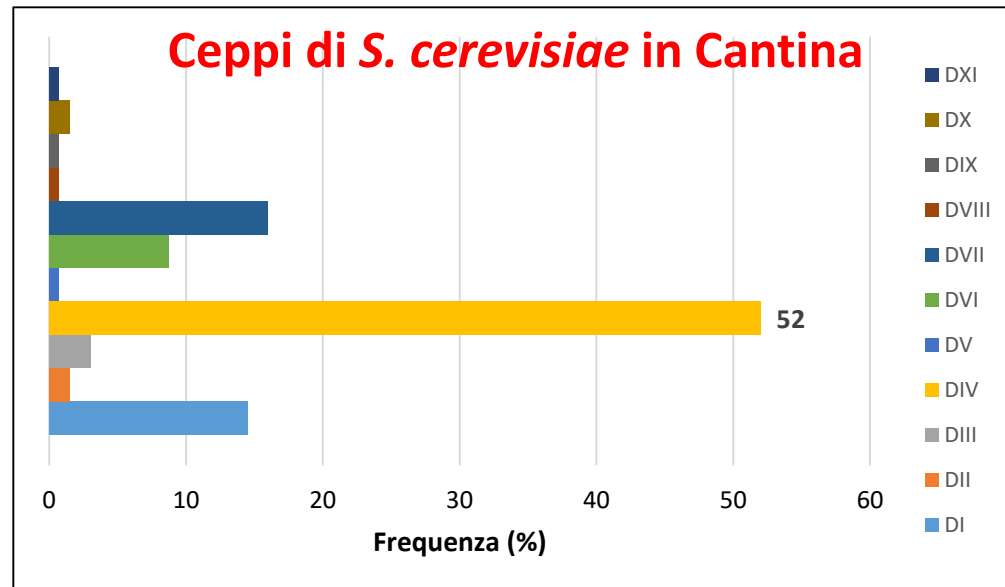
Chianti Classico

D Sangiovese Merlot

DS1	DI - DIV - DVI - DX	4.2 - 83.2 - 4.2 - 8.4
DS2	DIV - DVI - DVII	69.6 - 17.4 - 13
DS3	DI - DII - DIV - DVI - DVII - DXI	12.5 - 4.2 - 41.6 - 12.5 - 25 - 4.2
DS4	DI - DIV - DIII - DIV - DVI - DVII - DVIII	18 - 9 - 9 - 28 - 13.5 - 18 - 4.5
DM1	DI - DII - DIII - DIV - DV	50 - 5 - 5 - 35 - 5
DM2	DI - DIII - DIV - DVI - DVII - DIX	4.25 - 4.25 - 46 - 4.25 - 37 - 4.25

Stessi ceppi in vasche con diverse varietà di uva

1 ceppo predominante in ciascuna vasca



1 ceppo dominante

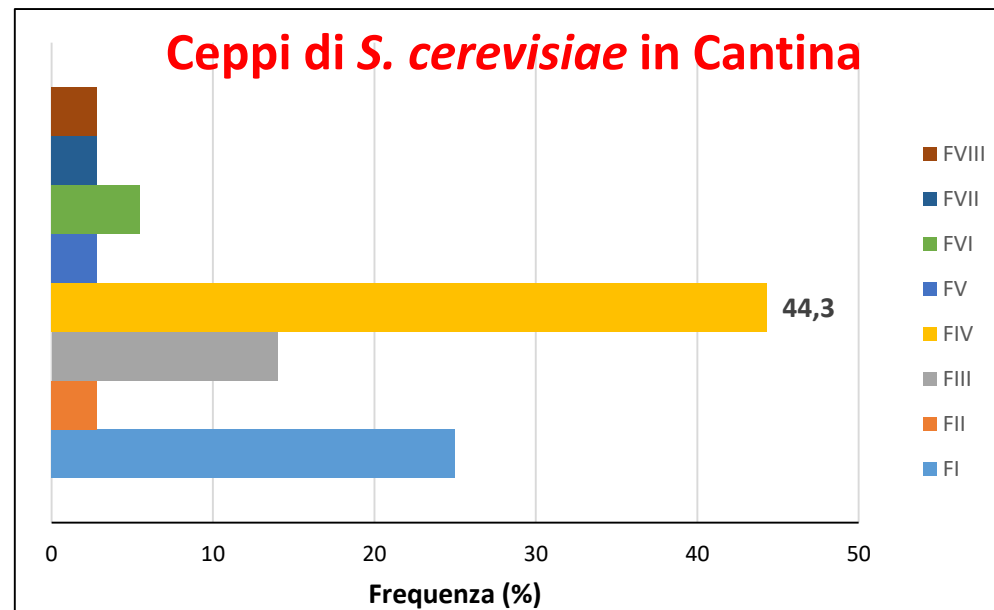
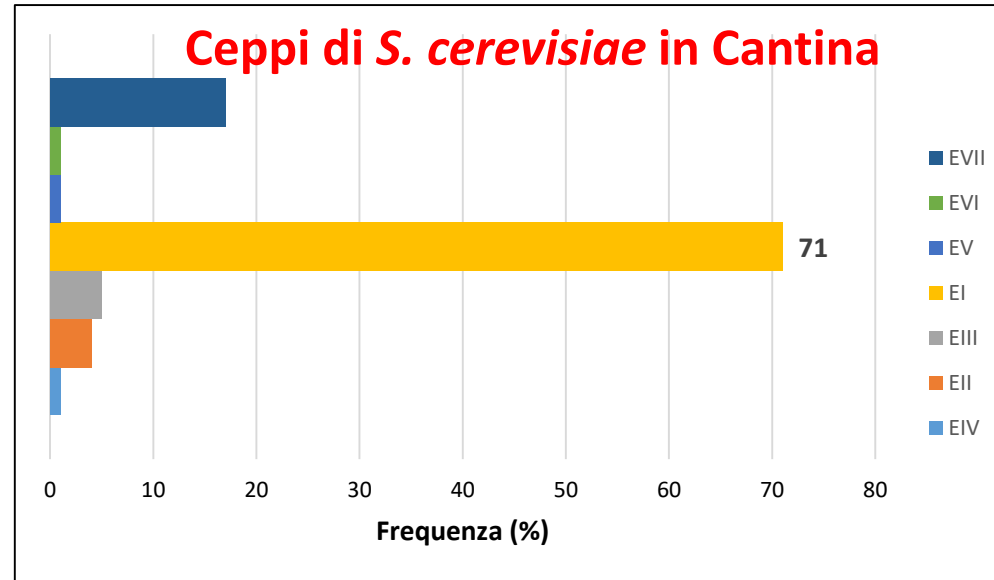


ES1	EI - EVII	40 - 60
EM1	EI - EII - EIII - EIV - EV - EVI	68.5 - 14 - 7 - 3.5 - 3.5 - 3.5
EM2	EI - EIII	96 - 4
EC1	EI - EIII - EVII	71.5 - 9.5 - 19

**Chianti
Classico**



FS1	FI - FII - FIII - FIV - FV - FVII	16.5 - 5.5 - 27.8 - 39.2 - 5.5 - 5.5
FCA	FI - FIV - FVI - FVIII	33.3 - 50.2 - 11.1 - 5.5



**1-3
ceppi
dominanti**



Vermentino nero
Vermentino bianco

Candia dei Colli Apuani

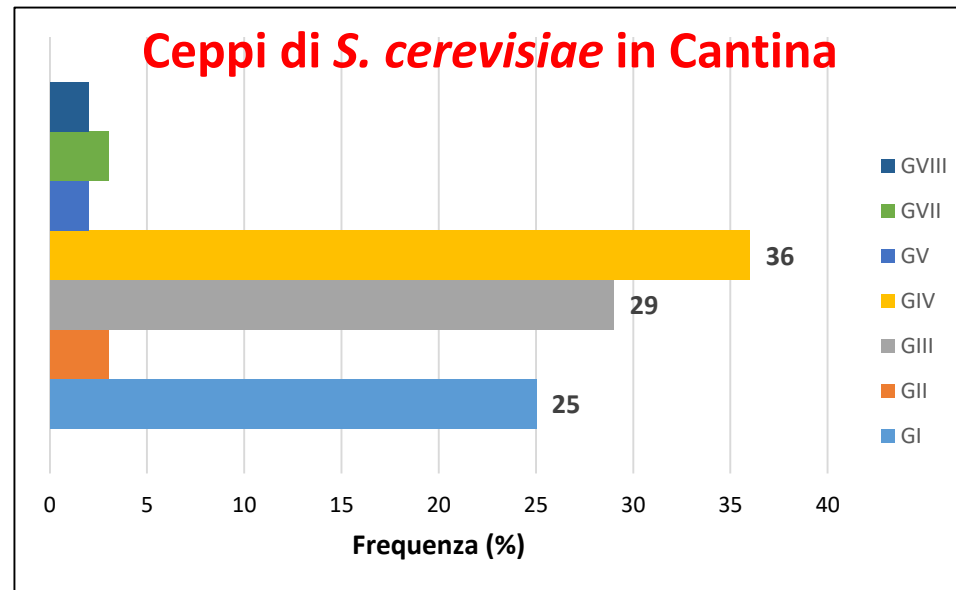
GVN1	GI - GII - GIII - GIV - GV	42 - 8 - 8 - 34 - 8
GVN2	GI - GII - GIV	60 - 10 - 30
GVN3	GI - GIII - GIV - GVII - GVIII	44 - 25 - 19 - 6 - 6
GVB1	GI - GIII - GIV - GVII	13.5 - 40 - 40 - 6.5
GVB2	GI - GIII - GIV	6.5 - 53.5 - 40
GVB3	GI - GII - GIII - GIV - GV	13.5 - 6.5 - 26.5 - 47 - 6.5



Stessi ceppi in vasche con diverse varietà di uva

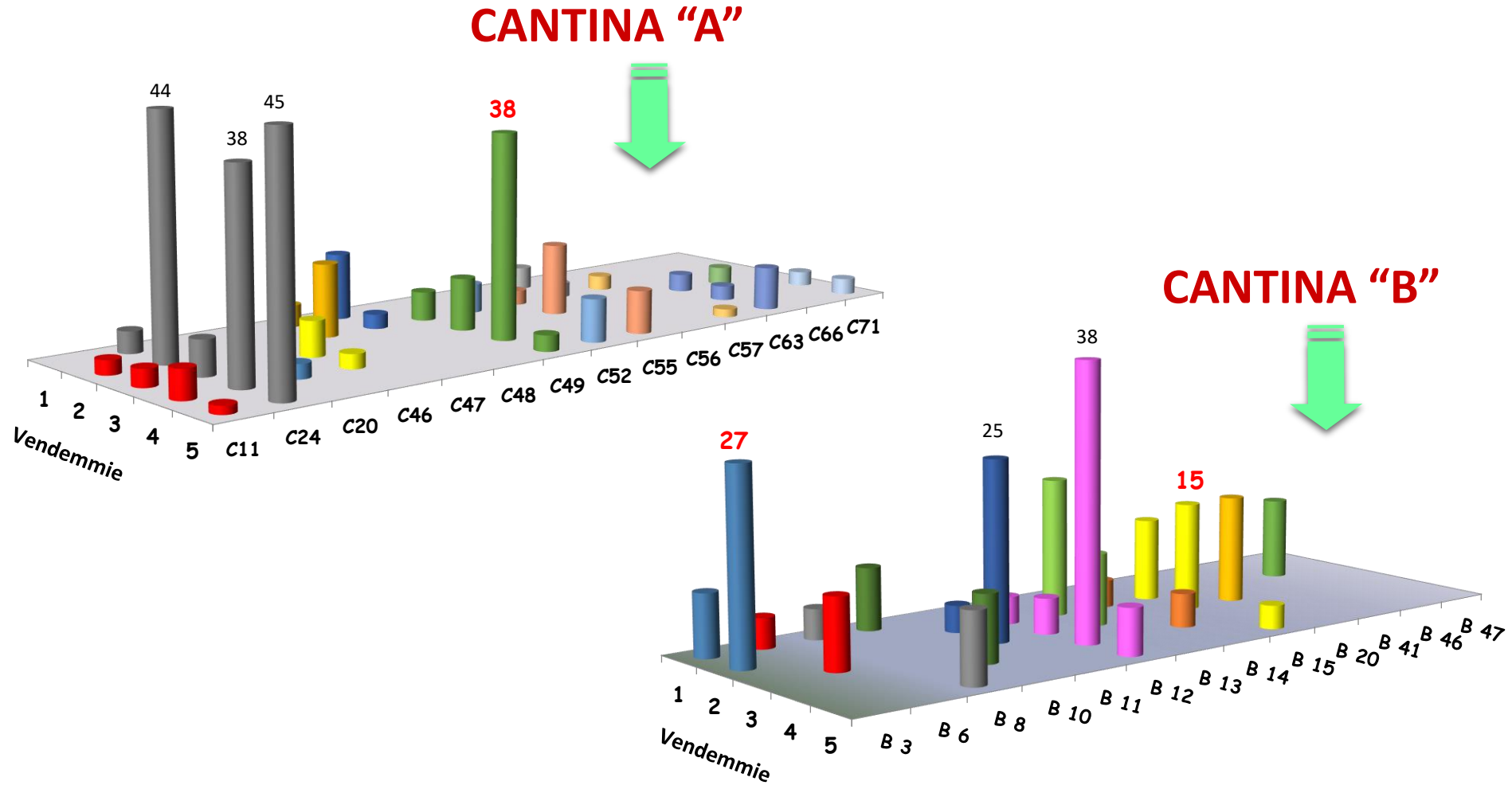


1 ceppo predominante in ciascuna vasca



3
ceppi dominanti

.....ed in annate successive, in una stessa cantina, ricorrono gli stessi ceppi ?



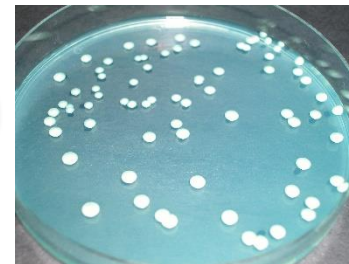
Indipendentemente dalla cantina ceppi "RICORRENTI" a diversa frequenza
Alcuni "PREDOMINANTI"

Conferma in laboratorio in mosto sintetico della predominanza dei ceppi di *S. cerevisiae*

Cantina	Profilo	Frequenza %	Profilo	Frequenza %
A	A XII	54	A II	2
B	B II	46	B I	4
C	C III	74	C VI	0,7
D	D IV	52	D XI	0,7
E	E V	32	E VI	2,5
F	F IV	44	F V	2
G	G IV	36	G VII	6

Fermentazioni di laboratorio con i due diversi ceppi di ciascuna cantina inoculati alla stessa concentrazione cellulare

Caratterizzazione molecolare degli isolati



Inizio e fine FA

Risultati dopo 24 ore



Cantina	<i>S. cerevisiae</i> popolazione totale	Ceppo dominante		Ceppo minoritario	
	(UFC/mL)	(%)	UFC/mL	(%)	UFC/mL
A	6.20X10 ⁷	79	4.90X10 ⁷	21	1.30X10 ⁷
B	4.25X10 ⁷	83	3.53X10 ⁷	17	7.22X10 ⁶
C	5.75X10 ⁷	71	40.8X10 ⁷	29	1.67X10 ⁷
D	5.20X10 ⁷	67	3.48X10 ⁷	33	1.71X10 ⁷
E	5.25X10 ⁷	78	4.09X10 ⁷	22	1.15X10 ⁷
F	5.05X10 ⁷	87	4.39X10 ⁷	13	6.56X10 ⁶

Risultati fine fermentazione

Cantina	<i>S. cerevisiae</i> popolazione totale	Ceppo dominante		Ceppo minoritario	
	(UFC/mL)	(%)	UFC/mL	(%)	UFC/mL
A	8.15X10 ⁷	100	8.15X10 ⁷	-	-
B	7.60X10 ⁷	100	7.60X10 ⁷	-	-
C	7.30X10 ⁷	96	7.01X10 ⁷	4	2.9X10 ⁶
D	7.55X10 ⁷	100	7.55X10 ⁷	-	-
E	7.45X10 ⁷	96	7.15X10 ⁷	4	3.0X10 ⁷
F	7.55X10 ⁷	100	7.55X10 ⁷	-	-

Confermato in laboratorio il comportamento dei ceppi predominanti in cantina

Quantifying the effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of predominant *Saccharomyces cerevisiae* strains occurring in spontaneous wine fermentations.

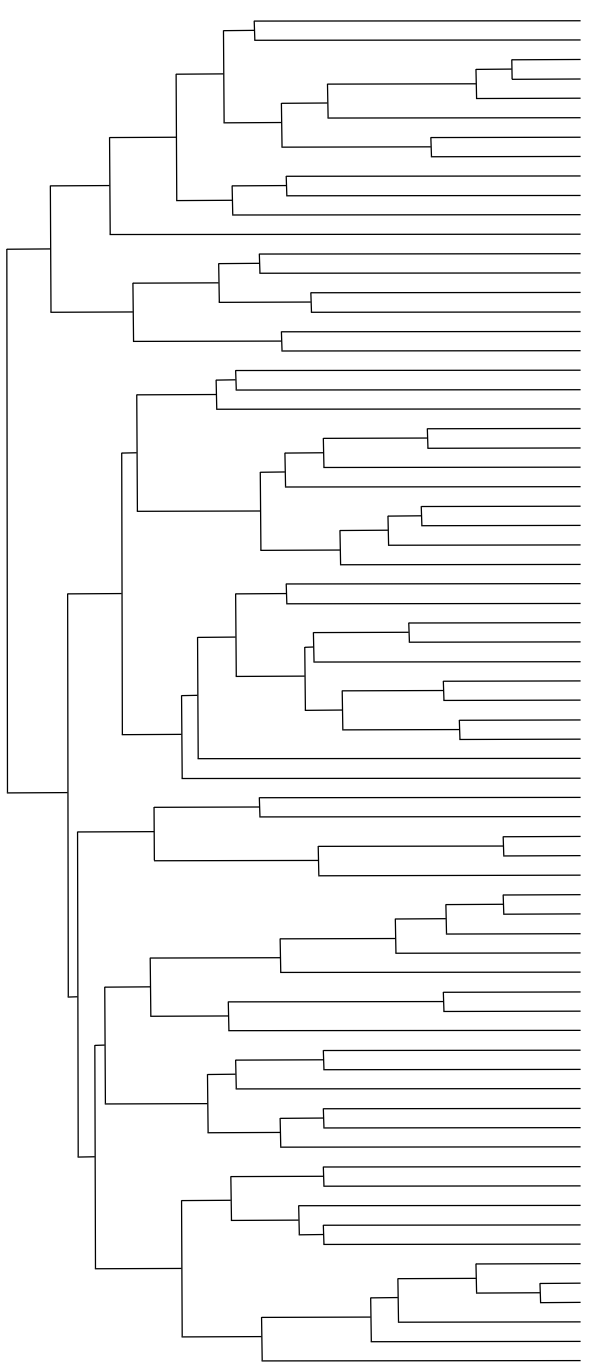
Donatella Ganucci¹, Simona Guerrini¹,  Silvia Mangani¹, Massimo Vincenzini² and  Lisa Granchi^{2*}

¹FoodMicroTeam Spin Off dell'Università degli Studi di Firenze, Italy

²Università degli Studi di Firenze, Italy

Different *Saccharomyces cerevisiae* strains are simultaneously or in succession involved in spontaneous wine fermentations. In general, few strains occur at percentages higher than 50% of the total yeast isolates (predominant strains), while a variable number of other strains are present at percentages much lower (secondary strains). Since *S. cerevisiae* strains participating in alcoholic fermentations may differently affect the chemical and sensory qualities of resulting wines, it is of great importance to assess whether the predominant strains possess a “dominant character”. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the predominance of some *S. cerevisiae* strains results from a better adaptation capability (fitness advantage) to the main stress factors of oenological interest: ethanol and temperature. Predominant and secondary *S. cerevisiae* strains from different wineries were used to evaluate the individual effect of increasing ethanol concentrations (0-3-5 and 7% v/v) as well as the combined effects of different ethanol concentrations (0-3,5 and 7% v/v) at different temperature (25-30 and 35°C) on yeast growth. For all the assays, the lag phase period, the maximum specific growth rate (μ_{max}) and the maximum cell densities were estimated. In addition, the fitness advantage between the predominant and secondary strains was calculated. The findings pointed out that all the predominant strains showed significantly higher μ_{max} and/or lower lag phase values at all tested conditions. Hence, *S. cerevisiae* strains that occur at higher percentages in spontaneous alcoholic fermentations are more competitive, possibly because of their higher capability to fit the progressively changing environmental conditions in terms of ethanol concentrations and temperature.

20 40 60 80 100



A XIV
A IV
A XII
A XI
A XXII
A XVI
A VII
A VI
A V
A X
A I
A XIII
G V
G III
G IV
G I
G VII
G II
B XIII
B XI
B VII
B II
B V
B X
B VI
B VIII
B IX
B III
B I
D IX
DX
DVI
DXI
DVII
DIV
DV
DI
DII
DIII
DVIII
B XII
B XVI
F VII
F III
F V
F VIII
F IV
F I
F II
F VI
B IV
B XV
C IV
C I
C VI
C V
C III
C II
C VII
E II
E VI
E IV
E III
S1
S2
S3
S4
S5
S7
S8

CANTINA A Val d'Orcia

CANTINA G Candia dei Colli Apuani

CANTINA B Brunello di Montalcino

CANTINA D Chianti Classico

CANTINA F Chianti Classico

CANTINA C Brunello di Montalcino

CANTINA E Chianti Classico

STARTER LSA

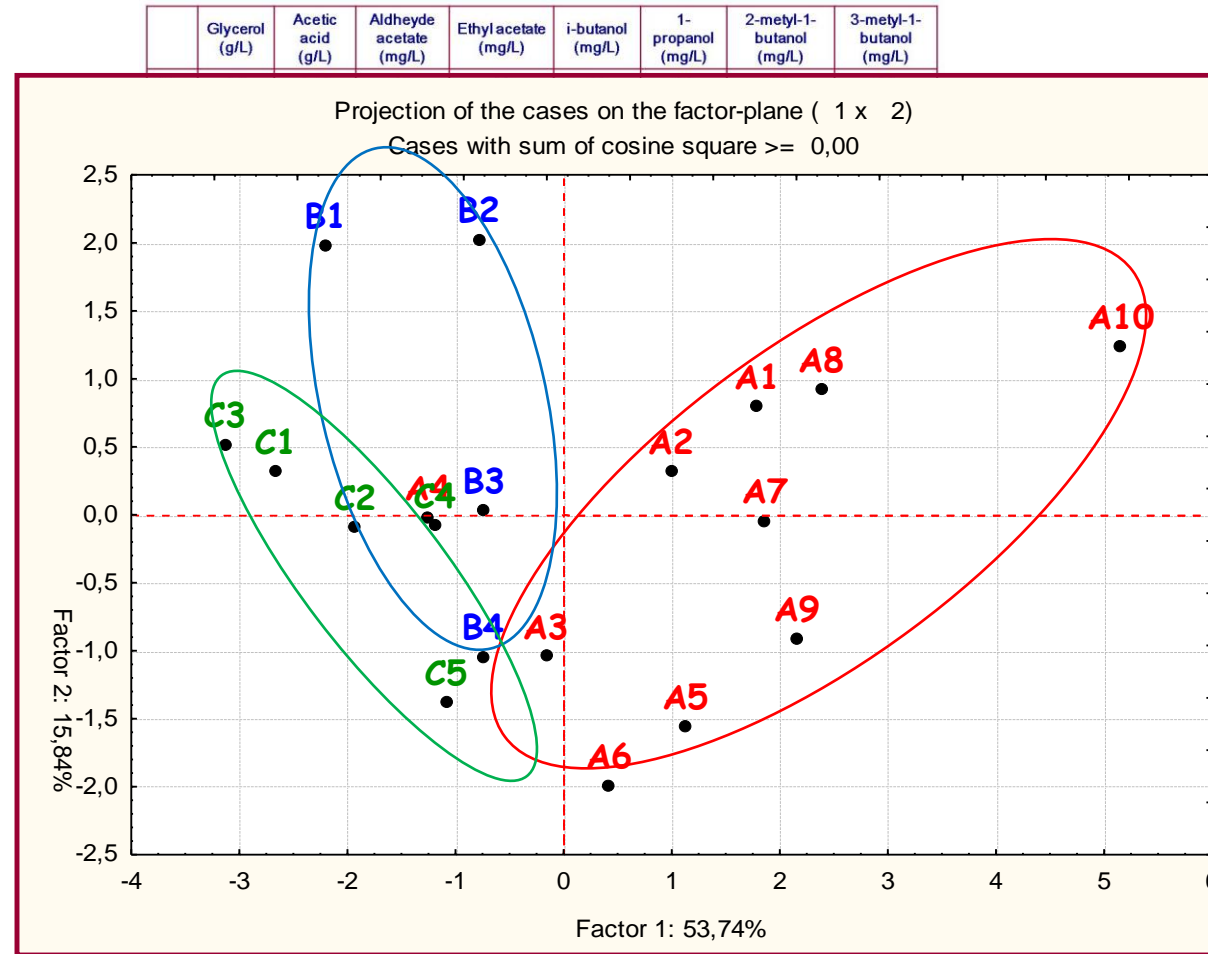
Analisi cluster (UPGMA e coeff. di Dice)



I ceppi di *S. cerevisiae* non si raggruppano in funzione dell'area di produzione né in funzione della varietà dell'uva ma in funzione della cantina da cui sono stati isolati

I ceppi di *S. cerevisiae* isolati dalle cantine sono diversi dai ceppi dai LSA starter

Fermentazioni in laboratorio in mosto sintetico dei ceppi di *S. cerevisiae*



Raggruppamento dei ceppi di *S. cerevisiae* in funzione della cantina da dove sono stati isolati

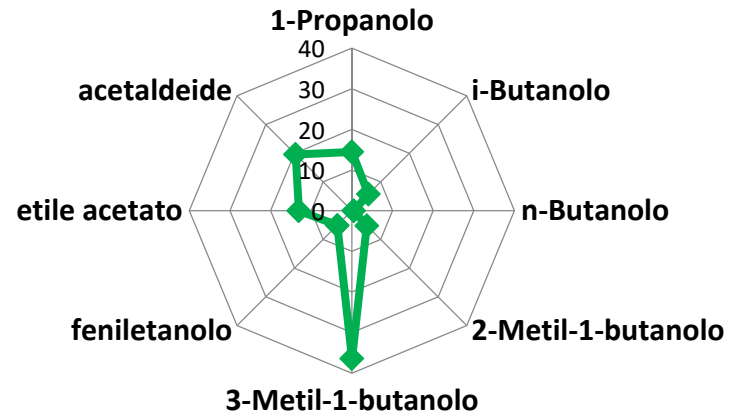
Profili metabolici di vini ottenuti in due cantine mediante fermentazione alcolica condotta da diversi ceppi di *S. cerevisiae* dominanti

Cantina A

S. c. XII = 34 %

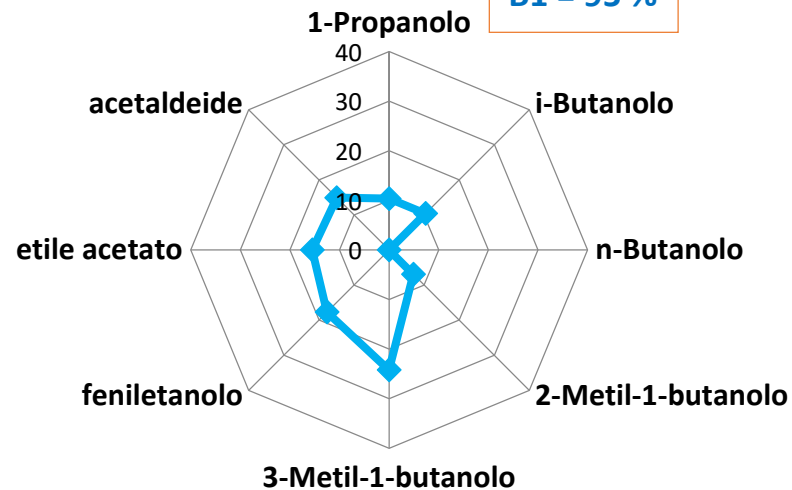
S.c. V = 60 %

Altri S.c. = 6 %



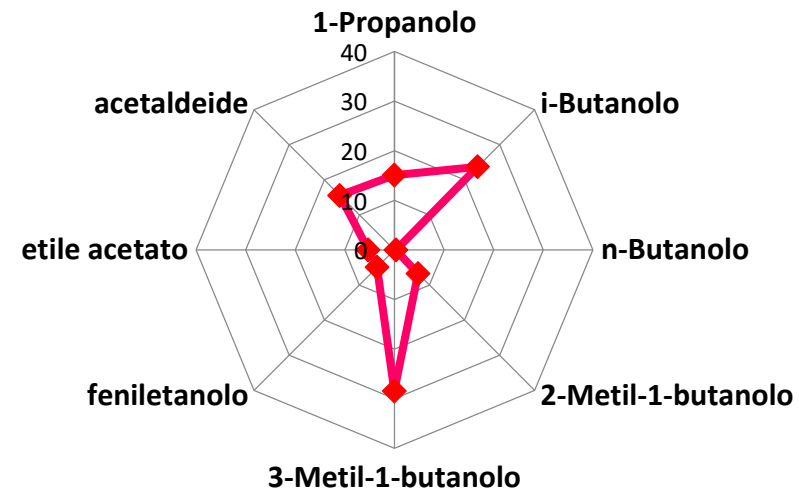
Cantina B

B1 = 95 %



Cantina B

B3 = 80 %



Conclusioni

- ❖ I lieviti sono caratterizzati da una elevata biodiversità metabolica e genetica
- ❖ Ciascuna cantina ha almeno un ceppo dominante (indigeno) di *S. cerevisiae*
- ❖ Non esiste una correlazione tra ceppi di *S. cerevisiae* indigeni e una specifica varietà di uva vinificata
- ❖ Ogni ceppo dominante può conferire al vino una impronta metabolica caratteristica
- ❖ I ceppi indigeni sono diversi dai ceppi starter commerciali
- ❖ I ceppi indigeni di *S. cerevisiae* costituiscono una riserva di biodiversità naturale e, selezionati, possono essere una risorsa per la valorizzazione di vini
- ❖ Soddisfano la crescente richiesta di mercato di vini fortemente legati con il territorio di produzione → lieviti indigeni come elemento di *terroir*

Conclusioni



❖ *Nel concetto di terroir vitivinicolo deve essere incluso un aspetto MICROBIOLOGICO*

Conclusioni

Programma di Selezione dei lieviti autoctoni



1. Nelle specifiche zone di produzione dei vini isolamento di lieviti:
 - da vinificazioni industriali spontanee
 - in cantine che da diversi anni non usano LSA commerciali
 - durante una o più vendemmie
2. Identificazione speciologica dei lieviti
3. Caratterizzazione molecolare a livello di ceppo degli isolati di *Saccharomyces cerevisiae*
4. Caratterizzazione fenotipica degli isolati di *S.cerevisiae* in funzione di caratteri tecnologici e caratteri di qualità mediante microvinificazioni e confronto con lieviti secchi attivi
5. Caratterizzazione chimico-sensoriale dei vini ottenuti dalle vinificazioni pilota
6. Vinificazioni su larga scala e caratterizzazione chimico-sensoriale dei vini

Grazie per l'attenzione

....e grazie ai collaboratori !

