

ISTITUTO STATALE D'ISTRUZIONE SUPERIORE

"PAOLINO D'AQUILEIA"

ANNO SCOLASTICO 2016/2017

CLASSE 6[^]E

**TESI DI SPECIALIZZAZIONE DEL CORSO DI VITICOLTURA
ED ENOLOGIA**

DI MARTHA BULIAN

LIEVIAMO CON LA GENETICA

Sommario

≈	STORIA DEI LIEVITI	3
	LOUIS PASTEUR E I SUOI ESPERIMENTI	4
≈	SACCHAROMYCES CEREVISIAE	5
	GENOMA DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE	5
≈	I LIEVITI SELEZIONATI	6
	CARATTERI RICERCATI NELLA SELEZIONE	6
	Caratteri tecnologici.....	8
	<i>Potere fermentativo o alcool tolleranza:</i>	8
	<i>Vigore fermentativo:</i>	8
	<i>Resistenza all'anidride solforosa:</i>	8
	<i>Modalità di sviluppo:</i>	9
	<i>Capacità schiumogena:</i>	10
	<i>Carattere Flor:</i>	10
	<i>Carattere Killer:</i>	11
	<i>Ceppi Non Producenti Idrogeno Solforato (H₂S-):</i>	11
	<i>Ceppi Autolisogeni:</i>	12
	SVILUPPO E CICLO DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	12
≈	METODI DI SELEZIONE	13
	SELEZIONE CLONALE	14
	IBRIDAZIONE	16
	Ibridi Interspecifici.....	18
	L'ibridazione secondo Anchor yeast.....	19
	<i>Lieviti Ibridi (Saccharomyces cerevisiae X Saccharomyces uvarum) Nella produzione Dell'amarone Della Valpolicella</i>	19
	INGEGNERIA GENETICA	21
	La Fusione Degli Sferoplasti	22
	DNA RICOMBINANTE E PCR	23
	Miscele Di Ceppi	26
	Breeding Assistito Da Marcatori Molecolari.....	27

≈ STORIA DEI LIEVITI ≈

Da sempre il vino è stato prodotto ignorando l'esistenza dei lieviti, responsabili della trasformazione dello zucchero in alcool durante la fermentazione alcolica. Sono anche detti saccaromiceti, o "funghi dello zucchero", e diventano oggetto di studio solo nell'Ottocento quando scienziati e enologi iniziano le prime sperimentazioni sui lieviti.

Antoine Lavoisier (1743-1794) e Joseph Louis Gay-Lussac (1778-1850) furono i primi chimici e scienziati che lavorarono sull'argomento e riuscirono a dimostrare rispettivamente che lo zucchero presente nel mosto d'uva era trasformato in alcool e anidride carbonica e il rapporto matematico che regolava questa trasformazione. Dobbiamo attendere Louis Pasteur, nel 1854, per comprendere esattamente cosa fosse la fermentazione e come avveniva. Pasteur dimostrò tramite esperimenti l'azione dei microrganismi presenti nel mosto.

"Il gusto e le qualità del vino dipendono certamente, per una gran parte, dalla natura specifica dei lieviti che si sviluppano durante la fermentazione del mosto"

disse Pasteur ai suoi tempi, anticipando di molto le nostre certezze.

Nel 1884, il danese Hansen, introdusse nell'industria birraria la pratica della fermentazione in purezza, impiegando le colture pure di saccaromiceti che, in laboratorio, avevano fornito le migliori prestazioni.

Le ricerche proseguono fino agli studi di Müller-Thurgau (1850-1927) sulle diversità enologiche tra lieviti apiculati ed ellittici; si iniziò a parlare di lieviti selezionati a partire dal XIX secolo. In Italia dobbiamo aspettare il 1889 per avere le prime sperimentazioni con lieviti purificati e selezionati ad opera di Ravizza e Zecchini, della Stazione Enologica di Asti. Nel 1894 viene costituita a Geisenheim una Stazione per la produzione di lieviti selezionati da impiegare in vinificazione. Nel 1900 escono le prime guide/memorie relative all'utilizzo dei lieviti selezionati. Le prime e forse anche le più importanti sono quella pubblicata in Francia da Jacquemin, "Guida all'uso dei lieviti selezionati per la fermentazione dei vini" e la memoria presentata da Passerini su "I Fermenti selezionati applicati al governo dei vini". Agli inizi del 1900 ha inizio una lunghissima serie di selezioni, massali e clonali, a partire da uve, mosti a vari stadi di fermentazione, vini e superfici di cantina, volte ad individuare i ceppi più adatti alla produzione del vino desiderato ed alle condizioni ambientali in cui avviene la vinificazione.

Il lievito che noi conosciamo come *Saccharomyces cerevisiae* non ha utilizzo solo in enologia ma è il tipico lievito da birra e pane, e le sue caratteristiche sono importanti non solo per la produzione di generi alimentari ma anche come, in quanto "organismo modello" per biologi che studiano genetica e biologia molecolare (in particolare ciclo cellulare), data la sua facilità di crescerlo in coltura, (e come eucariota ha una struttura cellulare complessa). Ad esempio, le grandi scoperte fatte da Yoshinori Ohsumi nel campo dell'autofagia cellulare¹ che gli sono valse il premio Nobel nel 2016 hanno alla base degli esperimenti condotti su tale lievito. Quello di *Saccharomyces cerevisiae* è stato il primo genoma di un eucariota a essere sequenziato completamente. Il database del genoma dei lieviti è uno strumento molto importante per sviluppare la conoscenza del funzionamento e della organizzazione della genetica e della fisiologia delle cellule eucariote.

LOUIS PASTEUR E I SUOI ESPERIMENTI

Louis Pasteur nato a Dole nel 1822 e morto a Marnes-la-Coquette nel 1895 fu sempre molto legato alla sua nazione. E fu proprio uno spirito patriottico che lo incoraggiò a fare i primi esperimenti sulla fermentazione della birra. Voleva che la birra francese eguagliasse se non superasse quella tedesca. Il problema era legato alla mancanza di possibilità di conservazione della birra a causa dell'elevato contenuto in zuccheri che la espongono a molte alterazioni. Notò che la fermentazione, operata appunto da "fermenti organizzati", cominciava quando si raggiungevano i 20°C circa e che questi si trovavano già nell'ambiente dove si produceva la bevanda. Così Pasteur, riconoscendo che le cause dell'alterazione della birra erano le stesse del vino pensò che il calore fosse la miglior soluzione alla conservazione. Ma la birra conteneva molto acido carbonico e si pensava che scaldando la bevanda si andasse a perdere tutto l'acido carbonico.

Così provò con un riscaldamento a 50-55°C che non tolse tutto l'acido carbonico ed inoltre non portò a termine la fermentazione. Ancora oggi questa tecnica porta il suo nome, conosciuta come Pastorizzazione, utilizzata ancora per la "birra pastorizzata".

¹ L'autofagia cellulare o autofagocitosi è un meccanismo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati. L'autofagia permette la degradazione e il riciclo dei componenti cellulari. Durante questo processo i costituenti citoplasmatici danneggiati sono isolati dal resto della cellula all'interno di una vescicola a doppia membrana nota come autofagosoma. La membrana dell'autofagosoma fonde poi con quella di un lisosoma ed il contenuto viene degradato e riciclato.

La stessa operazione svolse anche sul vino ottenendo ottimi risultati. Attraverso le sue ricerche scopre che la fermentazione che trasformava lo zucchero in alcol, ritenuta fino ad allora il risultato di una trasformazione chimica, in realtà è opera di microrganismi

(i "fermenti organizzati" per la birra) responsabili di questo processo.

Per dimostrare la presenza di questi microrganismi mise a punto un esperimento che richiedeva la preparazione di un matraccino contenente acqua, zucchero e lievito di birra. Portò il contenuto del matraccino ad ebollizione e poi lasciò entrare aria. Calcinò il tutto e mise in stufa a 30°C. Il liquido risultò sterile. Per dimostrare che i germi erano nell'aria, Pasteur volle fare un secondo esperimento. Filtrò l'aria atmosferica con un batuffolo di cotone posto su un tubo collegato ad un aspiratore. Con il microscopio si accertò che sul batuffolo fossero presenti corpuscoli che potevano essere definiti organismi, e quindi introdusse in un contenitore il batuffolo di cotone e il liquido ritenuto sterile del precedente esperimento. Tutte queste operazioni in mancanza di aria. Con quest'ultimo esperimento riuscì a rilevare il moltiplicarsi dei microrganismi.

≈ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ≈

GENOMA DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Le dimensioni del genoma di *S. cerevisiae* sono circa 3 volte più grandi di quello di un batterio, ma 260 volte più piccole di quelle dell'uomo. È costituito da circa 6300 geni distribuiti tra i 16 cromosomi lineari. Ci sono 5885 geni che codificano per proteine, circa 140 geni che codificano per l'rRNA e 275 per il tRNA. Il nucleo di *S. cerevisiae* contiene 35-55 copie di retrotrasposoni, elementi mobili in grado di spostarsi da un cromosoma all'altro o lungo lo stesso cromosoma (→estrema variabilità). È presente anche un plasmide detto 2 μ m²e poiché rappresenta il 5% del genoma totale del lievito nel suo citoplasma ce ne sono circa 50 copie. Altri elementi genetici extra-cromosomiali che possono essere

² Il plasmide endogeno 2 μ m di *Saccharomyces cerevisiae* è stato ampiamente utilizzato per la costruzione di lievito clonaggio ed espressione plasmidici perché è un plasmide di lievito nativo che è atto ad essere mantenuto stabilmente in cellule in alto numero di copie. Quasi sempre, questi costrutti plasmidici, contenenti alcuni o tutte le sequenze 2-micron, mostra copia livelli numerici inferiori a 2 micron e sono mantenuti stabilmente solo in condizioni selettive. Ci interessava determinare se ci fosse un mezzo con cui 2 μ m potrebbe essere utilizzato per la costruzione vettore, senza rinunciare né numero di copia o la stabilità non selettivi. Abbiamo identificato siti del plasmide 2 micron che potrebbero essere utilizzati per l'inserimento di sequenze genetiche senza interrompere elementi di codifica 2-micron e quindi valutato successive costrutti plasmidici per la stabilità e di copia *in vivo*.

presenti nel citoplasma sono i prioni³. Il DNA mitocondriale è fra i più grandi rispetto a tutti gli altri organismi ed è presente in copie multiple nel mitocondrio (tipicizzazione del lievito).

≈ I LIEVITI SELEZIONATI ≈

È importante tenere presente che i lieviti naturali o indigeni sono strettamente legati al vitigno, all'ambiente pedoclimatico, alle tecniche di gestione del vigneto oltre che dal tipo di vinificazione.

I lieviti sono molto diffusi in natura e li ritroviamo nel suolo, sulla superficie dei vegetali, nel tubo digerente degli animali. La loro diffusione è realizzata dal vento (anemofila) e dagli insetti (entomofila). Sull'uva si trovano raramente sulla pruina, ma preferiscono zone situate intorno agli stomi. Le specie predominanti sui grappoli sono la *Kloeckera*, la *Hanseniaspora* e in percentuali minori la *Candida*, *Brettanomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Hansenula*. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è presente sull'uva all'incirca all'1%. Per questa ragione viene definito un lievito indigeno e non autoctono. La fermentazione spontanea inizia con l'azione dei lieviti apiculati, per poi proseguire con una graduale selezione naturale dei lieviti più resistenti ad alte concentrazioni di alcool. In un secondo momento appaiono le cellule di forma ovale, ellittica o allungate.

CARATTERI RICERCATI NELLA SELEZIONE

Descrivo di seguito i più importanti caratteri tecnologici; inoltre gli ultimi due sono caratteri di qualità.

Le selezioni sono eseguite in funzione di caratteri enologici ben precisi i quali possono essere suddivise in due categorie:

- ↳ Caratteri tecnologici: sono quelli che influiscono sull'andamento della fermentazione
- ↳ Caratteri di qualità: sono quelli che influiscono positivamente o negativamente sulla qualità dei vini

³ Proteina alterata derivata da proteine normali prodotte dalle cellule, responsabile di gravissime malattie neurodegenerative dall'esito spesso mortale in alcuni animali e nell'uomo; i prioni sono l'unico caso di agente patogeno infettivo privo di materiale genetico.

Caratteri tecnologici di *S. cerevisiae*

- ◇ Potere fermentativo o alcol tolleranza
- ◇ Vigore fermentativo
- ◇ Resistenza all'anidride solforosa
- ◇ Tipo di sviluppo dei mezzi liquidi:
 - A cellule disperse (polverulento)
 - A catene di cellule
 - Flocculento
- ◇ Schiumogeno
- ◇ Flor
- ◇ Sviluppo a basse temperature
- ◇ Sviluppo ad alte temperature
- ◇ Carattere killer

Caratteri di qualità di *S. cerevisiae*

- ◇ **Produzione di composti secondari:**
 - Glicerolo
 - Acido succinico
 - Acido acetico
 - Aldeide acetica
 - N-propanolo
 - Isobutanolo
 - Alcol amilico attivo
 - Alcol isoamilico
 - B-feniletanolo
- ◇ **Produzione di composti solforati:**
 - Idrogeno solforato
 - Anidride solforosa
 - Azione sull'acido malico
- ◇ **Attività enzimatiche:**
 - Attività β -glucosidasica
 - Attività estera sica
 - Attività proteolitica

- Capacità autolitica

Caratteri tecnologici

Potere fermentativo o alcool tolleranza: esprime la quantità massima di etanolo che un lievito può formare per fermentazione di un mezzo contenente zuccheri in eccesso. L'inibizione dello sviluppo e l'arresto di fermentazione sono una conseguenza dell'accumulo di etanolo all'interno delle cellule. La resistenza all'alcol è pertanto da mettere in relazione con la composizione della membrana cellulare e in particolare con la presenza di steroli e di acido oleico: il contenuto totale sterolico è carattere individuale di ceppo.

Il carattere può essere determinato impiegando 100 mL di mosto d'uva arricchito di glucosio fino al 30%, in beuta chiusa con una trappola all'acido solfidrico che trattiene l'umidità. Durante la fermentazione si forma anidride carbonica che provoca un calo del peso in tutto il sistema. L'andamento della fermentazione può essere seguito con pesate quotidiane fino al momento in cui il peso rimane costante.

Vigore fermentativo: esprime la prontezza con cui un ceppo dà inizio alla fermentazione e la rapidità con cui la porta a termine. Carattere stabile nel tempo, ma non dipendendo da precisi biochimismi non è possibile il suo controllo genetico nella discendenza, gli ibridi possono essere molto diversi dai genitori.

Uno dei metodi per la determinazione di questo parametro consiste nell'esprimere il carattere in termini di grammi di CO₂ svolta in 48 ore da 100 mL di mosto inoculati con 5 ml di precoltura di 2 giorni.

Resistenza all'anidride solforosa: l'anidride solforosa è un antisettico che si combina facilmente con i costituenti dei mosti. L'acido solforoso si trova in differenti combinazioni ma solo la frazione libera ed indissociata è quella attiva sulle cellule. La sua azione poi è tanto più forte tanto più è basso il pH. Poiché la solforosa ha alta reattività con numerosi composti, altrettanto complessa è la sua azione verso i lieviti. Secondo alcuni studi, la resistenza verso il composto è da attribuire principalmente alla membrana cellulare. In tal caso il carattere si presenta stabile ed ereditario. Secondo altri, la resistenza sarebbe da attribuire alla capacità da parte del lievito di produrre glutatione ossidata (tripeptide:

cisteina, glutamato, glicina) che legandosi alla solforosa ne annulla l'effetto. La quantità di glutatione prodotta è carattere di ceppo I diversi meccanismi sono quindi responsabili di risposte diverse che si concretizzano con stabilità o instabilità di questo carattere.

Modalità di sviluppo: lo sviluppo delle cellule di *S. cerevisiae* può avvenire con differenti modalità e ciò influisce molto dal punto di vista enologico.

A cellule disperse (polverulento): quando le cellule figlie si distaccano dalle cellule madri, si disperdono nel mezzo provocando torbidità di tipo polverulento. Le cellule lentamente si depositano sul fondo e se subiscono agitazione si disperdono nuovamente.

A catene di cellule: le cellule figlie a gemmazione terminata non si distaccano dalle madri e rimangono unite. Se il mezzo è fermo (non agitato) sul fondo dei recipienti si forma un velo che, in seguito ad agitazione, si può distaccare senza frammentarsi.

Flocculazione: la flocculazione è un fenomeno reversibile, asessuale e dipendente dal calcio nel quale le cellule di lievito dello stesso ceppo hanno la capacità di aggregarsi, formando "fiocchi" di cellule. Le cellule che formano fiocchi sono chiamate flocculanti, mentre le cellule che non ne sono capaci sono note come polverulente o a sviluppo disperso. Nel settore della spumantizzazione questo carattere è importantissimo perché facilita la rimozione del deposito nel caso della rifermentazione in bottiglia. La flocculazione delle cellule del lievito è una caratteristica della parete cellulare che coinvolge alcune proteine dette flocculine che sporgono dalla parete delle cellule flocculanti e si legano al mannosio della parete cellulare delle cellule adiacenti. Gli ioni calcio sono necessari per attivare le flocculine. La flocculazione è inibita reversibilmente dalla presenza di zuccheri, Sali, bassi valori di pH e sensibilità alle proteasi.

Determinazione della capacità di flocculazione: la capacità di flocculazione può essere rilevata osservando il comportamento del deposito al termine dello sviluppo in un mezzo liquido: per agitazione le cellule non si distaccano e si mantengono aggregate, si sollevano e poi ricadono sul fondo senza dar luogo a torbidità. Il carattere è rilevabile anche prendendo in esame colture striscio: se si preleva una parte della patina con una punta di filo, si nota che questa non ha consistenza cremosa, come invece è nei ceppi non flocculenti, ma è più dura e rilascia aggregati di cellule.

I geni che codificano per le lectine⁴ della flocculazione sono chiamati geni FLO. I diversi geni possiedono diverse caratteristiche e determinano un differente grado di flocculazione. Il gene più noto per la flocculazione è FLO1, un gene dominante situato sul cromosoma I.

Capacità schiumogena: il potere schiumogeno è un carattere che si può manifestare nei ceppi polverulenti o flocculenti ed è legato alla idrofobicità delle cellule. Le cellule sono attratte dai gas e durante la fermentazione tendono ad aderire alle bollicine di CO₂. Giunte in superficie, rimangono sospese nella parte liquida della schiuma che assume colore grigio-bruno le bollicine danno origine ad una schiuma persistente molto alta. Il carattere è stabile ed è molto negativo nel caso della fermentazione dei mosti perché costringe a non utilizzare le vasche in tutta la loro capacità. Invece risulta positivo nel caso dei rifermentazione in autoclave perché le cellule tendono a rimanere in sospensione. Il carattere è stabile ed ereditario, unigenico, probabilmente dominante dato che si presenta negli ibridi anche se in forma attenuata.

Determinazione della capacità schiumogena: si procede alla determinazione dell'energia di fermentazione su un campione in una beuta, se sulla superficie del liquido si forma una schiuma alta circa 2 cm, di colore bruno, e sporca le pareti della beuta, il carattere è presente.

Carattere Flor: alcuni ceppi di *S. cerevisiae* hanno cellule di tipo polverulento che manifestando la tendenza al galleggiamento si portano in superficie. Qui, a contatto con l'aria, il lievito sfrutta la sua capacità di fermentare e poi di respirare, cominciando a sviluppare un metabolismo di tipo ossidativo utilizzando l'etanolo. Il vino, a questo punto dell'affinamento, essendo povero in zuccheri fermentiscibili, utilizza l'etanolo e altri prodotti della fermentazione per sopravvivere. Il metabolismo dei lieviti, che presentano questo carattere, è diviso in due fasi: la fase pelagica, in cui la prolina è la principale fonte di azoto, e la fase flor. Nella fase flor la riduzione di nutrienti, l'elevato grado alcolico, il basso pH, la bassa concentrazione di ossigeno e la presenza di solfiti, obbliga i lieviti flor di passare da un metabolismo fermentativo a uno ossidativo. I vini mostrano dei cosiddetti "marcatori dell'affinamento" che sono valori di acetaldeide, acidità volatile e glicerolo, simili a quelli ottenuti con un vino affinato per anni. Il prodotto assume caratteristiche sensoriali particolari e gradevoli. I lieviti flor sono utilizzati per la produzione

⁴ Proteine Flo della parete cellulare (dette anche flocculine) implicate nella flocculazione.

di alcuni vini speciali fra i quali vanno ricordati lo Sherry nella zona di Jerez in Spagna e in Sardegna con la Vernaccia di Oristano. I lieviti flor risalgono in superficie a causa della diminuzione del peso specifico e l'aumento dell'idrofobicità di superficie, causati a loro volta dal maggiore contenuto di lipidi delle cellule in fase flor. In oltre un ruolo aggregante e di trasporto verso l'alto lo detiene la CO₂. Questi ceppi che presentano il carattere flor, spesso sono aneuploidi per diversi cromosomi.

Comportamento verso la temperatura: partendo dal fatto che le temperature enologiche non vanno mai al di sotto dei 12°C o al di sopra dei 40°C. *S. cerevisiae* è tipicamente mesofilo: cioè ha una temperatura ottimale di sviluppo di 30-33°C con una massima di 37°C.

Carattere Killer: in *S. cerevisiae* ci sono dei ceppi che hanno la capacità di inibire lo sviluppo di ceppi della medesima specie uccidendone le cellule grazie a una proteina che possiede questa capacità inibitrice. Sono definiti "killer" sia i ceppi che possiedono questa caratteristica che la proteina stessa. Si individuano tre gruppi di ceppi:

Ceppi Killer O Kr: sintetizzano la proteina killer e sono resistenti alla sua azione;

Ceppi Neutri O Kr: non sintetizzano la proteina killer ma sono resistenti alla sua azione;

Ceppi Sensibili O Ks: non sintetizzano la proteina e sono sensibili alla sua azione.

La proteina killer ha la sua maggiore attività a valori di pH di 4.6/4.8. Ai pH dei mosti essa è completamente inattiva.

Una tecnica per il trasferimento del solo carattere killer è la **citoduzione**. Questa tecnica consente di incrociare un ceppo vinario con un mutante detto "karl", incapace di produrre la fusione del nucleo, ottenendo il trasferimento del solo materiale citoplasmatico, plasmidi e mitocondri, dal mutante al vinario. Grazie a questa tecnica è stato possibile creare un lievito con grande capacità fermentativa.

Ceppi Non Producenti Idrogeno Solforato (H₂S-): l'incapacità di produrre idrogeno solforato per ridotta attività della solfito riduttasi ha dirette conseguenze sull'accumulo di altri composti come l'anidride solforosa e l'n-propanolo. I ceppi H₂S- formano elevate quantità di aldeide acetica come conseguenza della produzione di alte quantità di anidride solforosa.

Cepi Autolisogeni: la capacità di autolisare bene anche a basse temperature (fino a 6°C) determina una scarsa vitalità delle cellule. L'autolisogenia è sempre accompagnata alla produzione di isobutanolo sia in mezzo sintetico che in mosto. Il carattere ha interesse nella spumantizzazione in bottiglia in quanto l'autolisi contribuisce al conferimento della migliore qualità a questi vini.

SVILUPPO E CICLO DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE

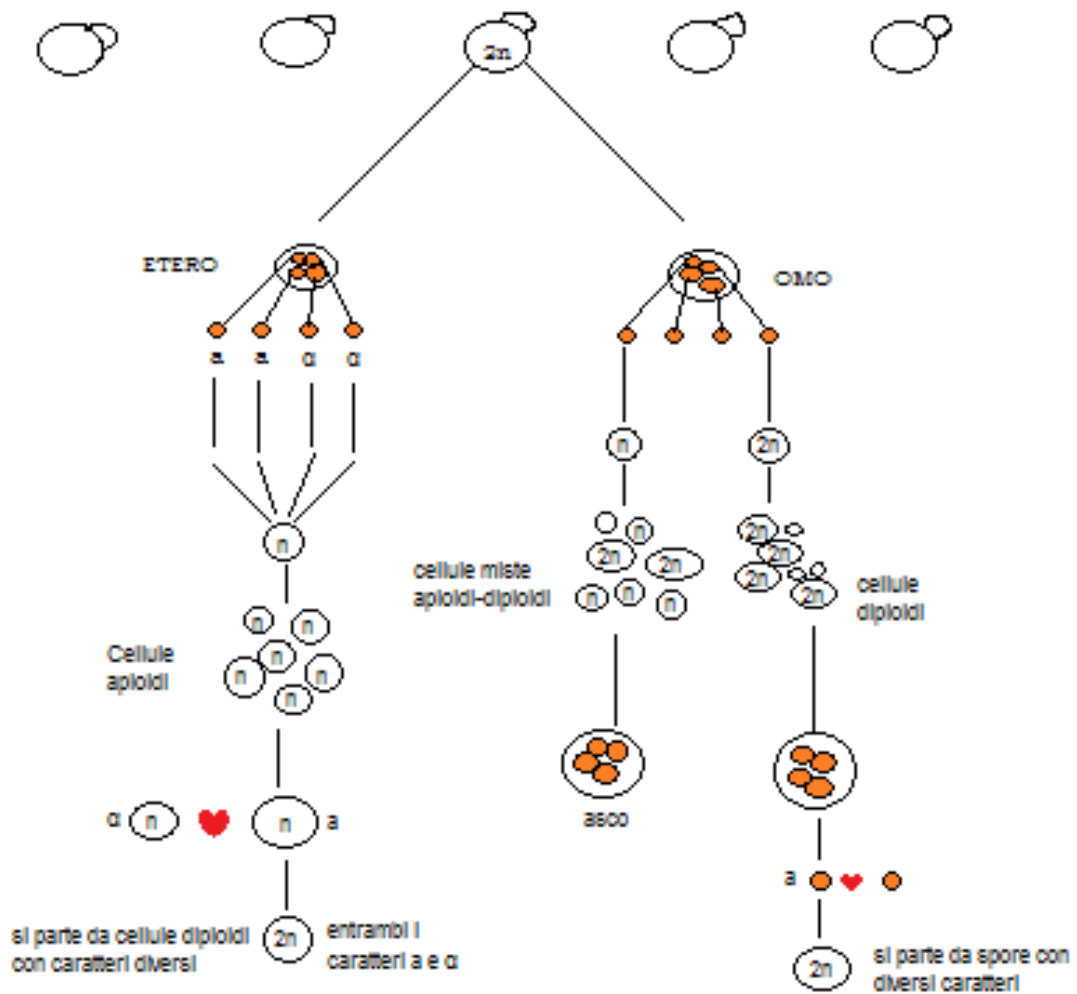
Il miglioramento genetico dei lieviti non può prescindere dalla conoscenza delle loro modalità di sviluppo, del loro genoma, del loro ciclo vitale.

Lo sviluppo di *Saccharomyces cerevisiae* può avvenire attraverso due vie a seconda della disponibilità di nutrienti presenti nel mezzo: quando sussistono condizioni di carenza nutritiva il lievito attua la riproduzione sessuata attraverso la formazione dell'asco contenente 4 ascospore; quando le condizioni nutritive sono ottimali il lievito ricorre alla riproduzione asessuata per lo più per gemmazione, mediante questa modalità raddoppia la sua massa ogni 90 minuti.

I ceppi vinari, in generale, sono aploidi (con 16 cromosomi), diploidi (→completezza del corredo cromosomico: 16 x 2 cromosomi), aneuploidi (→mancanza di alcuni cromosomi) e occasionalmente poliploidi.

I ceppi che mantengono il loro stato aploide sono detti eterotallici: questi ceppi sono eterozigoti per il tipo sessuale, pertanto lo zigote ottenuto per fusione di due cellule aploidi in buone condizioni nutrizionali si moltiplicherà mantenendo il suo stato diploide, mentre in condizioni di carenza lo stesso zigote produrrà per meiosi un asco con 4 ascospore. 2 a e 2 alfa. La germinazione delle spore darà origine a cellule vegetative aploidi, che avendo una ben precisa sessualità, producono colture stabilmente aploidi. Queste ultime non sono adatte per la conduzione di un processo fermentativo in enologia in quanto hanno sviluppo / moltiplicazione lento. Pertanto per ottenere l'ibrido si deve procedere alla coniugazione tra cellule di due ceppi diversi e con matrice sessuale diversa.

I lieviti da vino sono per lo più omotallici, ovvero dopo la germinazione delle spore si verifica il fenomeno della autodiploidizzazione in quanto privi di sessualità ben definita.



Si formano colture tutte diploidi o miste, cioè in parte aploidi, in parte diploidi,

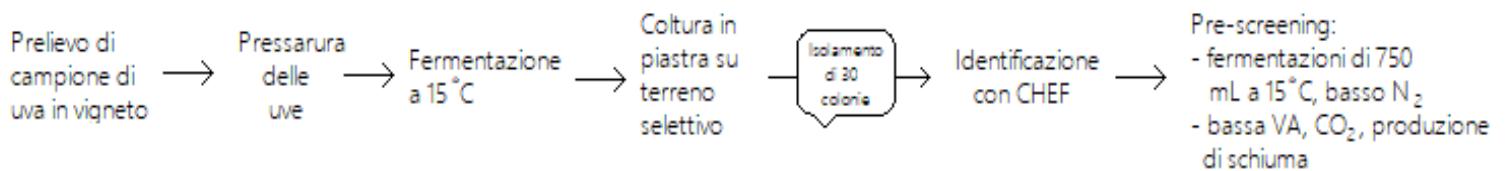
- ◆ pertanto per ottenere ibridi non si può ricorrere all'incrocio tra cellule ma solo all'incrocio tra spore provenienti da aschi di ceppi diversi. Anche questo tipo di ciclo non è privo di difficoltà in quanto i ceppi omotallici sporificano con difficoltà, se sporificano è la germinazione delle spore a risultare difficile, infine è necessario verificare lo stato diploide delle colonie.

≈ METODI DI SELEZIONE ≈

La costituzione di nuovi ceppi selezionati di lieviti richiede prima di tutto la selezione clonale, a cui far seguire l'ibridazione intra o inter-specifica con incrocio di cellule aploidi o di spore a seconda del ceppo, o mediante fusione di sferoplasti previa caratterizzazione genetica.

- ↪ Selezione Clonale; (strumento)
- ↪ Ibridazione intra e interspecie o miglioramento genetico; (tecnica)
- ↪ Breeding; (strumento/tecnica)
- ↪ Ingegneria genetica con la fusione fra cellule, fra sferoplasti; (tecnica)
- ↪ DNA ricombinante (OGM) + PCR (tecnica)
- ↪ Miscele di ceppi (tecnica)

SELEZIONE CLONALE



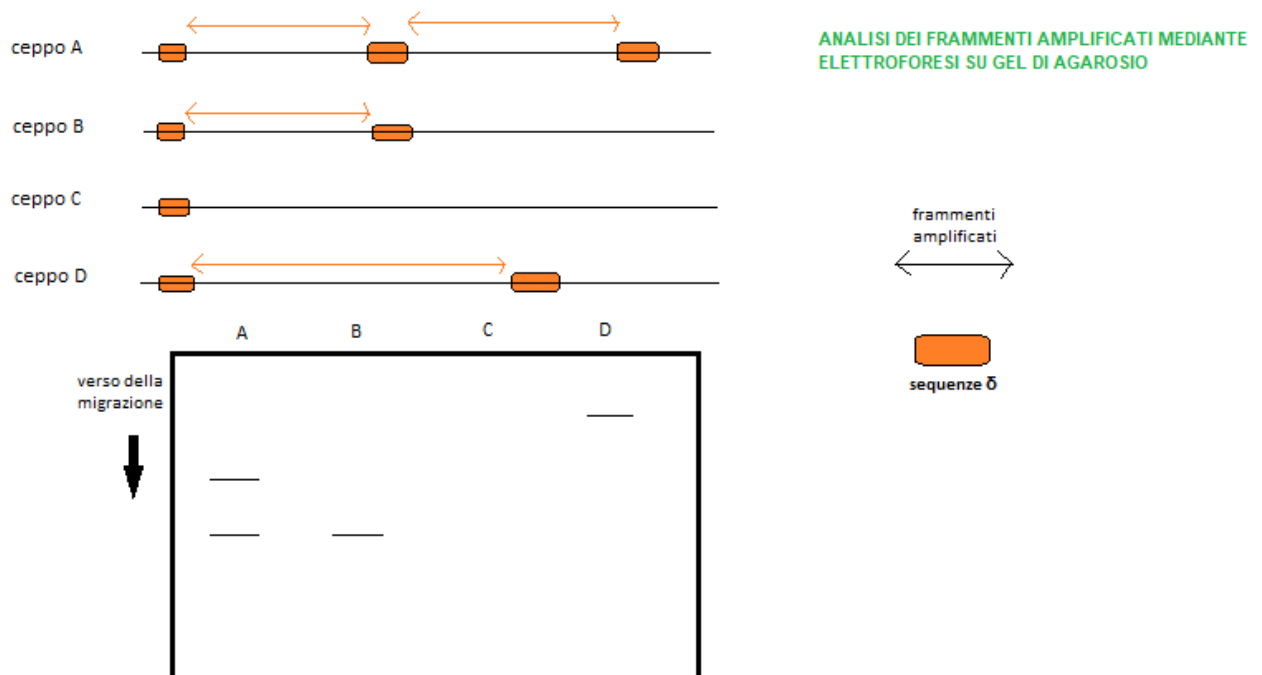
I lieviti presenti sull'uva vengono isolati mediante la raccolta sterile dei grappoli. Segue l'isolamento dei ceppi tramite le tecniche classiche di semine microbiologiche su piastra.

Volendo sintetizzare il processo di selezione clonale:

- Raccolta dei campioni di uva in diversi punto del vigneto.
- Ammostamento dell'uva.
- Fermentazione condotta a 15°C.
- Semina del mosto in terreno selettivo.
- Isolamento dei lieviti tramite elettroforesi ⁵in campo pulsato

⁵ L'elettroforesi a campo pulsante permette di separare i cromosomi dei lieviti e di confrontare i cariotipi dei ceppi sfruttando il polimorfismo del DNA genomico (diverse dimensioni dei cromosomi), o di frammenti di DNA. Questa tecnica utilizza due campi elettrici applicati in maniera alternata per mezzo di elettrodi situati ai lati dell'apparecchio. Questa separazione avviene su gel di agarosio.

IDENTIFICAZIONE DEI CEPPI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE CON LA TECNICA DELLA PCR ASSOCIATA AGLI ELEMENTI δ



Nel caso dei lieviti nei mosti, la selezione clonale deve rispettare certi punti:

- ≈ Isolamento di un gran numero di colture da mosti differenti e in diversi momenti della vinificazione
- ≈ Identificazione delle colture a livello di specie
- ≈ Studi biometrici eseguiti con colture di sicura appartenenza alla specie che si sta studiando.
- ≈ Esame di tutti i ceppi selezionati e determinazione delle loro caratteristiche, cominciando dalla competitività (energia di fermentazione, resistenza all'alcool, ect. Vedi sopra metodo castelli.). Graduale e progressiva eliminazione dal processo di selezione di tutti i ceppi che non rientrano nei parametri di selezione.
- ≈ Individuazione dei ceppi in possesso di tutti i caratteri desiderati. Questi ceppi costituiscono il risultato finale della selezione clonale. Vengono conservati anche i ceppi che possiedono caratteri non ricercati in quel momento ma comunque considerati interessanti. Oggi, infatti, non vengono esclusi dal miglioramento genetico neppure i lieviti apiculati, in quanto, nel loro genoma, sono presenti caratteri utili in enologia. Le nuove tecniche consentono di individuarli e di utilizzarli scartando tutti quelli negativi.

IBRIDAZIONE

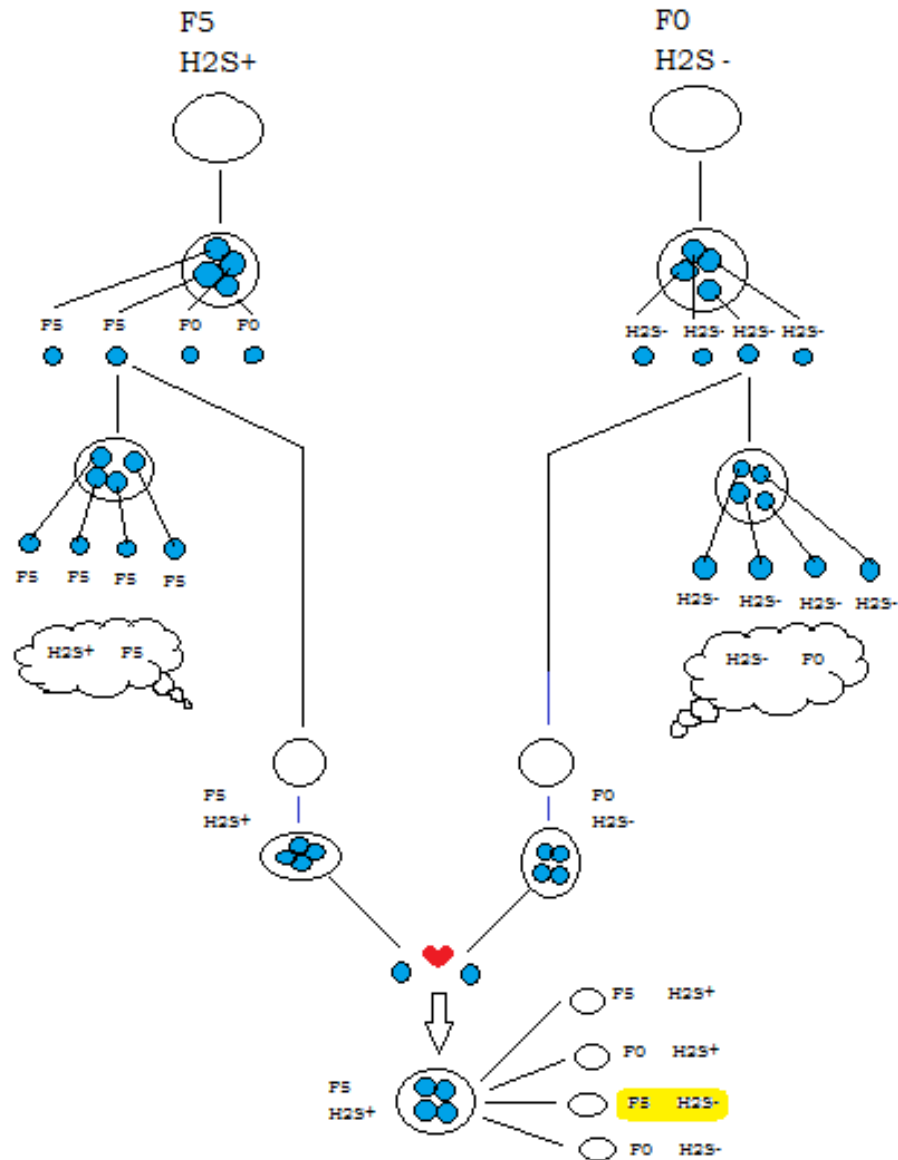
Come detto in precedenza, il lievito può riprodursi in due modi: sessualmente ed asessualmente.

L'ibridazione sfrutta la capacità di riproduzione sessuata dei lieviti, fermo restando che:

- ✂ L'ibridazione di ceppi omutallici e autodiploidizzanti necessita della coniugazione fra spore portando alla formazione di nuovi ceppi da ricercare tra i discendenti monosporali degli ibridi.
- ✂ L'ibridazione di colture derivanti da spore di ceppi eterotallici necessita della coniugazione fra cellule aploidi portando alla formazione dell'ibrido stesso (diploide).

Tutte le operazioni sono eseguite al microscopio. Si usano terreni liquidi (sia per indurre la sporificazione che per indurre la gemmazione) all'interno di gocce d'olio che sostituiscono le scatole Petri. Si usa una micro-ansa per prelevare l'asco e un micro-ago per romperlo. A questo punto risulta fondamentale **l'analisi delle tetradi** (analizzare le colonie sviluppatesi dalle 4 spore dell'asco) che varia a seconda del carattere ricercato.

Caso Concreto Di Miglioramento Genetico Con Ceppi Omotallici



Partendo da un ceppo con caratteri dominanti (alto livello di flocculazione e un'alta produzione di idrogeno solforato) e un ceppo con caratteri recessivi (bassa produzione di H₂S e non flocculazione), si moltiplicano per sporificazione in camera a olio, formando l'asco (allevamento in ambiente povero di nutrienti) e si esegue la rottura della parete dell'asco. Una delle spore, con caratteristiche note, si incrocia con una spora appartenente all'altro ceppo, in micro goccia di un mezzo nutritivo. Queste si coniugano dando origine a un ibrido eterozigote per entrambi i caratteri. Si fa sporificare l'ibrido, si esegue il controllo delle tetradi. Solo una delle quattro spore presenta entrambe le caratteristiche da noi ricercate e sarà questa destinata alla germinazione, cioè alla formazione di una coltura.

Ibridi Interspecifici

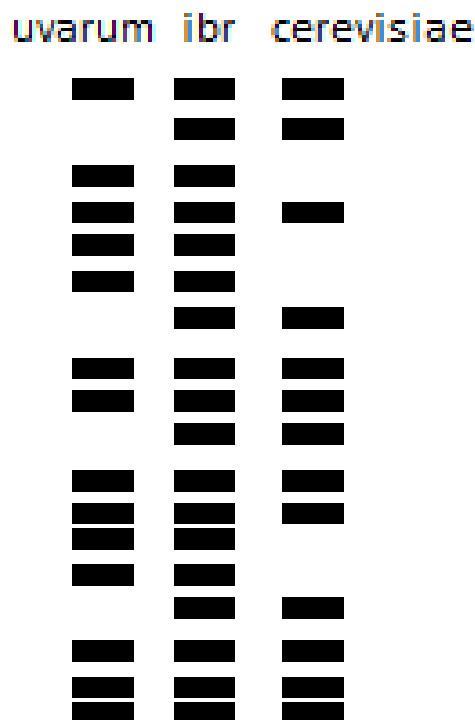
Se si incrociano ceppi appartenenti a specie differenti si ottengono ibridi interspecifici che però sono sterili. Nonostante la sterilità possiedono delle caratteristiche enologiche molto interessanti:

- ♣ In quanto sterili sono estremamente stabili (la gemmazione mantiene inalterati i caratteri in quanto riproduzione asessuata)
- ♣ Sono molto vigorosi e competitivi

I più studiati ibridi interspecifici sono *S. cerevisiae* x *S. uvarum*. In particolare gli ibridi sono di due tipi:

1. mesofili x criotolleranti
2. termotolleranti x criotolleranti.

I primi sviluppano bene a tutte le temperature comprese tra 27 e 32°C (mentre i ceppi parentali hanno temperature ottimali ben individuabili, la loro produzione di composti minoritari (quali: glicerolo, acido succinico, acido acetico, alcoli superiori) avviene con intensità intermedia rispetto ai genitori. I secondi hanno profilo termico dei ceppi mesofili, hanno intensa attività malolcolica, bassa produzione di acido acetico e di beta-feniletanolo. Tutto ciò viene confermato dai profili cromosomiali elettroforetici che risultano costituiti dalla sommatoria delle bande dei due genitori.



Profili elettroforetici dei cariotipi di *S. uvarum*, *S. cerevisiae* e dei loro ibridi. L'ibrido presenta delle bande comuni a entrambi i genitori. Il DNA di *S. cerevisiae* è caratterizzato da un accentuato polimorfismo.

Tutti formano interessanti quantità di glicerolo e basse quantità di acido acetico.

L'ibridazione secondo Anchor yeast

Anchor Yeast, principale marchio mondiale di lievito da vino delle Americhe, è stata la prima società a commercializzare ceppi ibridi di lieviti da vino e ha collaborato con il Dipartimento di Microbiologia dell'Università di Stellenbosch in Sudafrica, che ha prodotto il lievito ibrido denominato "VIN13". Si tratta di un ibrido intraspecie ottenuto incrociando *Saccharomyces cerevisiae* subspecie *cerevisiae* con *Saccharomyces cerevisiae* subspecie *bayanus*. VIN 13 è commercializzato dal 1991 e possiede delle qualità eccezionali: produce grandi quantità di tioli e di esteri, ha un'ottima tolleranza al freddo e all'alcool.

Più di recente è stato creato l'ibrido interspecifico "Anchor Exotic SPH", ottenuto combinando ceppi parentali di *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus*. Le caratteristiche dell'ibrido consistono nella produzione di molecole aromatiche, con note fruttate di fragola e di ciliegia, e caratteri floreali, di glicerolo, a cui si aggiunge una certa attività de-malicante che lo rendono adatto alla produzione di ottimi vini rossi.

Lieviti Ibridi (*Saccharomyces cerevisiae* X *Saccharomyces uvarum*) Nella produzione Dell'amarone Della Valpolicella

S. uvarum si distingue dal *S. cerevisiae* per la vigoria fermentativa a basse temperature. L'ibridazione rappresenta una modalità di evoluzione dei lieviti. Sebbene si generino organismi sterili, a seguito dell'incompatibilità genomica, l'ibridazione interspecifica è l'origine di cellule "allopoliploidi", cioè dotate di due o più sets di cromosomi di entrambe le specie parentali. Dall'ibridazione interspecifica è possibile ottenere ibridi *S. cerevisiae* x *S. bayanus* allotetraploidi fertili in grado di originare progenie stabile. L'"**S6U**", isolato e selezionato dall'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Velletri, è stato adottato e commercializzato dalla ditta Lallemand, è caratterizzato dalla capacità di condurre la fermentazione alcolica a basse temperature, alte rese in glicerolo, capacità di non degradare l'acido malico, produrre basse concentrazioni di acido acetico, di esaltare i vini con aromi floreali e speziati ed, inoltre, di dare corposità e rotondità al vino. Questo ceppo è consigliato per la vinificazione di vini rossi da invecchiamento e anche di bianchi

corposi. Da diversi anni il ceppo S6U viene impiegato presso il Centro Sperimentale di Vitivinicoltura della provincia di Verona per le vinificazioni di uve appassite per la produzione dei vini Recioto e Amarone della Valpolicella. Uve sottoposte a surmaturazione. Il ceppo S6U mostra rapidità di attivazione in presenza di gradi zuccherini superiori a 300g/L dove la pressione osmotica può rappresentare un fattore di stress. In presenza di basse temperature (<14°C) il ceppo S6U tende ad anticipare l'inizio della fermentazione rispetto ai ceppi *S. cerevisiae* e la produzione di etanolo raggiunge una resa vicina a quella di *S. cerevisiae* e superiore a quella di *S. uvarum*. Nelle fasi iniziali della fermentazione la velocità di consumo degli zuccheri è più elevata per S6U rispetto a *S. cerevisiae*. Con il progressivo aumento della temperatura nel mosto in fermentazione avviene una più rapida conversione di zuccheri anticipando così il completo sviluppo di etanolo, soprattutto rispetto a *S. uvarum*. In poche parole "il profilo cinetico di S6U offre i vantaggi di un buon avvio della fermentazione a basse temperature (paragonabile a *S. uvarum*), uniti ad un decorso fermentativo rapido ed una resa in alcol elevata (paragonabile a *S.cerevisiae*)." [cit. rivista internet di vitivinicoltura ed enologia 2005]

Nelle fermentazioni condotte a temperature più alte (15-18°C) il ceppo S6U si comporta in modo del tutto uguale ad altri ceppi commerciali del *S. cerevisiae*.

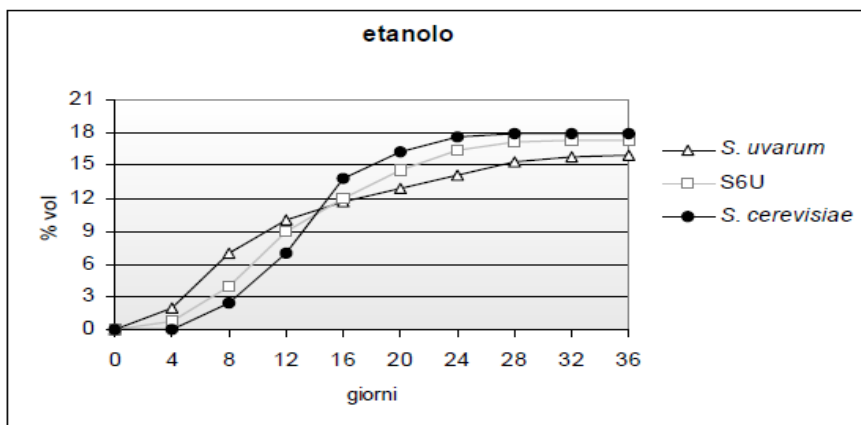


Figura 1. Andamento della produzione di etanolo misurata durante la fermentazione di uva appassita condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U. La temperatura della cantina era di 11-14°C.

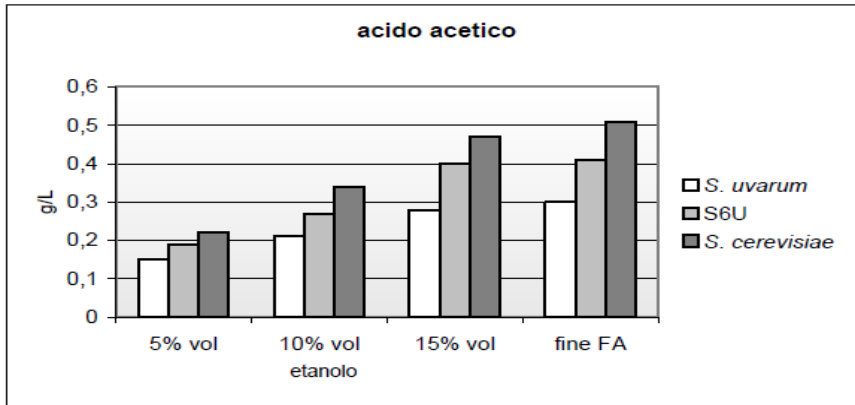


Figura 2. Concentrazione di acido acetico misurata a 5, 10 e 15% vol di etanolo sviluppato e a fine fermentazione alcolica (FA) condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U.

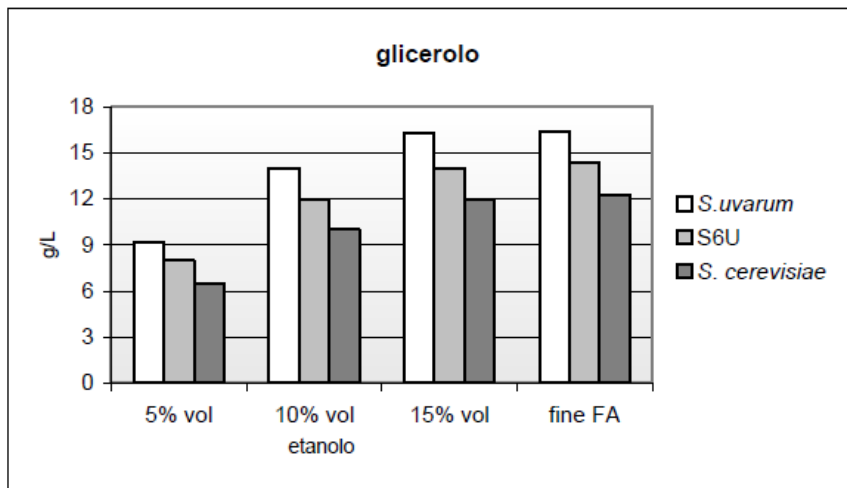


Figura 3. Concentrazione di glicerolo misurata a 5, 10 e 15% vol di etanolo sviluppato e a fine fermentazione alcolica (FA) condotta da ceppi industriali della specie *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e dall'ibrido S6U.

INGEGNERIA GENETICA

Altra modalità di selezione dei lieviti riguarda la tecnologia del DNA ricombinate insieme all'ingegneria genetica. Queste tecniche consentono di modificare le caratteristiche dei lieviti in modo molto preciso introducendo nuove caratteristiche senza influenzare le altre proprietà. Infine vi è la possibilità di eliminare le caratteristiche indesiderate.

Le tecniche dell'ingegneria genetica consentono il trasferimento di geni fra specie. Il risultato viene chiamato "Organismo Geneticamente Modificato o OGM", il cui utilizzo non è consentito in enologia.

Nel 1997 entrò in vigore il Regolamento Europeo sui nuovi alimenti e ingredienti. All'interno del quale venivano descritte anche le restrizioni e i divieti riguardanti i prodotti OGM. Se

un alimento derivante da un OGM è equivalente ad un alimento normale allora può essere considerato alla pari dell'ultimo, ammesso che non abbia differenze a livello nutrizionale, analitico o tossicologico. In generale, l'alimento:

- ☠ non deve avere effetti nocivi sulla salute umana e animale e per l'ambiente
- ☠ non deve indurre in errore il consumatore
- ☠ non deve essere differente dall'alimento che si intende sostituire sul mercato in modo che il suo consumo sarebbe svantaggioso per il consumatore sul piano nutrizionale
- ☠ deve contenere OGM tracciabili durante tutti i passaggi di produzione e distribuzione sul mercato.

Il prodotto quindi deve essere approvato dall'agenzia europea per la sicurezza degli alimenti (EFSA). L'etichettatura del prodotto è obbligatoria, anche se il DNA ricombinante o la proteina corrispondente non sono presenti nell'alimento. Gli alimenti contenenti OGM vanno etichettati come "geneticamente modificati" o "prodotti da un ingrediente geneticamente modificato". Per quanto riguarda l'enologia l'utilizzo di queste sostanze, al momento, non è ammessa in Italia. L'ingegneria genetica è un valido strumento a servizio del miglioramento genetico perché consente di individuare i caratteri oggetto del miglioramento.

La Fusione Degli Sferoplasti

Le cellule di lieviti possono fondersi se vengono private della parete cellulare. Questa può essere facilmente eliminata con l'uso di enzimi, (elicasasi o zimoliasasi). Se le cellule sono sospese in un mezzo isotonic con il citoplasma non si ha la plasmolisi: le cellule rimangono avvolte dalla sola membrana e perdono la loro morfologia originale assumendo forma sferica. Le cellule private della parete sono chiamate protoplasti, se la parete è completamente distrutta come nel caso dei batteri, o sferoplasti, se rimangono frammenti della parete come nel caso dei lieviti appunto. Gli sferoplasti hanno la capacità di riformare la parete cellulare.

Metodica: Cellule giovani vengono raccolte e lavate per centrifugazione, vengono sospese in soluzione di sorbitolo, tamponata a pH 7.5; alla sospensione si aggiunge l'enzima zimoliasasi che, dopo l'incubazione a 30°C per un'ora, provoca la lisi della parete cellulare. Gli sferoplasti sono lavati per

centrifugazione nella stessa soluzione di sorbitolo per eliminare l'enzima e possono essere conservati per 24 ore alla temperatura di 4°C senza perdita di vitalità. La sospensione è seminata in piastra su terreno YPD agarizzato e ancora supplementato dal sorbitolo. In queste condizioni gli sferoplasti riformano la parete cellulare e, dopo 2-3 giorni, danno origine a colonie visibili.

Sferoplasti di ceppi o di specie differenti possiedono la capacità di fondersi (o ibridarsi) fra di loro o di assumere plasmidi o frammenti di DNA dal mezzo. Le nuove colture ottenute possono anche essere poliploidi.

Il procedimento per ottenere fusione di sferoplasti è il seguente:

- ❖ Gli sferoplasti di due differenti ceppi vengono sospesi in una soluzione al 40% di polietilene glicole, in presenza di CaCl_2 e tampone a pH 7.5. Dopo circa 30 minuti la sospensione è centrifugata e il materiale è sospeso in soluzione di sorbitolo.
- ❖ E' avvenuta la fusione degli sferoplasti.
- ❖ Si esegue una semina in piastra su terreno YPD agarizzato con l'ulteriore aggiunta di sorbitolo.
- ❖ Il metodo della fusione degli sferoplasti è stato utilizzato per l'ottenimento di nuovi ceppi per birrificio o per l'introduzione del carattere killer in ceppi criofilici di *S. cerevisiae*.
- ❖ Il metodo pone molti problemi in fase di riconoscimento dei prodotti di fusione e produce ceppi non stabili a causa di plasmidi incompatibili con le informazioni cromosomiali.

DNA RICOMBINANTE E PCR

Quella del DNA ricombinante è una tecnica che consente di:

- ∂ Inserire un nuovo carattere
- ∂ Eliminare geni responsabili di caratteristiche negative
- ∂ Amplificare geni già presenti per rendere più evidente un carattere.

Per questa tecnica è necessario conoscere la sequenza nucleotidica delle sequenze vicine alla regione da amplificare al fine di sintetizzare due inneschi oligonucleotidici (detti

“primer”) necessari per avviare la reazione. Per questo viene sfruttato il potere della PCR o Polymerase Chain Reaction. Tradotta come “reazione a catena della DNA polimerasi”, consente l'amplificazione esponenziale in vitro di una specifica sequenza di DNA. I passaggi obbligatori per eseguire la tecnica del DNA ricombinante sono i seguenti:

1. Individuazione del carattere = **gene target**. (Il gene target deve essere legato a un'attività metabolica dovuta ad enzimi).
2. Determinazione della **sequenza amminoacidica dell'enzima**. (La sequenza degli amminoacidi corrisponde alla sequenza delle basi azotate del gene target. Tre **basi azotate** per ogni amminoacido).
3. Sintesi del gene target in grande quantità mediante PCR:
 - a. Bisogna conoscere la sequenza nucleotidica (o di basi azotate) alle estremità del gene target, cioè i primers.



- b. Sintesi degli oligonucleotidi complementari o **primers**.

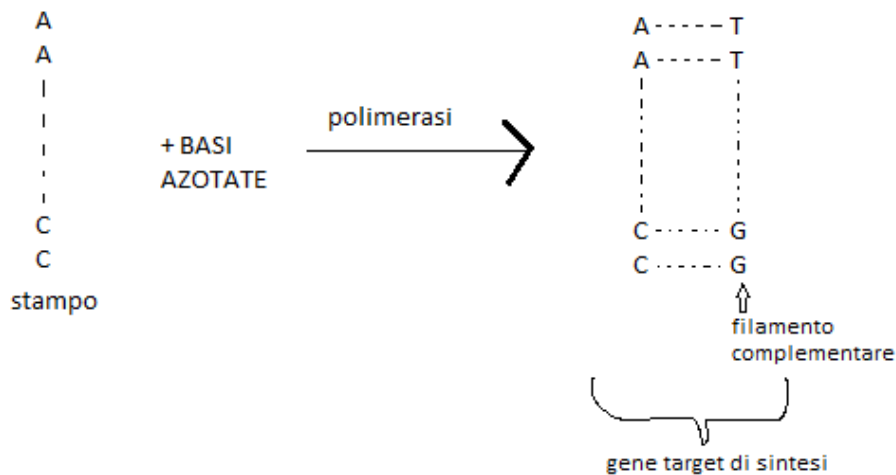
I componenti essenziali della miscela di reazione della PCR sono, oltre i primer ed il DNA bersaglio, una DNA polimerasi termostabile, deossiribonucleotidi trifosfati e ioni magnesio.

I prodotti della PCR vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Questo permette di ottenere da poche centinaia di basi a 20kb. I frammenti di DNA vengono separati sotto l'azione di un campo elettrico in presenza di uno specifico tampone che consente sia la conduzione della corrente elettrica, che il controllo del pH durante l'elettroforesi: il DNA carico negativamente migra verso il polo positivo. La matrice porosa del gel ritarda la migrazione del DNA, consentendo ai piccoli frammenti di spostarsi più velocemente rispetto ai più grandi determinando una separazione in funzione del peso molecolare.

4. Denaturazione DNA (apertura) mediante calore a 94-95°C.

5. Primers e basi azotate vengono messe in soluzione tampone insieme al singolo filamento di gene target. In questo modo avviene la reazione con l'enzima polimerasi e conseguente sintesi del filamento complementare del DNA target.

Appaiamento detto anche "annealing": i primer si appaiono con le regioni complementari presenti sul DNA denaturato ad una temperatura di 45-60°C.



Il punto 5 viene ripetuto n volte (n=5) grazie a cicli termici avviene la produzione di grandi quantità di gene target.

6. Inserimento del target di sintesi nel DNA plasmidico di un vettore (Escherichia Coli). Il batterio viene trasformato in **protoplasto** con gli enzimi e a una temperatura di 72°C:
- Aprire il plasmide** con enzimi di restrizione (=forbici).
 - Collegare il gene** target al plasmide con enzima ligasi
 - Inserire** il plasmide modificato in Escherichia Coli (o **trasformazione batterica**): il batterio va precedentemente preparato a questo inserimento. Questo processo serve a mantenere inalterato il plasmide modificato.
7. Si estrae il plasmide dal batterio e lo si inserisce nella cellula del lievito (o **trasformazione del lievito**), resa permeabile all'introduzione del plasmide agendo sulla parete cellulare per via chimica (ovvero producendo sferoplasti).
8. La cellula del lievito trasformata deve **formare colonia**.
9. Si devono individuare le cellule della colonia con plasmide trasformato: il plasmide usato deve **portare caratteri facilmente riconoscibili** e compatibili con il lievito.

10. I lieviti trasformati vanno sottoposti ad accurati **controlli**:

- a. Per accertare la presenza del gene target
- b. Per accertare l'assenza di interferenze con altri caratteri propri della specie di lievito.

Un esempio ben riuscito della tecnica del DNA ricombinante è la fermentazione malolattica. Un obiettivo che alcuni ricercatori si sono prefissi è l'ottenimento di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in grado di dare origine alla fermentazione malolattica durante la fermentazione alcolica. L'operazione è quella di far esprimere in *S. cerevisiae* il gene della malato permeasi da *Schizosaccharomyces pombe* e il gene della fermentazione malolattica da *Lactococcus lactis*. L'efficienza della fermentazione malolattica dei lieviti è risultata molto elevata perché i ceppi costruiti si sono dimostrati in grado di abbattere fino a 8 grammi di acido malico per litro di mosto. Grazie a questi risultati si rende inutile l'utilizzo di batteri lattici (*Oenococcus oeni*) per la fermentazione malolattica che è di difficile controllo e, alcune volte, di stentato avvio. La fermentazione malolattica svolta dai lieviti rende possibile l'impiego di anidride solforosa senza preoccuparsi dell'eventuale inibizione sugli stessi. Inoltre avviene anche a bassi valori di pH. Un unico parametro ancora non convince i ricercatori: la produzione dei prodotti secondari durante la fermentazione malolattica che in quella operata dai lieviti non avviene. Nella f.m. operata dai batteri durante la stessa vengono rilasciati prodotti secondari ed enzimi a seguito dell'autolisi cellulare. Nei lieviti invece viene semplicemente convertito l'acido malico ad acido lattico.

Miscele Di Ceppi

La via dell'ibridazione non è l'unica soluzione percorribile: per aumentare la variabilità genetica delle popolazioni presenti in fermentazione, e dare maggiore complessità ai vini, l'uso contemporaneo di ceppi diversi in grado di collaborare tra loro è un'altra delle nuove frontiere delle biotecnologie enologiche. La conoscenza dei meccanismi biologici con i quali i diversi ceppi sono in grado di interagire, utilizzando nel proprio metabolismo i precursori prodotti e rilasciati dall'attività enzimatica degli altri. Questa "miscela" ha portato a una nuova frontiera: "miscela Alchemy", creata dai ricercatori dell'Australian Wine Research Institute (AWRI) ⁶in collaborazione con Anchor Yeast. Anche per i vini rossi

⁶ AWRI o Australian Wine Research Institute è formato da un gruppo di circa 120 ricercatori che svolgono attività di ricerca finanziate grazie a fondi governativi, il 50% dei quali proviene dalle tasse dei produttori che partecipano alla scelta dei temi di ricerca. Ha sede ad Adelaide nel sud dell'Australia.

sono stati create delle miscele di ceppi in grado di assicurare profili aromatici intensi e complessi, ad elevata tolleranza all'alcool, con morbidezza e rotondità. Per questi motivi le miscele sono create in proporzioni specifiche. L'inoculo quindi dev'essere eseguito soltanto al termine della fase di reidratazione. La realizzazione di un pied de cuvée o di pre-inoculi di moltiplicazione del lievito porterebbe a una variazione non controllata nei rapporti dei diversi ceppi e di conseguenza a risultati qualitativi fermentativi non ideali.

Breeding⁷ Assistito Da Marcatori Molecolari

Lo scopo è di sviluppare nuovi ceppi enologici che combinino particolari fenotipi, quali bassa produzione di SO₂, H₂S e acetaldeide, senza rinunciare ad una buona capacità fermentativa. Per questo studio sono stati presi in considerazione due ceppi di lieviti: il ceppo JN10 in grado di completare la fermentazione in condizioni difficili quali temperature estreme e/o mosti altamente chiarificati; il ceppo JN17 caratterizzato da limitate esigenze in azoto, bassa produzione di SO₂, H₂S ed acetaldeide. Grazie alla combinazione dei dati fenotipici e genotipici i ricercatori sono riusciti a identificare una regione del cromosoma 14 in cui sono identificati a loro volta due geni delle vie metaboliche dello zolfo, MET2 e SKP2.

Una volta identificati i marcatori molecolari connessi alle proprietà ricercate, è stato possibile trasferire tramite re incrocio la proprietà della bassa produzione di SO₂/H₂S dal ceppo di lievito JN17 al ceppo JN10 mantenendone intatte tutte le proprietà enologiche. A questo scopo si è proceduto a cicli di reincrocio tra spore (ibridi aploidi) del ceppo ottimizzato e spore del ceppo parentale JN10. Dopo tre cicli di reincrocio si è ottenuto un ceppo con scarsa produzione di SO₂, H₂S e acetaldeide e limitate esigenze di azoto.

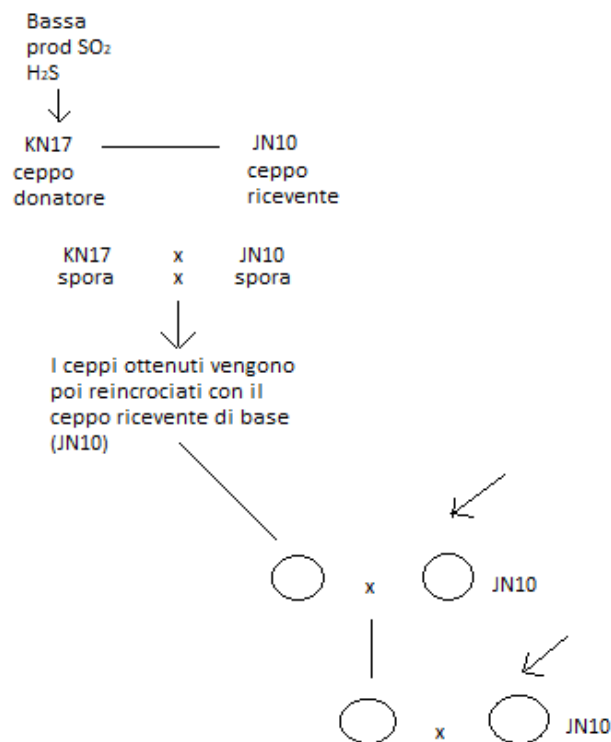
A partire dagli ibridi di quarta generazione, che presentavano i marcatori molecolari di riferimento, si è proceduto a una nuova fase di caratterizzazione. Il fine era individuare il ceppo che combinasse in modo migliore le proprietà ricercate con un comportamento enologico soddisfacente, denotato da buona capacità fermentativa, resistenza a

⁷ La selezione assistita da marcatori, nota anche come MAS (dall'inglese Marker Assisted Selection), è una tecnica di selezione genetica applicata alle piante e agli animali che permette di migliorare caratteri d'interesse (produttività, resistenza a stress abiotici e biotici), attraverso l'impiego di marcatori morfologici, biochimici e genetici. Spesso questi caratteri sono determinati da aree del genoma dette QTL (quantitative trait loci), la cui mappatura e caratterizzazione rappresenta il maggior ostacolo nella MAS. Di grande importanza è anche la scelta dei marcatori più adatti, che andranno selezionati in base a precisi requisiti. Tale tecnica è diversa dalla Transgenesi, che porta alla produzione di Organismi Geneticamente Modificati. La MAS non fornisce prodotti nel cui genoma sono stati inseriti geni estranei alla specie in questione, ma si limita ad analizzare la presenza di determinati geni negli organismi viventi (piante od animali), frutto di ibridazioni, per valutarne compiutamente le caratteristiche, senza dover attendere il compimento del processo di crescita e maturazione.

temperature estreme e profilo sensoriale interessante. Il risultato (ora chiamato Lalvin ICV oKay) ha confermato il mantenimento dei tratti positivi del parentale JN10 con assenza di aromi estranei o eccessi di acidità volatile e mantenendo le caratteristiche ricercate in partenza riguardanti SO₂, H₂S e acetaldeide.

Schema esplicativo: KN17 x JN10 ----- JN10modificato

JN10modificato x JN10



L'ibrido di 4° generazione viene testato per tutte le altre caratteristiche enologiche: LavinICVokay

Tutti gli incroci sono stati eseguiti tra spore. L'ampio argomento preso in esame in questa tesi è stato scelto in base ad un interesse personale e come "anticipazione" di un futuro percorso presso la facoltà di Biotecnologie all'università. In questa tesi ho voluto sottolineare le molteplici vie di cui l'uomo si è servito per ottenere e migliorare un prodotto utile a facilitare il proprio lavoro. Credo fortemente nella ricerca microbiologica per migliorare non solo i prodotti alimentari. A mio parere, tra i metodi analizzati, il più interessante è la tecnica del DNA ricombinante che può essere usata per accelerare la ricerca dei caratteri oggetto di una selezione. Spero che, in un futuro non molto lontano,

gli OGM possano essere accettati anche nel settore enologico. Spero di continuare i miei studi in questo ambito.

BIBLIOGRAFIA:

Microbiologia enologica – Giovanna Suzi e Rosanna Tofalo

Trattato di enologia - Ribéreau Gayon, D. Dubordieu, B. Donèche, A. Lonvaud

Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia - C. Zambonelli, T. Vini, L. Castellari

Microbiologia e biotecnologia dei vini – Carlo Zambonelli

Rivista VigneVini n°10 ottobre 2014

VinNatur

Annibale Gandini - Fondazione Giovanni Dalmasso

Infowine – rivista internet di viticoltura ed enologia n°11/2 2005

Rivista VQfocus cantina, biotecnologie in enologia – n°4 luglio 2016

L'Enologo – n°5 maggio 2014

Rivista VQ cantina biotecnologie – n°4 luglio 2014