

# Collezione di microrganismi di interesse enologico

Enrico Vaudano  
 Antonella Costantini  
 Francesca Doria  
 Emilia Garcia-Moruno

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Viticoltura ed Enologia - Sede di Asti, via P. Micca, 35.  
 I-14100 Asti. E-mail: antonella.costantini@crea.gov.it

## RIASSUNTO

La collezione di lieviti e batteri di interesse enologico del Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti (CREA-ENO), è stata fondata negli anni '70. Il nome originario era Collezione Nazionale dei Lieviti e Batteri Selezionati Del Vino- Istituto Sperimentale per l'Enologia CNLBSV-ISE. In 40 anni di attività sono stati raccolti più di un migliaio di ceppi di lievito e centinaia di ceppi batterici attraverso l'isolamento da uve, mosti e vini e nuovi ceppi vengono aggiunti continuamente.

Negli anni le tecniche di identificazione e caratterizzazione tassonomica hanno visto notevoli progressi, grazie alle metodologie di analisi basate sul DNA. Tali metodi molecolari permettono di caratterizzare i microrganismi sia a livello di specie che di ceppo e possono essere utilizzati per un ampio spettro di obiettivi che vanno a valutare determinate caratteristiche dei microrganismi presenti in collezione.

Parole chiave:

vino, lieviti, batteri, collezione, variabilità genetica.

## ABSTRACT

*The collection of micro-organisms of oenological interest.*

*The collection of yeasts and bacteria of oenological interest of the Research Center for Enology of Asti (CREA-ENO), was founded in the '70s. The original name was Collezione Nazionale dei Lieviti e Batteri Selezionati Del Vino- Istituto Sperimentale per l'Enologia CNLBSV-ISE. In 40 years of activity more than a thousand strains of yeast and hundreds of bacterial strains isolated from grapes, must and wine have been collected and new strains are constantly being added.*

*Over the years, techniques for the identification and the taxonomic characterization have had significant progresses, due to development of analytical methods based on DNA. These molecular methods allow to characterize the microorganisms both at species level and at strain level and can be used for a broad spectrum of objectives to evaluate specific characteristics of the microorganisms in the collection.*

Key words:

wine, yeasts, bacteria, collection, genetic variability.

## INTRODUZIONE

La composizione e la qualità del vino sono influenzate da innumerevoli variabili intrinseche ed estrinseche, molte delle quali sono mediate da microrganismi. Un ruolo preminente viene svolto dai lieviti, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, che conducono la fermentazione alcolica e dai batteri lattici, che effettuano la fermentazione malolattica.

La necessità di mantenere in vita i microrganismi per studiarli o utilizzarli in tempi successivi ha costituito argomento di interesse già dalla metà dell'Ottocento. Con lo sviluppo delle tecniche di coltivazione in purezza su substrati artificiali si è arrivati a conseguire

l'isolamento dei microrganismi e il loro mantenimento come ceppi individuali. Grazie a questo traguardo iniziarono a sorgere le collezioni di microrganismi.

La collezione di lieviti e batteri isolati di interesse enologico del CREA-Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti (CREA-ENO), ha raccolto, in 40 anni di attività, più di un migliaio di ceppi di lievito e centinaia di ceppi batterici attraverso l'isolamento da uve, mosti, vini e negli ambienti di cantina. Oltre alle specie responsabili delle fermentazioni alcolica e malolattica sono presenti tutte le specie di interesse del settore, comprese quelle considerate come contaminanti, che risultano dannose nel vino a causa della produzione di molecole ad impatto organolettico negativo o

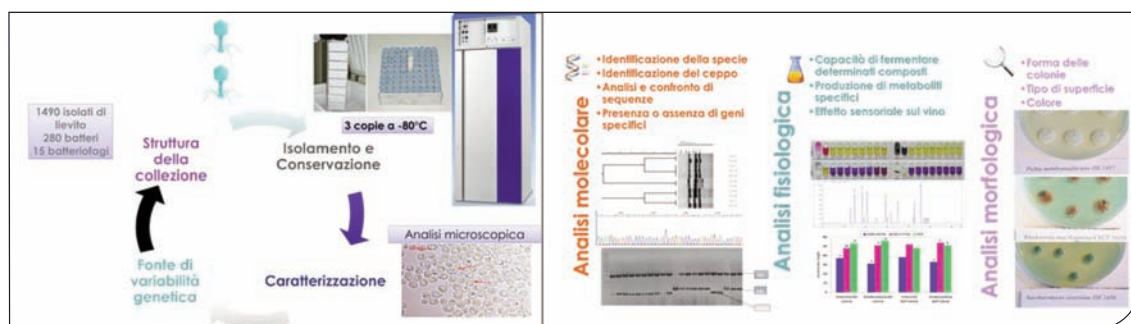


Fig. 1. Rappresentazione grafica del workflow svolto sui microorganismi della collezione CREA-ENO.

addirittura dannoso dal punto di vista salutistico. Mentre le tecniche di isolamento e propagazione non sono pressoché mutate nel corso degli anni, altrettanto non si può dire per le tecniche di identificazione e caratterizzazione tassonomica, che hanno visto notevoli progressi. Attraverso le metodologie di analisi basate sul DNA, oggi è possibile identificare i microrganismi presenti nel vino con un'affidabilità ed una rapidità difficilmente raggiungibili con le tecniche microbiologiche "classiche". Tali metodi molecolari permettono di caratterizzare i microrganismi sia a livello di specie che di ceppo; grazie a questi metodi, la collezione del Centro è in corso di rivalutazione tassonomica al fine di verificare le attribuzioni delle specie effettuate negli anni passati con i "classici" metodi morfologici e fisiologici.

Le metodiche della biologia molecolare possono essere utilizzate per un ampio spettro di obiettivi che vanno a valutare determinate caratteristiche dei microrganismi presenti in collezione, quali la capacità di dominanza di un lievito su altri durante la fermentazione oppure l'individuazione di geni che codificano particolari enzimi, ad esempio quelli responsabili della produzione di ammine biogene.

## LA COLLEZIONE DEL CREA-ENO

La Collezione presente presso il CREA-ENO è stata costituita a partire dagli anni '70 del secolo scorso. Ad oggi la collezione conta 1490 isolati (ceppi conservati come coltura pura) di lieviti e 280 isolati di batteri 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 le principali specie di interesse enologico. Per quanto riguarda i lieviti la maggior parte dei ceppi è rappresentato dal genere *Saccharomyces* nelle sue due principali specie protagoniste della fermentazione alcolica, *S.cerevisiae* e *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. 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, batteri appartenenti al genere *Pediococcus*, responsabili del difetto del vino detto "filante", o ceppi del genere *Lactobacillus* in grado di generare ammine biogene.

La collezione è stata inserita all'interno del progetto nazionale COLMIA (collezioni di microrganismi di interesse agrario, industriale e ambientale) finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali 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. La collezione CRA-COLMIA è inserita con il codice WDCM 945 nella lista delle collezioni "Culture Collections Information Worldwide" [http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col\\_by\\_country/i/39/](http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/i/39/) del World Data Centre for Microorganisms. Recentemente la collezione è stata anche arricchita con 15 batteriofagi isolati da *Oenococcus oeni* (Doria et al., 2013). Il lavoro che si svolge sulla collezione è rappresentato graficamente in figura 1.

## ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CEPPI

La maggior parte delle acquisizioni avviene attraverso l'isolamento da campioni di vino, mosto e uve. I campioni sono piastrati su terreno selettivo: nel caso di

isolamento di specie fungine ed in particolare di lieviti, il terreno, di solito YPGA (Yeast extract, Peptone, Glucose, Agar) o WL, viene addizionato di una sostanza antibatterica come l'ampicillina; per i batteri viene prevalentemente utilizzato l'MRS-agar addizionato con cicloesimide per inibire la crescita di lieviti. Le colonie così cresciute vengono ulteriormente disseminate singolarmente su terreno agarizzato e poi messe in brodo di coltura; le colture pure così ottenute vengono utilizzate per le analisi successive per la caratterizzazione, mentre un'aliquota viene conservata a -80°C in glicerolo. terminate le analisi tassonomiche e giunti alla classificazione specifica, il ceppo può entrare 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.

## IDENTIFICAZIONE CON METODI CLASSICI

L'adozione di metodi appropriati di identificazione microbica è essenziale per gli studi ecologici per quanto riguarda la presenza e l'evoluzione delle specie microbiche durante il processo di vinificazione. Tecniche di identificazione basate su classici saggi morfologici, fisiologici e biochimici (Barnett, 1990; Kurtzman et al., 2011) sono state superate negli ultimi due decenni dalle analisi molecolari. Le principali critiche ai metodi tradizionali riguardano sia il tempo necessario per ottenere risultati e la loro affidabilità e riproducibilità. Infatti, le valutazioni fenotipiche basate sulle caratteristiche morfologiche e biochimiche sono influenzate dallo stato fisiologico delle cellule. Tuttavia, alcuni metodi classici sono ancora utilizzati, permettendo una rapida determinazione del numero totale dei microrganismi nel mosto e nel vino e una identificazione di alcuni di essi.

L'osservazione microscopica di una coltura pura può essere utile per l'identificazione di alcuni generi con caratteristiche microscopiche particolari che si discostano dalla classica forma ovoidale o ellissoidale che caratterizza buona parte dei lieviti enologici. Per esempio i generi *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* (*Saccharomyces ludwigii*) possono essere facilmente identificati dalla caratteristica morfologia a forma di limone.

I saggi biochimici forniscono un maggior numero di informazioni rispetto ai saggi morfologici, consentendo quindi una più facile identificazione. Misurano la capacità di utilizzare diverse fonti di carbonio e la capacità di condurre determinate reazioni enzimatiche (ossidasi, catalasi). Ci sono kit specifici per questo tipo di analisi: per i lieviti si usano gli API32 (BioMerieux) e per i batteri gli API50 CHL.

Informazioni sulle caratteristiche morfologiche e fisiologiche e sull'evoluzione delle informazioni tassonomiche e sistematiche relative ai lieviti e ai batteri

sono riportate nelle edizioni: *The Yeast* (Kurtzman et al., 2011) e *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vos et al., 2009).

## IDENTIFICAZIONE CON METODI MOLECOLARI

Negli ultimi due decenni, le tecniche basate sul DNA hanno rivoluzionato lo studio dei microrganismi e nuovi metodi sono continuamente in fase di sviluppo. Vari studi hanno descritto metodi molecolari per l'identificazione di lieviti e batteri sia per la caratterizzazione interspecifica che intraspecifica (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Giraffa et al., 2000; Vaudano & Garcia-Moruno, 2008; Ivey & Phister, 2011).

Generalmente, i metodi molecolari possono essere divisi in coltura dipendenti e coltura indipendenti. Nel primo caso è necessario coltivare i microrganismi su terreni di coltura; l'analisi molecolare viene eseguita su DNA estratto da colonie cresciute su tali piastre. I vantaggi di questo approccio sono una determinazione accurata a livello di specie e talvolta una caratterizzazione intraspecifica, mentre gli svantaggi sono il tempo necessario per la crescita e l'incapacità di rilevare le cellule vitali ma non coltivabili (Millet & Lonvaud Funel, 2000).

Con i metodi diretti, l'analisi molecolare viene effettuata direttamente sul campione (mosto o vino) senza precedente piastratura, con un vantaggio in termini di tempo e di rilevamento di specie non coltivabili. Le tecniche più utilizzate sono la PCR e PCR quantitativa (qPCR) e la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Lopez et al., 2003; Martorell et al., 2005; Hierro et al., 2006). La PCR e la qPCR si avvalgono di primers specifici per individuare determinate specie; con la qPCR è possibile anche quantificare il numero di cellule presenti nel campione in studio.

La DGGE è una tecnica impiegata per determinare la presenza e l'abbondanza relativa delle differenti specie e per ottenere un profilo sia qualitativo (presenza/assenza di bande) che semi-quantitativo (intensità delle bande) delle comunità microbiche oggetto di studio.

## GESTIONE DEI DATI

La necessità di raccogliere tutte le informazioni relative a migliaia di ceppi presenti nella collezione, dai dati di raccolta dei campioni ai risultati delle analisi fenotipiche e genetiche, presuppone l'utilizzo di software specifici di gestione di questi grandi "database". Il software di elaborazione utilizzato presso il Centro è Bionumerics (Applied Maths) e permette non solo la raccolta delle informazioni di diverso tipo, dai profili elettroforetici, alle sequenze di DNA ai dati fenotipici, ma anche il confronto tra isolati con diverse tecniche di comparazione. Queste possono essere fatte utilizzando i dati di una sola tecnica analitica

oppure attraverso la combinazione dei dati provenienti da diverse analisi anche molto diverse tra loro.

## SUPPORTO ALLE AZIENDE

L'analisi genetica permette di giungere rapidamente all'identificazione a livello di specie di lieviti e batteri sia durante il processo di vinificazione sia in presenza di intorbidamenti post-imbottigliamento. Anche qui la differenza nelle tempistiche rispetto alle analisi classiche è rilevante ma è soprattutto l'affidabilità dei risultati a fare la differenza. Le analisi effettuate sulle diverse specie microbiche della collezione hanno permesso di costituire un database che viene utilizzato come riferimento per l'identificazione di specie appena isolate. Il CREA-ENO offre un'attività di consulenza per le aziende che possono disporre del know-how per diversi scopi: identificazione di contaminanti microbici, valutazione della dominanza di un ceppo inoculato, isolamento e caratterizzazione di ceppi autoctoni, supporto per la gestione delle fermentazioni.

## CONCLUSIONI

Le collezioni di microrganismi consentono di disporre di fonti di variabilità genetica di sicura caratterizzazione in quanto preventivamente identificate e studiate a livello morfo-funzionale. Pertanto, i microrganismi di queste collezioni possono fornire materiale biologicamente attivo, fenotipicamente e/o genotipicamente caratterizzato, sul quale fondare le attività di ricerca in termini produttivi, comparativi e cognitivi.

## BIBLIOGRAFIA

BARNETT J.A., PAYNE R.W., YARROW D., 1990. *Yeast: Characteristics and Identification*, 2nd ed. Cambridge University Press, London, UK.

DORIA F., NAPOLI C., COSTANTINI A., BERTA G., SAIZ JC., GARCIA-MORUNO E., 2013. Development of a new method for detection and identification of *Oenococcus oeni* bacteriophages based on endolysin gene sequence and randomly amplified polymorphic DNA. *Appl Environ Microbiol*, 79: 4799-805.

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: 329-37.

GIRAFFA G., NEVIANI E., 2000. Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. *Ital. J. Food Sci.*, 12: 403-423.

HIERRO N., ESTEVE-ZARZOSO B., GONZÁLEZ A., MAS A., GUILLAMÓN JM., 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7148-55.

IVEY M.L., PHISTER, T.G., 2011. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 1619-1634.

LOPEZ I., RUIZ -LARREA F., COCOLIN L., ORR E., PHISTER T., MARSHALL M., VANDER GHEYNST J., MILLS D.A., 2003. Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6801-6807.

KURTZMAN, C., FELL, J.W., BOEKHOUT, T. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, Burlington, MA, USA.

MARTORELL P., QUEROL A., FERNANDEZ-ESPINAR M.T., 2005. Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 6823-6830.

MILLET V., LONVAUD-FUNEL A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett Appl Microbiol*, 30: 136-41.

VAUDANO E., GARCIA-MORUNO E., 2008. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiol*, 25: 56-64.

VOS P., GARRITY G., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K.-H., WHITMAN W., 2009. *The Bergey's Manual*. Whitman Eds. Springer.