

Utilizzo del lievito *starmarella bacillaris* nella produzione del vino

exploiting of *starmarella bacillaris*  
*yeast* in winemaking process

---

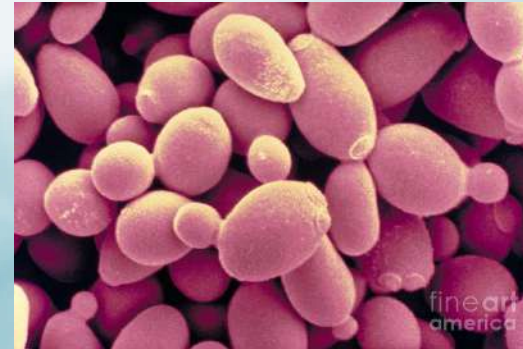
Studente: Antonello Dario Stefania  
Maurizio Ciani

Relatore:

A.A. 2019/20

# FERMENTAZIONE ALCOLICA DEL VINO

- **Processo naturale** che permette la trasformazione del mosto in vino;
- Avviene attraverso una **serie di reazioni chimiche** volte alla trasformazione degli zuccheri dell'uva in prodotti di fermentazione;
- La conversione degli zuccheri è attuata dal **lievito** e dai suoi **processi enzimatici**;



- Lievito più comunemente utilizzato . *S. cerevisiae*.

# Fase aerobia ed anaerobia della fermentazione

## -FASE PRIMARIA (condizione aerobica):

il lievito sfrutta l'ossigeno presente nel mosto convertendo lo zucchero in acqua ed anidride carbonica.

## - FASE SECONDARIA (condizione anaerobica):

il lievito produce energia (ATP) mediante ossidazione degli zuccheri presenti nel mosto, producendo:

	<b>PRODOTTO</b>	<b>% MEDIA</b>
PRODOTTI PRIMARI	Etanolo	50%
	Anidride carbonica	45%
	Glicerolo	3%
PRODOTTI SECONDARI	Acetaldeide	2%
	Acido acetico	
	Acetato d'etile	
	Alcoli polivalenti	

# Sfruttamento lieviti non-*saccharomyces*

- I lieviti *non-Saccharomyces* hanno ruolo sostanziale nelle prime fasi di fermentazione, raggiungendo popolazioni di - cfu/mL;
- Solitamente divengono inattivi con concentrazioni di etanolo tra il 5-10% lasciando spazio alle varietà indigene tolleranti o commerciali (*S. cerevisiae*);
- Il **quantitativo di biomassa** prodotto dai lieviti non-*Saccharomyces* nelle prime fasi di fermentazione è tale da avere un forte impatto sulla qualità del vino;
- Le loro proprietà fermentative portano alla produzione **di vini più ricercati e desiderabili** (maggiore produzione di alcuni composti desiderabili).

# *Starmarella bacillaris* (*candida zemplinina*)

- Lievito **non-*Saccharomyces***;
- Isolato per la prima volta nella Napa Valley (California, USA) nel 2002;
- Inizialmente descritto come *Candida stellata* (2003) è stato rinominato ***Candida zemplinina*** l'anno successivo a causa delle significative differenze riscontrate nell'RNA ribosomiale rispetto a *C. stellata*;
- Studi ecologici hanno evidenziato la presenza di *Starm. bacillaris* in fermentazioni spontanee in diverse località;
- Da subito considerata come **specie potenzialmente importante per l'industria vinicola.**



# Campioni e metodi

- **63 campioni** di *Starm. bacillaris* isolati da quattro varietà di uve italiane:

- Picolit;                      Friuli Venezia Giulia
- Mondeuse;                      "
- Erbaluce;                      Piemonte
- Barbera.

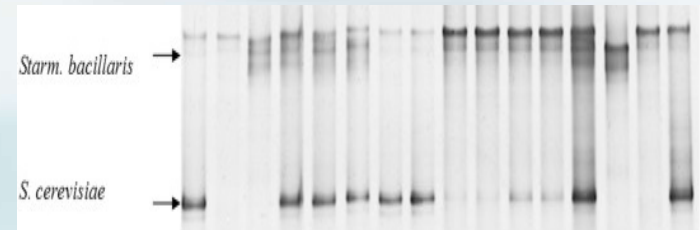


## Caratterizzazione molecolare:

- Sau-PCR (due primer utilizzati, SAG1 e SCA);
- Rep-PCR (primer GTG<sub>5</sub>).

- **Caratterizzazione fisiologica:**

- Resistenza e crescita in presenza di etanolo ed SO<sub>2</sub>;
- Produzione di H<sub>2</sub>S;
- Attività enzimatiche;
- Prove di microfermentazioni.



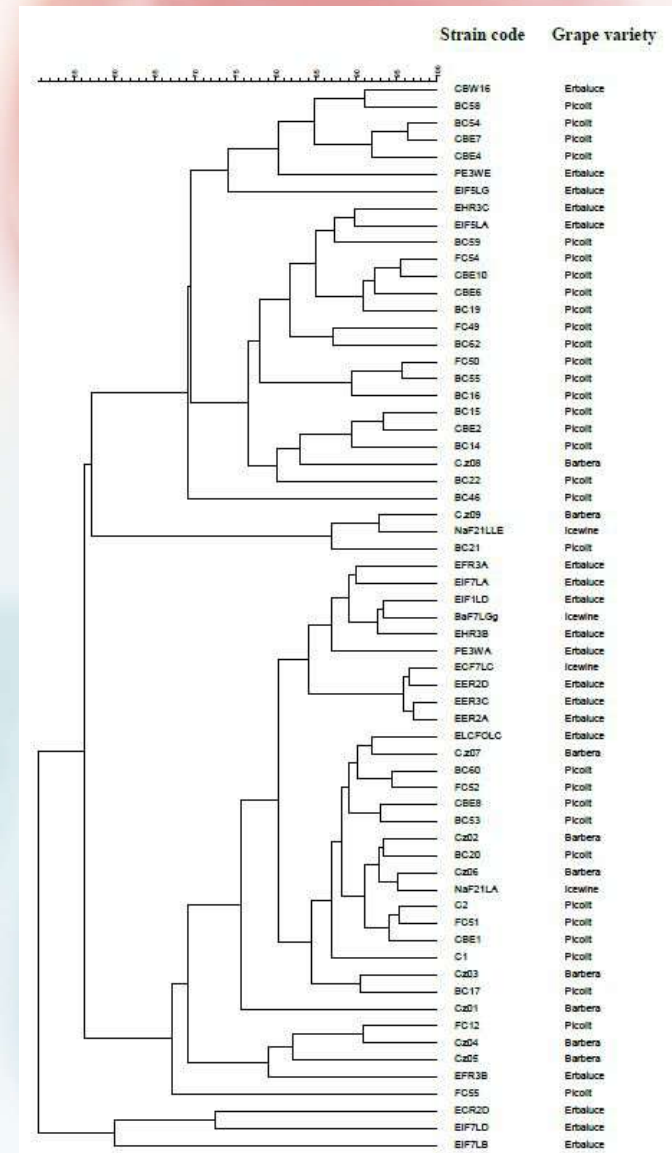
# Caratterizzazione molecolare

- **Sau-PCR:** 200ng di DNA genomico sono stati digeriti con endonucleasi di restrizione (SAU3AI). 1µg del prodotto ottenuto è stato trasferito all'interno di 50µg di soluzione per PCR e avviato a processo. I prodotti della PCR sono stati separati tramite elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. L'impronta dei 63 campioni di *Starm. bacillaris* è stata analizzata con un software di packaging per identificare similarità tra i campioni.
- **Rep-PCR:** 100µg di DNA genomico estratto da colture pure di *Starm. bacillaris* sono stati analizzati tramite questa tecnica. Il protocollo di questa PCR prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 5 min., 31 cicli di amplificazione a 94°C per 3 sec., 92°C per 30 sec., 40°C per un min. ed una estensione finale a 65°C per 8 min. I prodotti della PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi, visualizzati ed analizzati.

# Risultati molecolari

Entrambe le tecniche di PCR hanno rivelato un'impronta dei campioni di *Starm. bacillaris* composta da 20-25 bande. Qualche grado di differenziazione dei profili è stato ottenuto con un coefficiente di similarità del 70% o superiore, distinguendo 6 gruppi e 3 singoli ceppi.

E' stato quindi dimostrato un alto tasso di similarità tra i campioni di *Starm bacillaris* sia comparando gli isolati provenienti da aree geografiche differenti che dalla stessa.





# Caratterizzazione fisiologica

## 1. CRESCITA IN PRESENZA DI ETANOLO O $SO_2$

I test di crescita in etanolo o  $SO_2$  sono stati condotti utilizzando come **mezzo YNB** (Yeast Nitrogen Base) 6,7g/L contenente aminoacidi, a pH 5.5 per l'etanolo e pH 3 per  $SO_2$ . Al mezzo sono state poi aggiunte **quantità differenti di etanolo** per raggiungere concentrazioni di 0, 8, 10, 12 e 14% v/v.

Similmente sono state aggiunte **diverse quantità di  $SO_2$**  per raggiungere concentrazioni di 0, 25, 50, 100 e 150 mg/L.

Le micropiastre sulle quali è stata inoculata una colonia di *Starm. bacillaris* e che hanno raggiunto una concentrazione di cfu/mL sono state incubate a 25°C per 24 ore e la densità ottica (OD) è stata misurata ogni 24 ore per due giorni.

**La crescita cellulare è stata determinata tramite una media (%)** tra la crescita dei campioni in brodo di coltura con e senza etanolo o  $SO_2$  a specifici tempi di incubazione.

Ogni test è stato condotto in triplice copia.

## Risultati crescita IN PRESENZA DI ETANOLO O SO<sub>2</sub>

I risultati di queste prove sono stati analizzati dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore a 25°C.

- **ETANOLO:** il 71% dei campioni sono cresciuti con una concentrazione di etanolo dell'8% (v/v) dopo 24 ore. Prolungando l'incubazione a 48 ore, il 90% dei campioni è cresciuto indipendentemente dalla quantità di etanolo presente.

- **SO<sub>2</sub>:** l'83% dei campioni è riuscito a crescere in presenza di 25mg/L di SO<sub>2</sub>, il 40% invece in presenza di 50mg/L.

Solo pochi campioni (11%) sono riusciti a crescere in presenza di 100-150mg/L di SO<sub>2</sub>, il tutto considerando un' incubazione di 24 ore.

Prolungando il periodo di incubazione a 48 ore, la crescita dei campioni in presenza di 50mg/L di SO<sub>2</sub> è salita a 54%.

E' interessante notare come soltanto il ceppo EER2C è stato capace di crescere alle più alte concentrazioni testate, mentre il ceppo BC16 è totalmente inibito da SO<sub>2</sub>.

## 2. PRODUZIONE H<sub>2</sub>S

La capacità dei campioni di *Starm. bacillaris* di produrre differenti quantità di **acido solfidrico** è stata calcolata utilizzando il mezzo agar BIGGY (Bismuth Glucose Glycine Yeast). Le colonie sono state inoculate ed incubate a 25°C per 48 ore.

Una scala arbitraria da 1 a 5 (colorata da bianco = bassa produzione, a marrone = alta produzione) è stata usata per valutare la produzione di H<sub>2</sub>S.

La determinazione semi-quantitativa di H<sub>2</sub>S ha dimostrato che il 96% dei campioni ne producono una quantità media, mentre soltanto il 4% ne produce bassi livelli.

### **3. Attività enzimatica**

Le analisi riguardanti la presenza di specifiche attività enzimatiche hanno evidenziato la presenza nei 63 campioni di *Starm. bacillaris* di:

- **Attività  $\beta$ -glucosidasi: rinvenuta nel 5% dei campioni (FC12, FC54 e FC55) provenienti da uve Picolit;**
- **Attività proteasica: identificata nel 77% dei campioni;**
- **Attività di idrolasi estera: rinvenuta in sette ceppi;**
- **Attività pectinolitica e glicosidasi: non sono state trovate in alcun campione di *Starm. bacillaris*.**

## 4. Prove di microfermentazione

La composizione chimica dei vini prodotti da colture pure di *Starm. bacillaris* hanno messo in mostra diverse caratteristiche di questo lievito in fermentazione:

- Per quanto riguarda lo **zucchero residuo** sono stati riscontrati valori che vanno da 1 a 140 g/L.  
Soltanto il ceppo Cz03 (Barbera) ha consumato quasi tutto lo zucchero;
- Tutti i campioni, eccezion fatta per il ceppo BC53, hanno consumato tutto il **fruttosio** presente nel mosto. Il ceppo PE3WA (Erbaluce) ha mostrato una chiara preferenza per il fruttosio rispetto al glucosio che non è stato invece consumato;
- Riguardo la produzione di **acido acetico**, pochi campioni hanno dato valori maggiori di 0.5-0.75 g/L, e due varietà hanno mostrato una produzione molto bassa (0.2-0.3 g/L);
- Il **glicerolo** è prodotto a livelli significativi, compresi tra 4.9-10.9 g/L;
- La produzione di **etanolo** è risultata omogenea: 74% dei ceppi ha prodotto 8.0-9.5% di etanolo, mentre il 19% ha prodotto più del 9.5%. Il ceppo Cz03 ha prodotto più del 14% di etanolo (v/v);
- La produzione di **acetaldeide** è risultata medio-bassa, in un range che va da 1.56 a 56.02 mg/L;
- La produzione di **solfiti** è stata minore di 10mg/L per tutti i campioni.

# conclusione

---

Questa è la prima volta in cui una ampia quantità di campioni di *Starm. bacillaris* è stata caratterizzata dal punto di vista fisiologico e molecolare.

I risultati ottenuti, mostrano una possibile e nuova applicazione di questi lieviti per rendere il profilo organolettico del vino più complesso e ricercato, grazie alle attività enzimatiche di questa specie.

L'utilizzo di *Starm. bacillaris* in combinazione con *S. cerevisiae* dovrebbero essere tuttavia approfondite per comprendere le performance e la dominanza di *Starm. bacillaris* nella vinificazione reale.

L'utilizzo di ceppi di *Starm. bacillaris* e *S. cerevisiae* potrebbe essere una tecnica molto utilizzata per il forte impatto sulla riduzione del grado alcolico del vino.

# Riassunto esteso

Negli ultimi anni, vi è stato un incremento di interesse nei confronti di colture di partenza non-*Saccharomyces* per quanto riguarda l'industria vinicola, questo per le loro abilità di migliorare la composizione del vino. Molti studi hanno proposto il potenziale uso di *Starm. bacillaris* per la fermentazione, in combinazione con *S. cerevisiae*. Questa combinazione è stata dimostrata nella fermentazione di vini dolci per ridurre la produzione di acido acetico (fino a 0.3 g/L), mentre l'inoculo sequenziale ha portato alla riduzione fino alla metà di acido acetico prodotto in una fermentazione di *S. cerevisiae* puro. È stata inoltre dimostrata un aumento di glicerolo ed una diminuzione del grado alcolico. Questi risultati supportano l'uso di *Starm. bacillaris*, il quale potrebbe essere un'ottima scelta per raggiungere i risultati desiderati, soprattutto per il carattere fruttifilo di questi lieviti e per la bassa produzione di etanolo rapportata allo zucchero consumato. La caratterizzazione molecolare dei 63 campioni di *Starm. bacillaris* prelevati da uve, mosti e fermentazioni alcoliche di quattro differenti vigneti italiani ha mostrato una particolare omogeneità all'interno di questa specie.

Per quanto riguarda la caratterizzazione fenotipica, sono stati studiati parametri enologici di interesse, per analizzare la presenza di attività enzimatiche e la capacità di crescita con varie concentrazioni di  $\text{SO}_2$  ed etanolo. Le qualità fermentative dei campioni studiati hanno confermato la preferenza di queste specie nel consumo di fruttosio piuttosto che glucosio e la loro rilevante produzione di glicerolo, bassi livelli di acetaldeide, acido acetico ed  $\text{SO}_2$ .