

USO DEI LIEVITI SELEZIONATI E BIODIVERSITÀ

Eva VALERO¹, Dorit SCHULLER², Brigitte CAMBON¹, Margarida CASAL² and Sylvie DEQUIN¹

(1) Istituto nazionale di ricerca agronomica, UMR scienze per l'enologia, 2, Place Viala, 34060 Montpellier, France

(2) Centro di Biologia, Università di Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Riassunto

Negli ultimi due decenni è stato ampiamente generalizzato l'uso di ceppi commerciali di lieviti enologici come colture starter. I ceppi di lieviti enologici vengono rilasciati ogni anno nell'ambiente attorno agli stabilimenti enologici. Comunque, poco si sa circa il destino di quei ceppi nel vigneto. Per valutare l'abilità dei lieviti industriali, utilizzati come starter, di sopravvivere e diffondersi in natura, diventando poi parte della naturale microflora dei mosti, abbiamo pianificato una serie di campionamenti su larga scala per un periodo di tre anni in sei vigneti (3 in Portogallo 3 in Francia). Ciascun vigneto ha utilizzato lo stesso ceppo (ceppi) di lieviti industriali continuamente negli ultimi 5 anni. Sono stati raccolti un totale di 198 campioni di uva a differenti distanze dallo stabilimento enologico, prima e dopo la vendemmia.

Verso la fine delle fermentazioni spontanee, la composizione della flora dei lieviti è stata determinata attraverso differenti metodi di identificazione (PCR - amplificazione delle β -sequenze, RFLP del DNA mitocondriale e marcatura dei microsattelliti). Tra i 3780 ceppi di lievito identificati, 296 avevano un profilo genetico identico a quello di ceppi di lieviti industriali. La grande maggioranza di questi ceppi (94%) sono stati trovati nelle immediate vicinanze dello stabilimento enologico (10-200m). I ceppi commerciali sono stati trovati principalmente nei campioni *post-vendemmia*, indicando una disseminazione diretta. Le analisi delle variazioni delle popolazioni da un anno all'altro hanno indicato come non si sia verificato un insediamento permanente dei ceppi commerciali nel vigneto, ma che invece questi siano stati assoggettati, come quelli autoctoni, alle naturali fluttuazioni di un periodico apparire/scompare. A livello globale i dati hanno mostrato come la dispersione di lieviti commerciali nel vigneto sia confinata a brevi distanze dallo stabilimento, a limitati periodi di tempo e sia molto favorita dalla presenza di fuoriuscita di acqua.

Introduzione

A partire dagli inizi degli anni '80, è stato ampiamente generalizzato l'uso di ceppi di lieviti secchi attivi di *S. Cerevisiae*, come colture starter. Oggi la maggior parte della produzione di vino è basata sull'uso di lieviti secchi attivi, i quali assicurano rapide e sicure fermentazioni e riducono i rischi di una lenta fermentazione o peggio di un arresto di fermentazione e di una contaminazione microbiologica. Il maggior numero di lieviti commerciali è stato selezionato in vigneto sulla base delle caratteristiche enologiche quali vigore fermentativo, tolleranza all'etanolo, assenza di caratteri sensoriali anomali e produzione di metaboliti desiderabili. Questi lieviti assieme ad altre innovazioni tecnologiche hanno contribuito a migliorare la qualità del vino ed hanno aumentato la capacità degli enologi sia di controllare il processo di fermentazione sia di raggiungere specifici obiettivi.

I lieviti commerciali vengono usati classicamente in vinificazione senza alcuna particolare misura di contenimento e sono rilasciati ogni anno in grandi quantità, assieme ai residui di vinificazione liquidi e solidi. Il comportamento di questi lieviti nell'ecosistema del vigneto è totalmente sconosciuto così come il loro potenziale impatto sulla microflora naturale. In particolare non si sa se i lieviti commerciali siano in grado di sopravvivere in natura e diventare parte della microflora del vigneto. Sono disponibili solo pochissimi dati che possano contribuire alla valutazione dell'importanza della dispersione e permanenza nel vigneto di questo tipo di lieviti (Frazier and Dubourdieu, 1992; Vezinhet *et al.* 1992; Guillamón *et al.*, 1996). Recentemente è stato realizzato uno studio biogeografico su larga scala nei vigneti sud africani, in cinque aree situate nei vigneti della Coastal Region del Western Cape. I lieviti commerciali sono stati individuati in 3 campioni su 13 (van der Westhuizen *et al.*, 2000a and 2000b).

Il presente studio su larga scala, realizzato in differenti zone di Francia e Portogallo, punta a valutare l'abilità dei lieviti industriali a diffondersi e sopravvivere in natura. I dati faranno da fondamento per valutare se i ceppi inoculati possano diventare membri della microflora naturale e intaccare la biodiversità e se possano influenzare le fermentazioni delle annate successive, specialmente quelle realizzate con pratiche tradizionali che si affidano alla fermentazione spontanea. Tali dati faranno anche da punto di partenza per valutare i rischi potenziali associati all'uso di lieviti geneticamente modificati (GM).

Metodologia

Lo schema dei campionamenti ha incluso 36 siti divisi in 6 vigneti, 3 localizzati nel sud della Francia (*Languedoc*) e 3 nel nord del Portogallo (*Região Demarcada dos Vinhos Verdes*). La durata completa di questi studi è di 3 anni (2001-2003). Gli stabilimenti enologici selezionati hanno usato consecutivamente uno stesso ceppo, o più ceppi, di lieviti commerciali negli ultimi 5 anni. I tre stabilimenti enologici portoghesi hanno usato principalmente il Lievito A originariamente selezionato in Francia mentre le tre aziende enologiche francesi hanno usato in modo predominante il Lievito B. Durante i 3 anni di studio sono stati utilizzati, nelle sei aziende, un totale di 34 ceppi di lieviti enologici commerciali.

In ciascun vigneto sono stati definiti sei punti di campionamento adattandoli alle condizioni locali (dimensione e orientamento del vigneto, con predominanza della direzione del vento). La distanza tra lo stabilimento enologico e i siti di campionamento variava tra i 10 e i 1000 metri. Al fine di valutare la rimanenza dei lieviti commerciali negli anni, una prima serie di campionamenti è stata effettuata prima che l'azienda iniziasse la produzione di vino con i lieviti selezionati (campioni *pre-vendemmia*). Durante una seconda serie di campionamenti, *post-vendemmia*, le uve sono state raccolte dopo l'inizio della produzione di vino al fine di determinare la diretta diffusione di lieviti commerciali dallo stabilimento enologico. Con questo disegno sperimentale sono stati raccolti 72 campioni di uva per ciascun anno. Da ciascun punto di campionamento sono stati prelevati circa 2 kg di uva in modo asettico e il mosto estratto è stato fermentato in piccoli volumi (200 - 500 ml) con agitazione meccanica a 20°C. Il controllo giornaliero del peso ha permesso il monitoraggio dei progressi fermentativi. La flora dei lieviti è stata analizzata dopo una riduzione del peso del mosto di 70 g/l, pari al consumo dei 2/3 del contenuto zuccherino. I campioni di mosto sono stati diluiti e distribuiti su piastre con YPD come mezzo colturale (estratto di lievito: 1% peso/volume; Peptone 1% peso/volume; glucosio 2% peso/volume) e, dopo 2 giorni di incubazione, sono state raccolte 30 colonie scelte a caso da ciascuna fermentazione spontanea. I ceppi di *Saccharomyces* sono stati prima selezionati su un mezzo selettivo con L-lisina come unica fonte di azoto. I *Saccharomyces* incapaci di crescere su un terreno di L-lisina, sono stati sottoposti a identificazione molecolare basata su profili di restrizione del DNA mitocondriale [Querol *et al*, 1992], analisi dei microsatelliti utilizzando sei loci (ScAAT1-ScAAT6) [Perez *et al*, 2001], analisi del cariotipo utilizzando PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) [Blondin and Vezinhet, 1988] e *pattern* di amplificazione delle sequenze interdelta [Ness *et al.*, 1993; Legras and Karst, 2003]. Prima di iniziare lo studio abbiamo valutato la capacità discriminatoria dei differenti metodi di identificazione su un totale di 23 ceppi di lieviti commerciali utilizzati negli stabilimenti enologici dei due paesi. Dei 23 ceppi di lieviti commerciali analizzati, 22 tipi sono stati ottenuti utilizzando l'analisi del cariotipo e 21 utilizzando gli altri 3 metodi (Schuller *et al*, 2004). Poiché è stata verificata la similarità tra il potere discriminatorio di questi metodi, ciascuno di loro può essere utilizzato per il nostro studio e il risultato ottenuto sarà comparabile.

Risultati

Sono stati raccolti un totale di 198 campioni durante le tre consecutive serie (2001 - 2003), 108 dei quali prelevati in Francia e 90 in Portogallo (tabella 1)

	2001		2002		2003		Totale
	Francia	Portogallo	Francia	Portogallo	Francia	Portogallo	
Campioni	36	36	36	18	36	36	198
Fermentazioni spontanee	24	19	33	12	15	23	126
Ceppi isolati	720	570	990	360	450	690	3780
Ceppi di <i>Saccharomyces</i>	406	570	120	360	209	690	2355

Tabella 1: distribuzione dei dati totali per anno e per paese

Dei 198 campioni, 126 mosti (64%) hanno prodotto fermentazioni spontanee, nei mosti *pre-vendemmia* il 20% e, in quelli *post vendemmia*, il 44%. La percentuale di fermentazioni spontanee è stata simile nei due paesi, 66% in Francia e 60% in Portogallo. E' stato isolato un totale di 3780 colonie, delle quali 2355 sono state identificate come ceppi di *Saccharomyces*.

Vigneti	A	B	C	D	E	F	Totale
Fermentazioni spontanee	19	24	29	16	23	15	126
Fermentazioni spontanee con ≥ 1							
Ceppi di lieviti commerciali	0	2	1	11	9	2	25
Ceppi isolati	570	720	870	480	690	450	3780
Ceppi di lieviti commerciali	0	15*	1	206	54+18*	2	296
% lieviti commerciali / num di ceppi isolati	0	2	0.1	43	10	0.5	7.8

*ceppi originari della stessa area

Tabella 2: Ceppi di lieviti trovati in ciascun vigneto durante i 3 anni

La caratterizzazione molecolare dei 2355 ceppi di *Saccharomyces* isolati porta alla identificazione di 296 ceppi con un profilo genetico simile a quello dei lieviti commerciali (tavola 2). Questi ceppi rappresentano il 7.8% della popolazione fermentante, la maggior parte dei quali (5.8%) è stata campionata nelle serie *post-vendemmia*. Siccome la fermentazione è stata utilizzata come fattore di arricchimento per i ceppi di *Saccharomyces*, dovrebbe essere evidenziato come i risultati attuali non permettano conclusioni circa il numero di ceppi presenti sulla superficie dell'uva (che è nello specifico molto basso). Invece, il numero di fermentazioni con almeno un ceppo di lievito commerciale dona una migliore rappresentazione di ciò che si verifica nel vigneto; ceppi di lieviti commerciali sono stati trovati nel 12% dei campioni.

I dati nel loro insieme riflettono situazioni molto differenti. In 4 vigneti, dove i siti di campionamento sono stati piazzati a grande distanza dallo stabilimento enologico (il vigneto F in Portogallo e i tre vigneti A B C in Francia), l'incidenza dei ceppi commerciali è stata molto bassa, rappresentando tra lo 0% e il 2% della popolazione fermentante identificando questi ceppi solo in 5 campioni (tavola 2). In Francia, il profilo genetico di 16 cloni su 735 isolati (2%) di *Saccharomyces* era identico a quello dei lieviti commerciali. Questi ceppi corrispondono allo 0.8% dei ceppi di lievito isolati dopo la fermentazione. Con una sola eccezione (15 su 16 isolati), questi ceppi avevano un profilo identico a quello del ceppo autoctono Lievito C e sono stati trovati in campioni prelevati nello stesso sito

(stabilimento enologico B), in *pre-vendemmia* nel 2001. Questo fatto potrebbe indicare una dispersione precedente che però non può essere confermata in quanto il ceppo di lievito commerciale di Lievito C era stato inizialmente isolato dalla stessa regione del sud della Francia dove è stato effettuato lo studio. Nel 2003 è stata isolata una colonia nello stabilimento enologico C, avente lo stesso profilo di Lievito B utilizzato nei tre stabilimenti enologici francesi negli ultimi 5 -15 anni. È degno di nota il fatto che questo lievito, ampiamente utilizzato per un considerevole periodo di tempo, non sia mai stato trovato nei vigneti ad eccezione di questo caso. Nello stabilimento enologico portoghese F sono stati trovati solo 2 ceppi con lo stesso profilo di lieviti commerciali usati su larga scala (Lievito A), in uso da 5 anni. I risultati sono stati molto differenti negli stabilimenti portoghesi D ed E nei quali è stato isolato un alto numero di ceppi commerciali, rappresentando rispettivamente il 43% e il 10% delle popolazioni di lieviti fermentanti.

Una panoramica sulla dispersione di ceppi commerciali in relazione alla distanza dallo stabilimento enologico è mostrata in figura 2. Il 94% dei ceppi commerciali è stato individuato nel raggio di circa 10-200 m e una larga maggioranza (78%) è stata individuata in siti molto prossimi (10 - 50 m) allo stabilimento enologico (vigneti D ed E). Una proporzione più alta è stata individuata nei campioni *post-vendemmia* (73%), indicando una diffusione diretta.

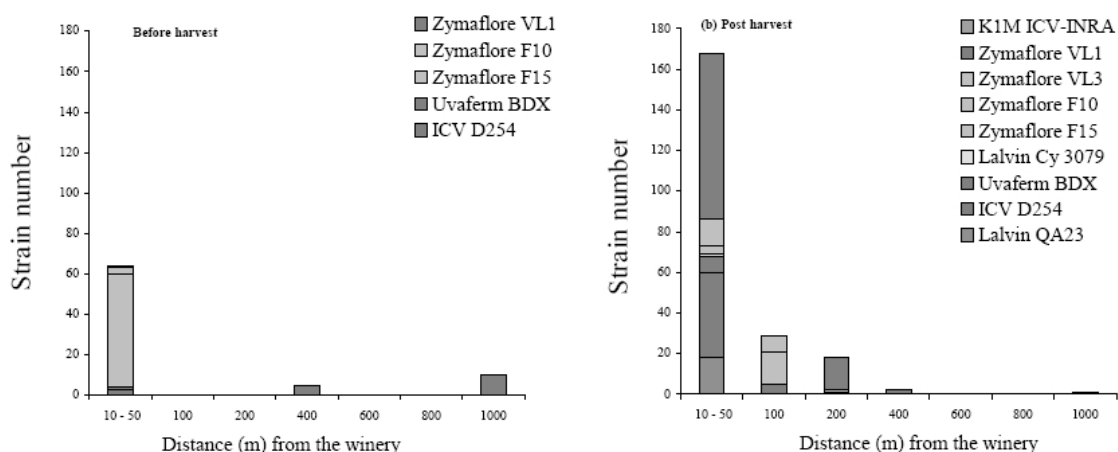


Figura 1: completa distribuzione (3 anni) dei ceppi di lievito commerciali in relazione alle distanze dallo stabilimento enologico nelle serie *pre-vendemmia* (a sinistra) e *post-vendemmia* (a destra)

L'evoluzione della comunità totale di lieviti, isolata dopo la fermentazione nei differenti stabilimenti di Francia e Portogallo durante i 3 anni di studio, è mostrata in figura 2. In larga maggioranza i ceppi commerciali sono stati trovati nei campioni *post-vendemmia*, indicando una disseminazione diretta (mostrato anche in figura 1). I 296 ceppi raccolti avevano un profilo genetico uguale solo a 9 ceppi commerciali di lievito, su un totale di 34 ceppi utilizzati nei 6 stabilimenti. Nonostante i lieviti industriali più comunemente utilizzati negli stabilimenti enologici siano stati trovati in grande abbondanza nel vigneto, non è stata evidenziata alcuna stretta correlazione tra il livello di utilizzazione e l'incidenza della diffusione. Per esempio il ceppo Lievito B era il più largamente utilizzato nei tre stabilimenti francesi e solo un isolato su una totalità di 2160 isolati in Francia condivideva un identico modello genetico con questo ceppo.

Nel suo insieme, l'evoluzione della popolazione fermentante di lieviti, durante i tre anni di studio, ha mostrato come gli stessi ceppi non siano stati trovati negli stessi luoghi da un anno con l'altro. Questo indica che, nonostante alcuni di questi ceppi siano riusciti a sopravvivere nell'ecosistema, come suggerito dalla presenza di lieviti commerciali nei campioni prelevati nel 2001 in Portogallo in *pre-vendemmia*, essi non siano capaci di sovrastare le popolazioni indigene di lieviti nei vigneti. Per esempio, nel 2001 sono stati trovati 5 differenti ceppi di lievito commerciale nella serie *pre-vendemmia* dello stabilimento enologico D, vale a dire i ceppi usati in modo predominante dal 1998 al 2000 (Lievito A, Lievito D, Lievito E ed in minori quantità Lievito F e Lievito C), mostrando così la loro

sopravvivenza nel vigneto da un anno all'altro. Comunque, dato che i due ultimi ceppi sono apparsi solo nel 2001, la loro permanenza è limitata.

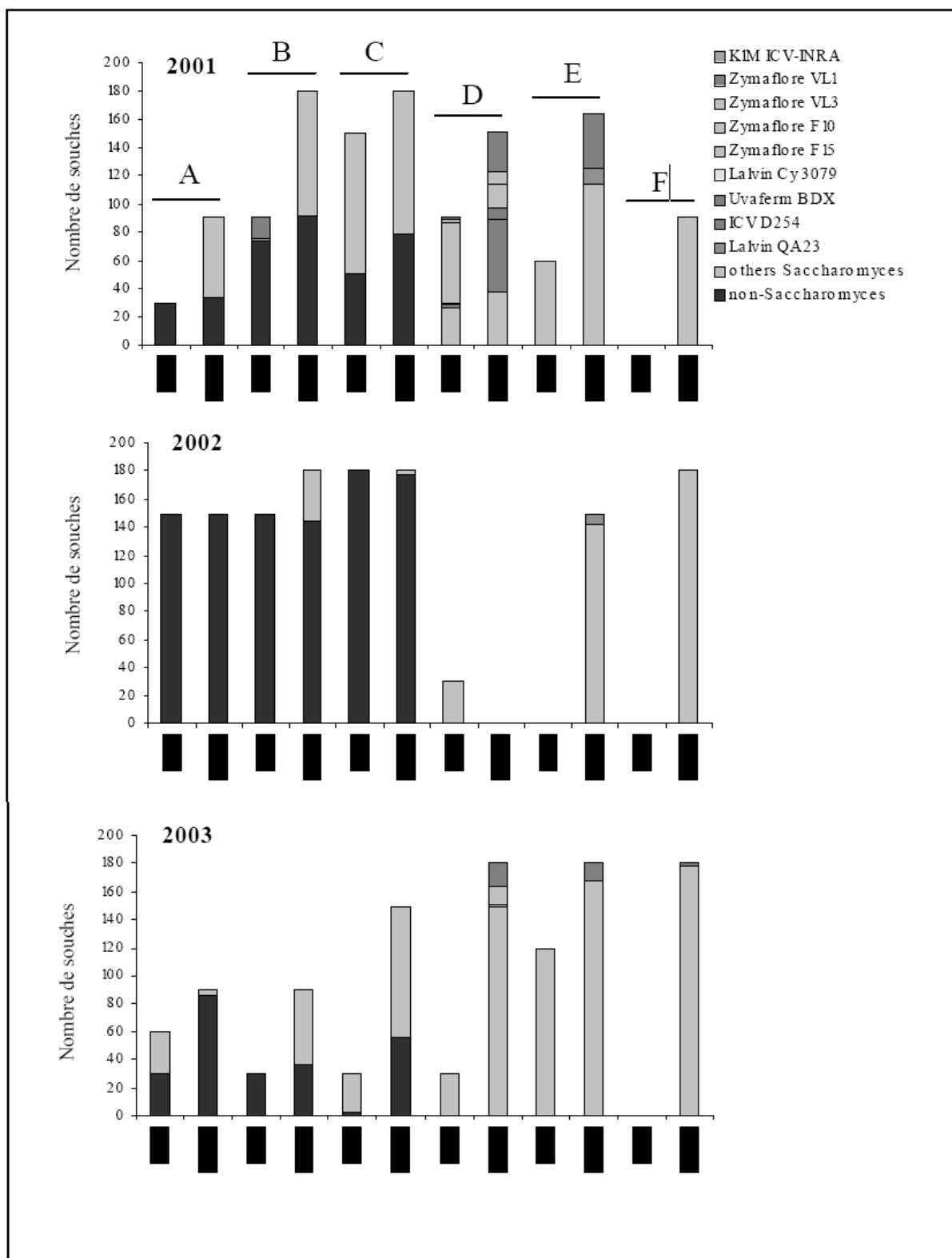


Figura 2: Evoluzione della popolazione totale di lieviti fermentanti da ciascuno degli stabilimenti (A,B,C,D,E,F) durante i tre anni nelle serie pre- e post-vendemmia.

Conclusione

Lo studio sistematico ha fornito nuovi strumenti per comprendere a fondo l'impatto dei lieviti commerciali sulle popolazioni di lieviti fermentanti che dimorano nei vigneti circostanti. La metodologia usata, basata sull'analisi della popolazione di lieviti dopo una fermentazione spontanea, ha permesso l'isolamento di un grande numero di ceppi enologici di *Saccharomyces*, presenti in piccole quantità sull'uva. È importante menzionare che, tra le 30 colonie analizzate per ciascuna fermentazione, il numero di profili genetici differenti variasse da 1 a 21, con una media di 5 differenti biotipi di *Saccharomyces* per campione (Schuller *et al*, 2005; dati non pubblicati), indicando in questo modo che il numero di colonie analizzate per campione fosse abbastanza alto per dimostrare l'iniziale biodiversità. Basandoci su questi dati abbiamo concluso che la dispersione di lieviti commerciali nel vigneto sia ristretta a brevi distanze ed a limitati periodi di tempo. Più del 90% dei lieviti commerciali è stato ritrovato in un raggio tra i 10 e i 200 m dallo stabilimento enologico e non si sono installati in modo sistematico nell'ambiente. La dispersione di ceppi commerciali sembra essere principalmente veicolata da fuoriuscite di acqua e si verifica anche nel luogo di scarico delle bucce d'uva macerate. All'interno dello stabilimento enologico, dato che sono utilizzati in grandi quantità, i ceppi commerciali tendono a sovrastare i ceppi autoctoni (Beltran *et al*, 2002). Al contrario essi non sembrano installarsi nel vigneto. Piuttosto mostrano una naturale fluttuazione con periodiche apparizioni e sparizioni proprio come i ceppi autoctoni. Considerando i ceppi di lieviti commerciali come un appropriato modello per quelli geneticamente modificati, i nostri dati contribuiscono anche alla valutazione profonda del rischio ambientale riguardante l'uso di tali ceppi nell'industria enologica.

Ringraziamenti

Questo articolo è stato adattato da una recente pubblicazione Valero *et al*, *FEMS Yeast Research*, 2005, *in press*. Questo studio è stato supportato dalla concessione n° 657 C2 dagli accordi di cooperazione tra l'Istituto Portoghese per la Cooperazione Internazionale Scientifica e Tecnologica e l'ambasciata francese a Lisbona e l'Associazione Marie Curie del programma della Comunità Europea di Qualità della Vita sotto il contratto QLK4-CT-2001-51873. Gli autori vorrebbero ringraziare D. Delteil dall'ICV-Montpellier per il suo aiuto nella scelta dei siti di campionamento in Francia, gli enologi delle aziende enologiche portoghesi (R. Cunha, A. Mendes, E. Rodrigues and J. Domingues) così come gli enologi (B. Agay, E. Feneuil and E. Bru) e i direttori (J. L. Refle, J. Combette and R. Bruno) delle aziende enologiche francesi per aver facilitato le serie di campionamenti nei vigneti.

Bibliografia

- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year followup study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.
- Blondin, B. and Vezinhet, F. 1988. Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champs pulsés. *Rev. Fr. Oenol.* 28:7-11.
- Frezier, V. and Dubourdiou, D. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:375-380.
- Gallego, F.J., Perez, M.A., Martinez, I. and Hidalgo, P. 1998. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:350-351.
- González Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M., and Gaggero, C. 2001. Differentiation of industrial yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:71-75.
- Guillamón, J.M., Bairro, E. and Querol, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers; relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *System. Appl. Microbiol.* 19:122-132.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C. and Dujon, B. 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:551-559.
- Legras, J.L. and Karst, F. (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:249-255.
- López, V., Querol, A., Ramón, D. and Fernández-Espinar, M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68:75-81.

- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., and L. Dulau. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62: 89-94.
- Pérez, M.A., Gallego, F.J., Martínez, I. and Hidalgo, P. 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 461-466.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231:19-26.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. and Casal, M. (2005) Ecological survey of *Saccharomyces* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:167-177.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M and Dequin, S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large scale, three years study. *FEMS Yeast research.* *In press.*
- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., Khan, W. and Pretorius, I.S. 2000a. Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:10-16.
- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. 2000b. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:3-9.
- Vezhinet, F., Hallet, J-N., Valade, M., Poulard, A. (1992): Ecological survey of yeast strains by molecular methods of identification. *Am J. Enol. Vitic.* 43:83-86.