

La selezione dei lieviti autoctoni di cantina e il loro impiego in vinificazione (Vendemmia 2024)

Relatore:
Eleonora Mari
DAGRI

Università degli Studi di Firenze

29 Aprile 2025

PROGETTO SOTTOMISURA 16.2
PSR 2014-2022 della Regione Toscana

Titolo progetto:
Selezione di lieviti autoctoni per la
produzione di vini passiti



Regione Toscana





Az.4. LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

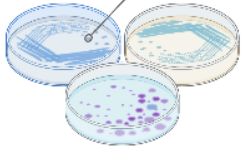
SELEZIONE CLONALE

EVOLUZIONE ADATTATIVA

SELEZIONE CLONALE



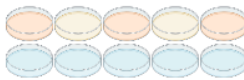
Isolamento di lieviti dalle uve in appassimento e dalle fermentazioni spontanee



Ottenimento di colture pure



Identificazione di isolati e caratterizzazione genotipica a livello di ceppo



Caratterizzazione fenotipica:

-Screening su piastra per resistenza a elevate concentrazioni di rame e zuccheri



-Prove su scala di laboratorio simulando le condizioni ambientali ritrovabili in "vinsantaia"

RISULTATO



Selezione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*.

Evoluzione adattativa

Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ottenuti da selezione clonale

Evoluzione adattativa in brodo di coltura contenente concentrazioni di zucchero e rame crescenti.



RISULTATO

Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* resistenti ad alte concentrazioni di zucchero e rame.



Solamente i ceppi che mostrano adattamento e conseguente crescita vengono inoculati nel terreno di coltura ancora più selettivo

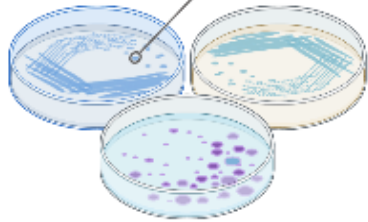
LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

SELEZIONE CLONALE

SELEZIONE
CLONALE



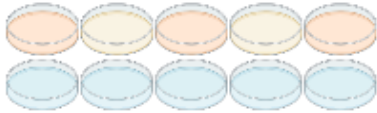
Isolamento di lieviti dalle uve in appassimento e dalle fermentazioni spontanee



Ottenimento di colture pure



Identificazione di isolati e caratterizzazione genotipica a livello di ceppo



Caratterizzazione fenotipica:

-Screening su piastra per resistenza a elevate concentrazioni di rame e zuccheri



-Prove su scala di laboratorio simulando le condizioni ambientali ritrovabili in "vinsantaia"

RISULTATO

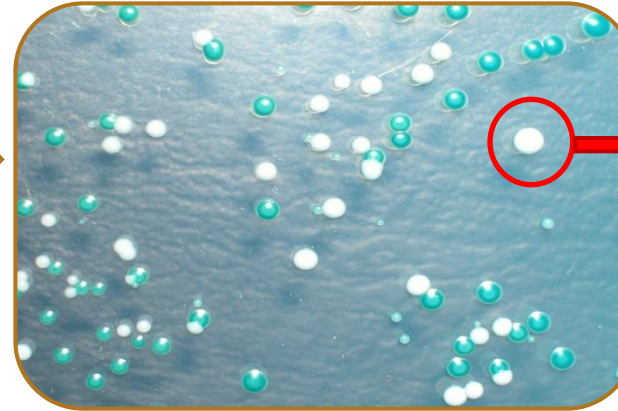
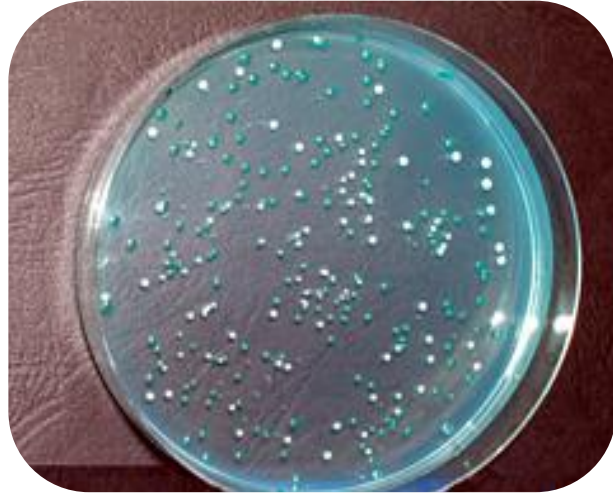


Selezione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*.

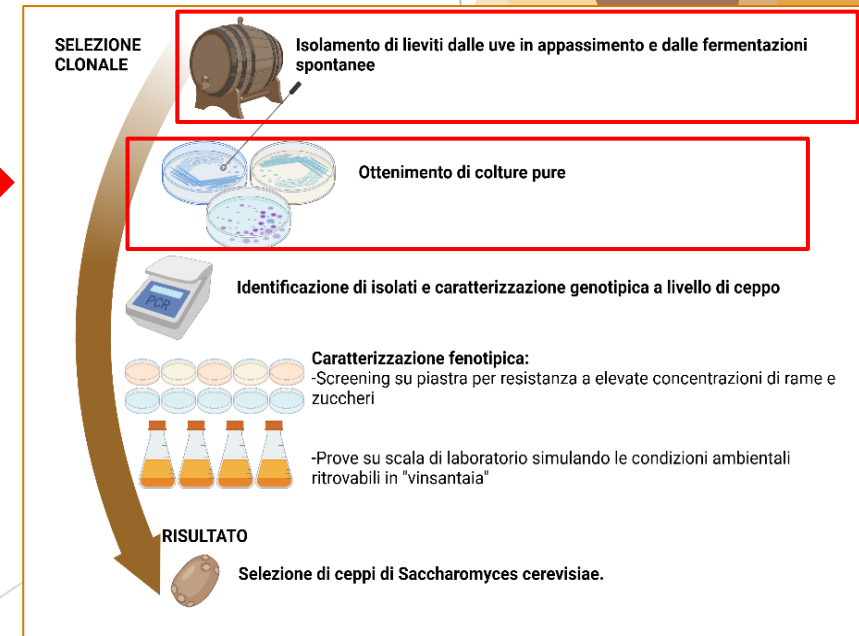
Caratterizzazione ceppi
di *Saccharomyces*
cerevisiae

CARATTERIZZAZIONE CEPPI *Saccharomyces cerevisiae*

Isolamento e purificazione colonie di *Saccharomyces cerevisiae*



Strisci in piastra per ottenere colonie pure



Identificazione degli isolati di *S. cerevisiae* e caratterizzazione genotipica a livello di ceppo

FASI :

- Identificazione alla specie
- Caratterizzazione al ceppo

Estrazione DNA

Amplificazione della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA

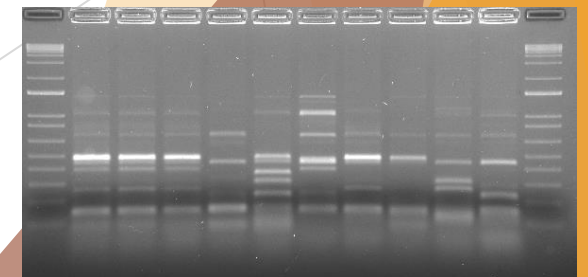
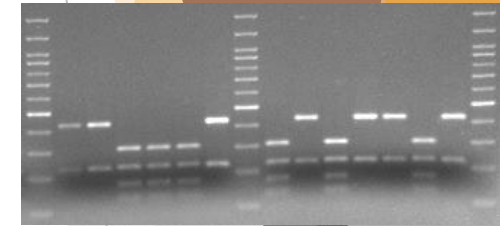
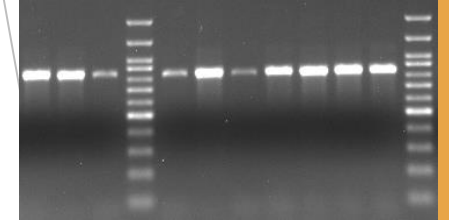
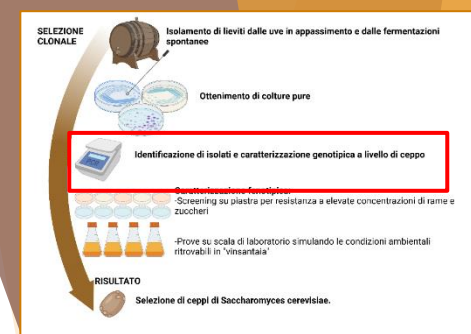
Digestione dell'amplicone ottenuto con enzimi di restrizione

Amplificazione delle regioni inter δ del DNA

Profili genetici diversi = CEPPI DIVERSI



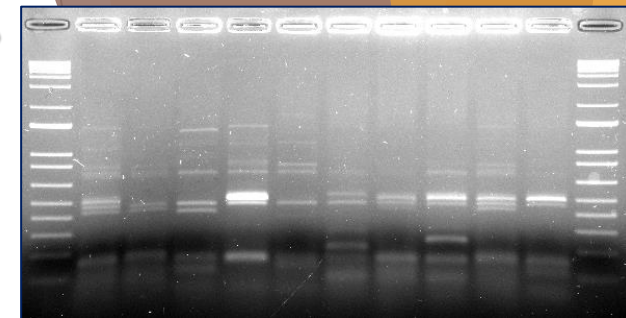
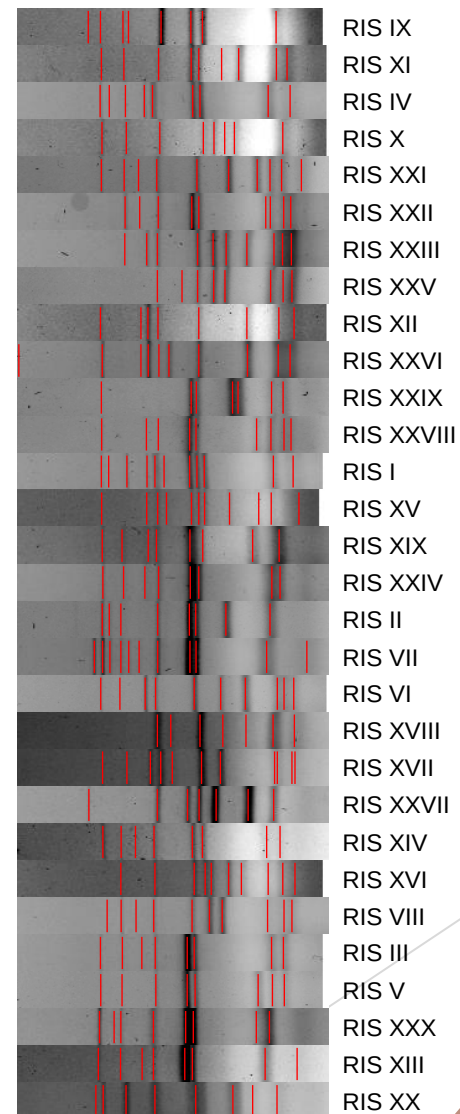
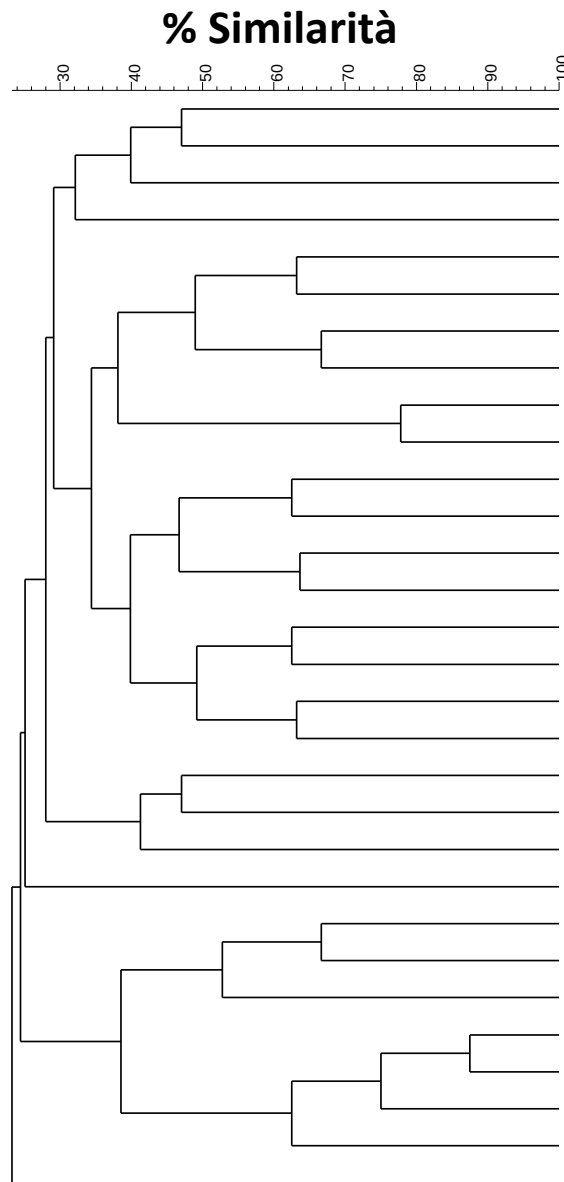
Analisi
molecolari

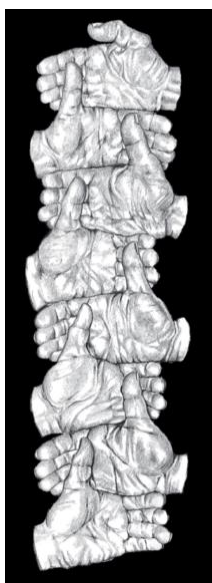


CARATTERIZZAZIONE CEPPI *Saccharomyces cerevisiae*

Vendemmia 2023

ceppo	% isolamento
Ris I	24
Ris II	1,5
Ris III	21
Ris IV	10
Ris V	4
Ris VI	1,5
Ris VII	1
Ris VIII	10
Ris IX	1
Ris X	1
Ris XI	4
Ris XII	2
Ris XIII	2
Ris XIV	1
Ris XV	1
Ris XVI	1
Ris XVII	1
Ris XVIII	1
Ris XIX	1
Ris XX	1
Ris XXI	1
Ris XXII	1
Ris XXIII	1
Ris XXIV	1
Ris XXV	1
Ris XXVI	1
Ris XXVII	1
Ris XXVIII	1
Ris XXIX	1
Ris XXX	1

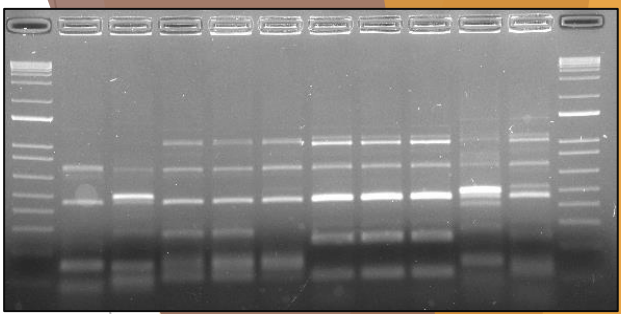
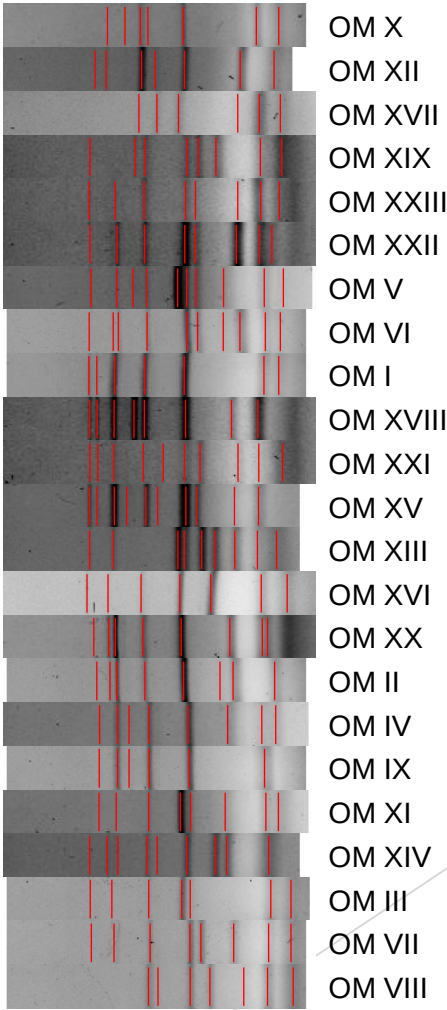
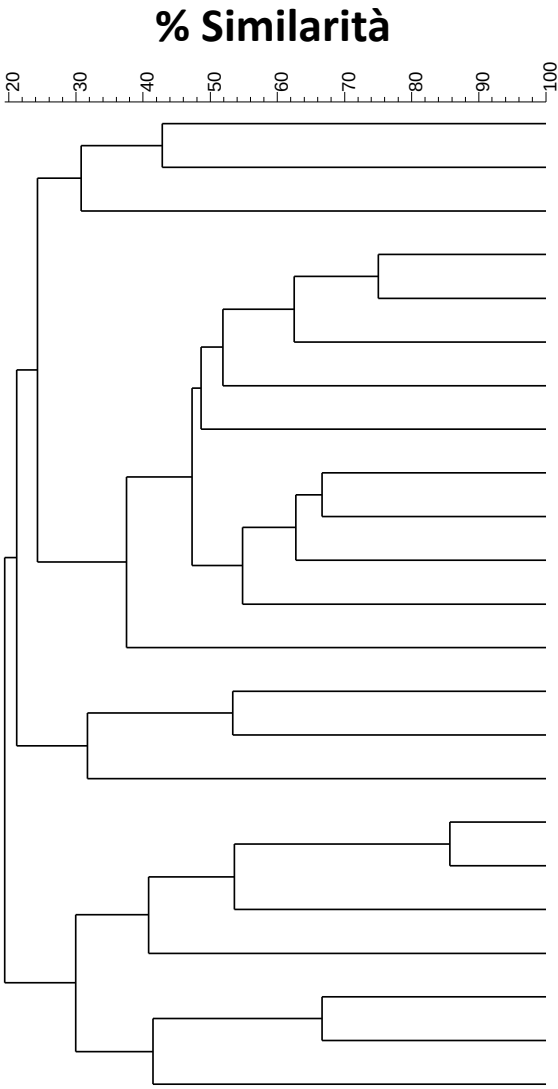




CARATTERIZZAZIONE CEPPI *Saccharomyces cerevisiae*

- Vendemmia 2023

ceppo	% isolamento
OM I	10
OM II	22
OM III	14,5
OM IV	6
OM V	13,5
OM VI	4
OM VII	2
OM VIII	2
OM IX	1
OM X	10
OM XI	2
OM XII	2
OM XIII	1
OM XIV	1
OM XV	1
OM XVI	1
OM XVII	1
OM XVIII	1
OM XIX	1
OM XX	1
OM XXI	1
OM XXII	1
OM XXIII	1



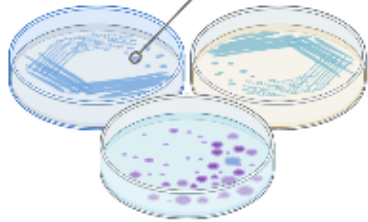
LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

SELEZIONE CLONALE

SELEZIONE
CLONALE



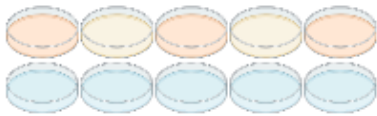
Isolamento di lieviti dalle uve in appassimento e dalle fermentazioni spontanee



Ottenimento di colture pure



Identificazione di isolati e caratterizzazione genotipica a livello di ceppo



Caratterizzazione fenotipica:

-Screening su piastra per resistenza a elevate concentrazioni di rame e zuccheri



-Prove su scala di laboratorio simulando le condizioni ambientali ritrovabili in "vinsantaia"

RISULTATO



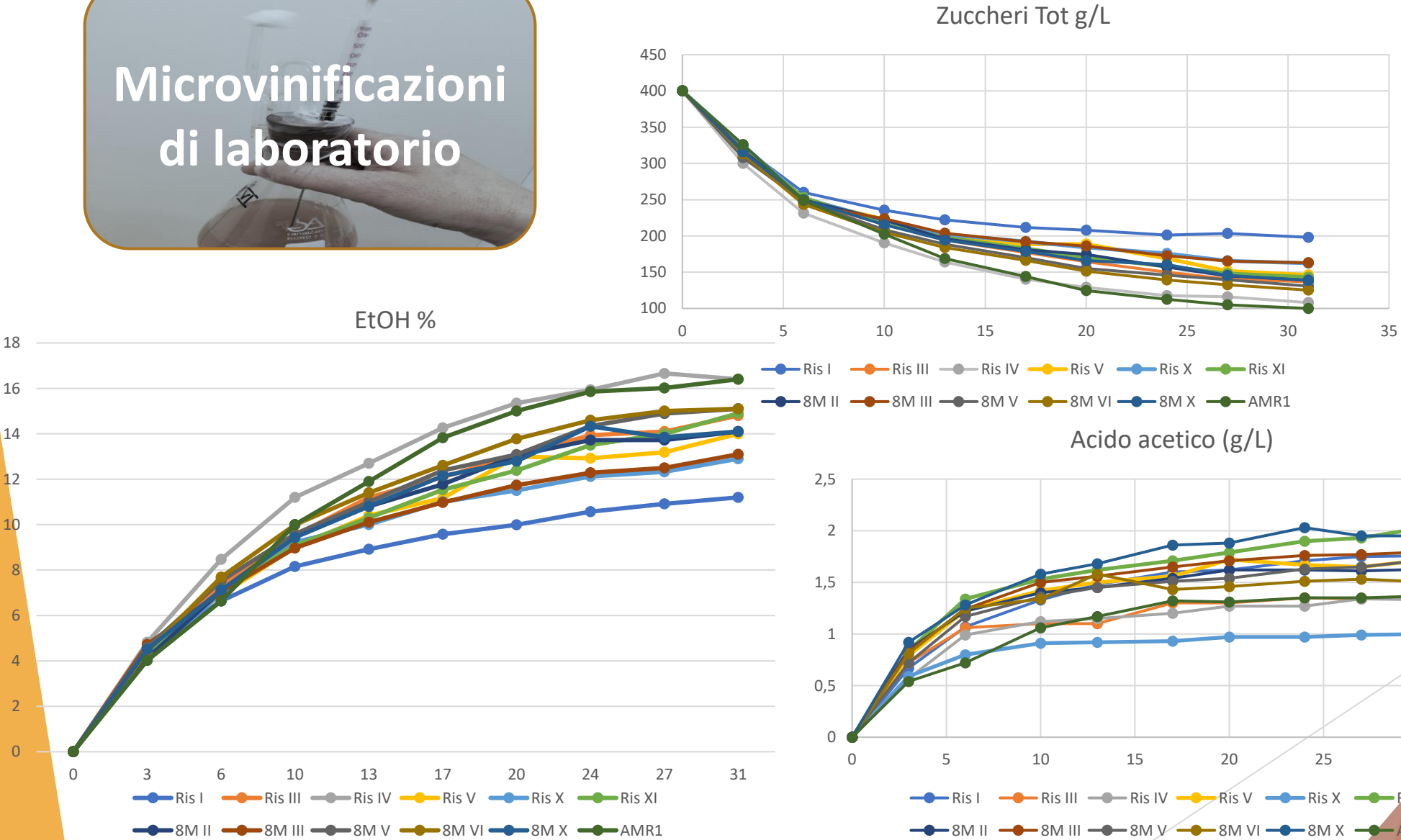
Selezione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*.

- 6 ceppi per l'azienda Rissecoli
- 5 ceppi per l'azienda Ottomani
- 1 starter commerciale di *S.cerevisiae* indicato per fermentazioni con zuccheri elevati

**Caratterizzazione
fenotipica dei ceppi di
*Saccharomyces
cerevisiae***

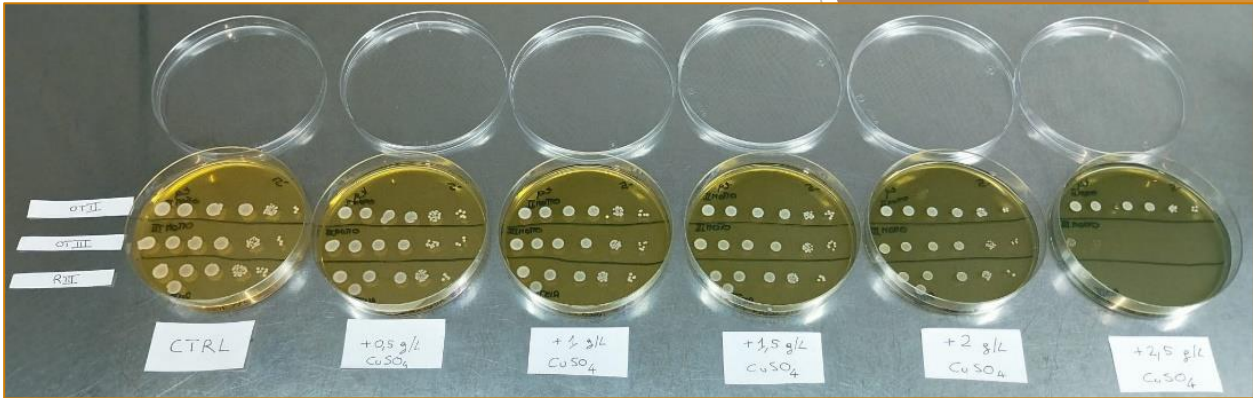
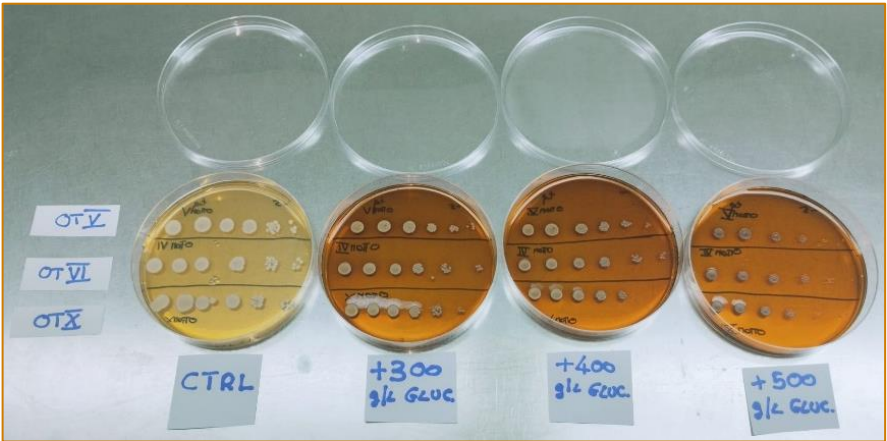
Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

- Valutazione delle capacità fenotipiche e tecnologiche in micro-vinificazioni su mosto di uve appassite



Scelta di ceppi con le capacità tecnologiche e qualitative desiderate.

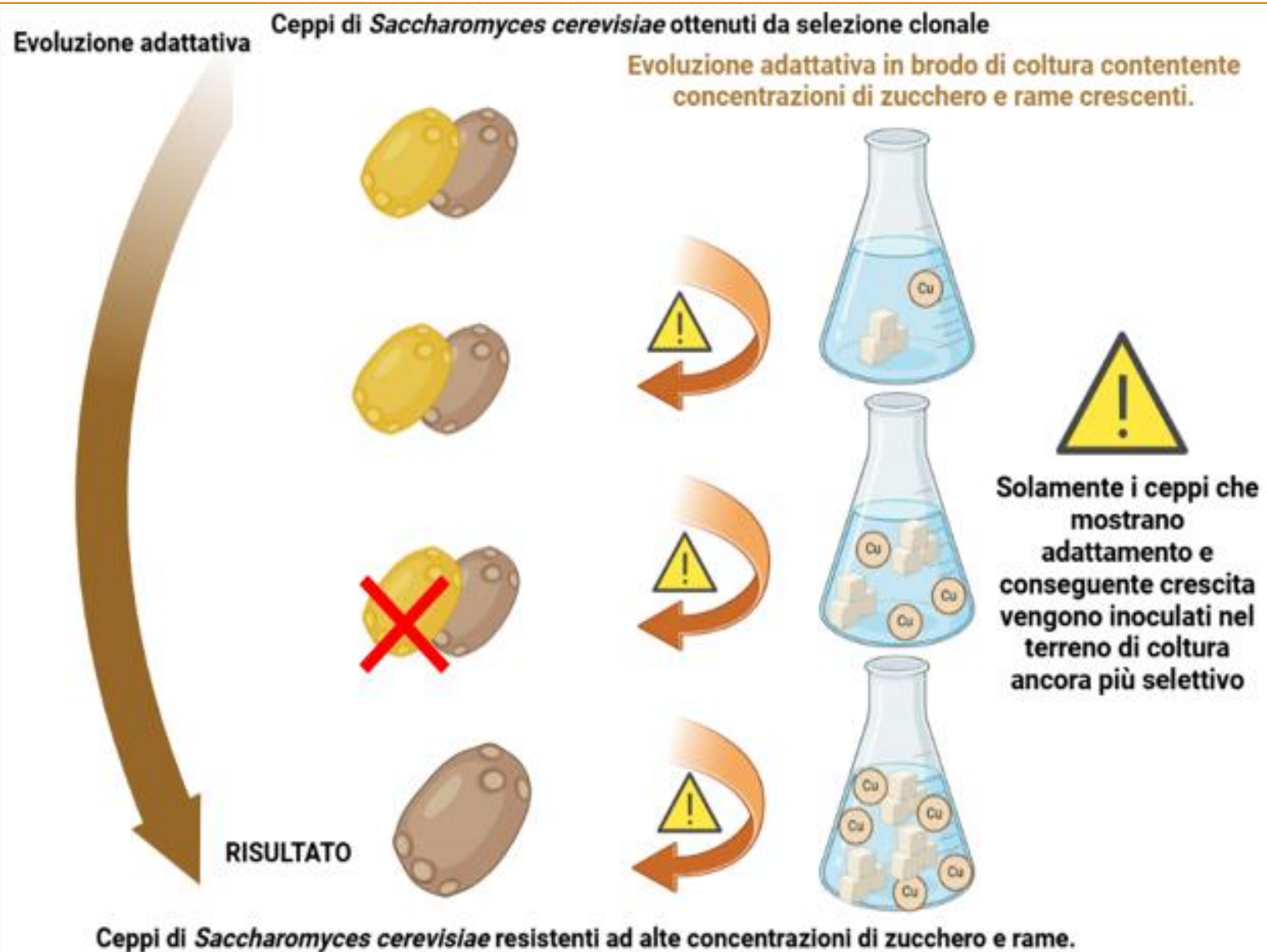
- Saggi in piastra:
 - resistenza al rame
 - elevate concentrazioni di zuccheri



Ceppo	Ac acetico (g/L)	EtOH (%)	Purezza fermentativa	Zuccheri residui (g/L)	Screening CuSO ₄ (2.5g/L)	Screening Glucosio (500g/L)
Ris I	1.76	11.2	0.16	198.1	0	3
Ris III	1.38	14.8	0.09	136.7	1	6
Ris IV	1.33	16.4	0.08	108.1	0	4
Ris V	1.73	14	0.12	146.3	2	4
Ris X	1	12.9	0.08	162.4	6	4
Ris XI	2.05	14.9	0.14	143.2	6	4
8M II	1.63	14.1	0.12	139	6	6
8M III	1.8	13.1	0.14	163	1	6
8M V	1.73	15.1	0.11	130.8	6	6
8M VI	1.5	15.1	0.10	125.3	6	5
8M X	1.95	14.1	0.14	138.7	3	4
AMR 1	1.37	16.4	0.08	100	3	2

LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

SELEZIONE ADATTATIVA

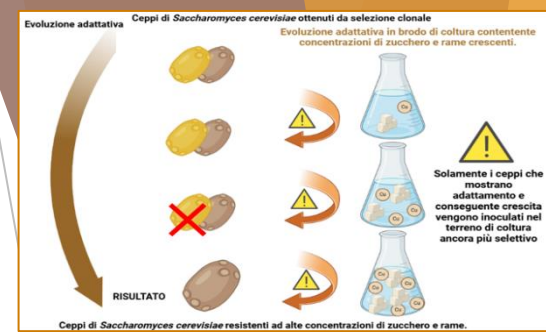


LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

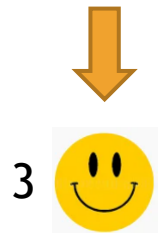
SELEZIONE ADATTATIVA

200g/L zuccheri e 1 g/L CuSO_4

5 repliche per ciascun ceppo



Ris III



Ris IV



300g/L zuccheri e 1,5 g/L CuSO_4



400g/L zuccheri e 2 g/L CuSO_4

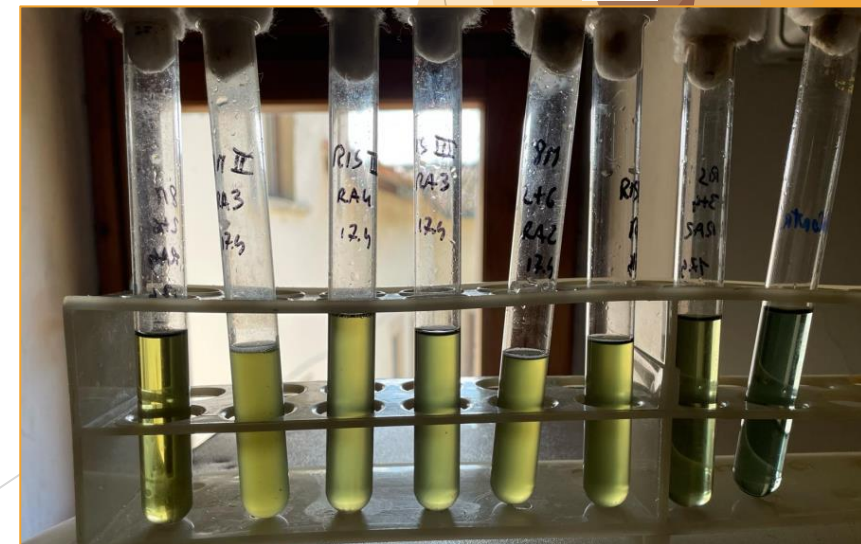
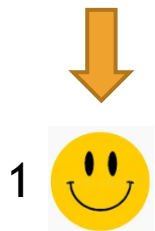
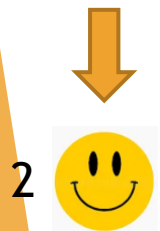
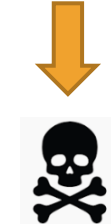


500g/L zuccheri e 2,5 g/L CuSO_4

OM II

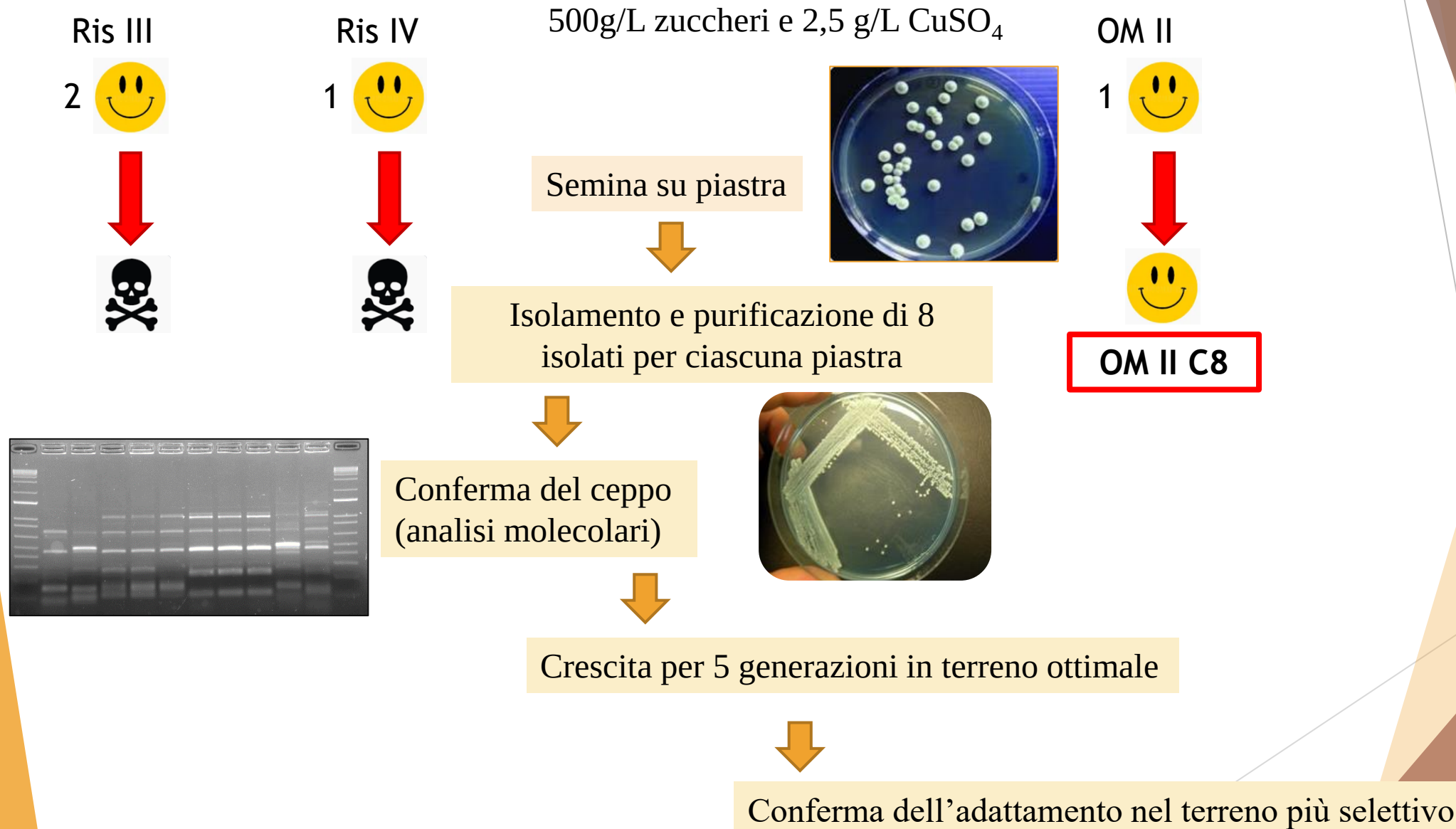


OM VI



LA SELEZIONE DEI LIEVITI AUTOCTONI

SELEZIONE ADATTATIVA



Microvinificazioni di laboratorio

- Valutazione delle capacità fenotipiche e tecnologiche dei ceppi adattati (W e NA) in micro-vinificazioni su mosto di uve appassite

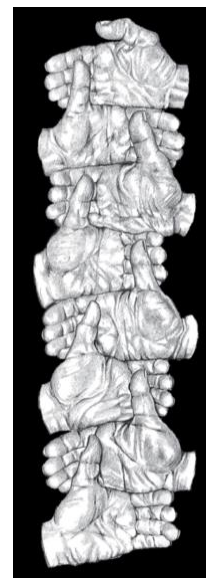


Wild Ris III

Wild Ris III +
Zygosaccharomyces rouxii

Natural adapted
Ris III

Natural adapted Ris III +
Zygosaccharomyces rouxii



Wild OM II

Adapted
OM II C8

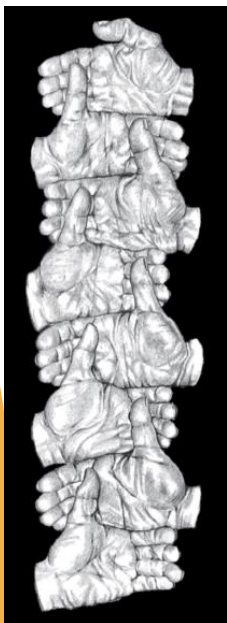
Scelta: Ris III (W) + Z.rouxii



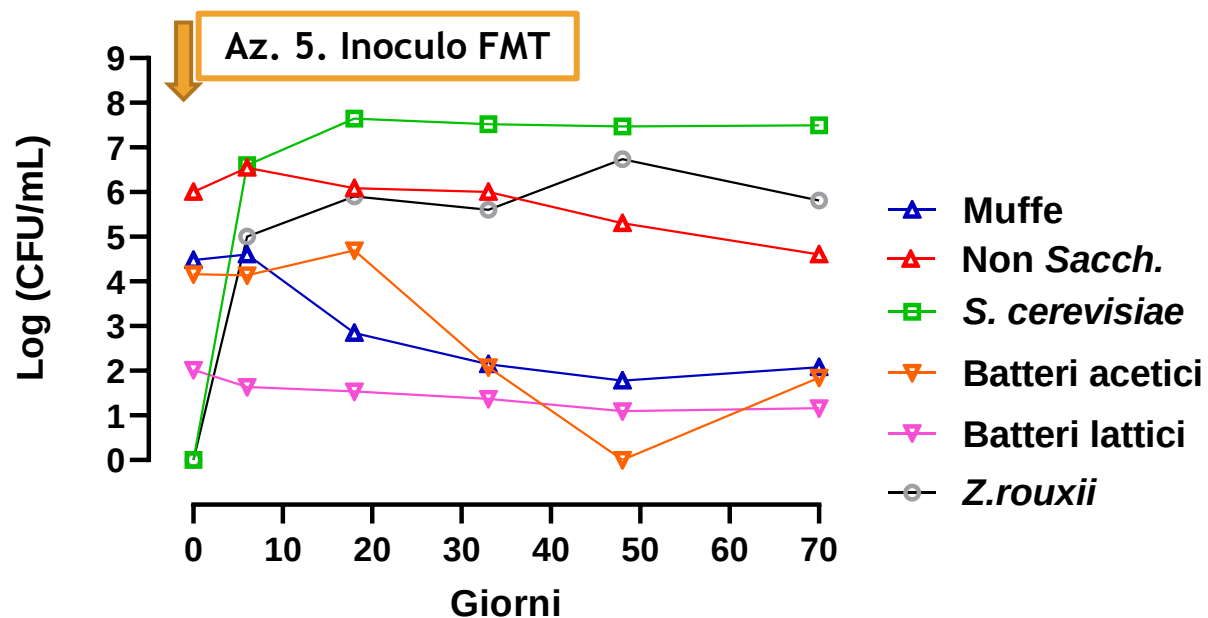
	Zuccheri residui (g/L)	ANOVA P <0.05	Ac.acetico (g/L)	ANOVA P <0.05	EtOH (%)	ANOVA P <0.05
Ris III (W)	110 ± 21	a	1,00 ± 0,1	a	15,85 ± 1,4	a
Ris III (NA)	113 ± 20	a	1,06 ± 0,05	a	15,6 ± 1,2	a
Ris III (W) + Z.rouxii	118,5 ± 19	a	0,80 ± 0	a	15,85 ± 0,7	a
Ris III (NA) + Z.rouxii	123 ± 15	a	0,85 ± 0,07	a	15,3 ± 0,7	a

	Zuccheri residui (g/L)	t-test P <0,05	Ac.acetico (g/L)	t-test P <0,05	EtOH (%)	t-test P <0,05
8M II (W)	137 ± 2,8	a	1,20 ± 0,1	a	14,20 ± 0,5	a
8M IIC8 (A)	118 ± 8,4	a	1,04 ± 0,0	a	15,55 ± 0,5	a

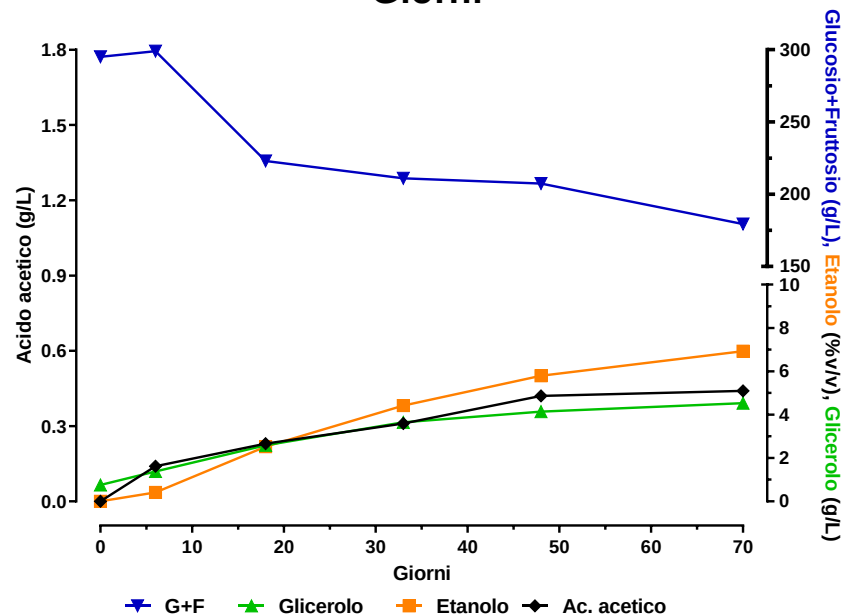
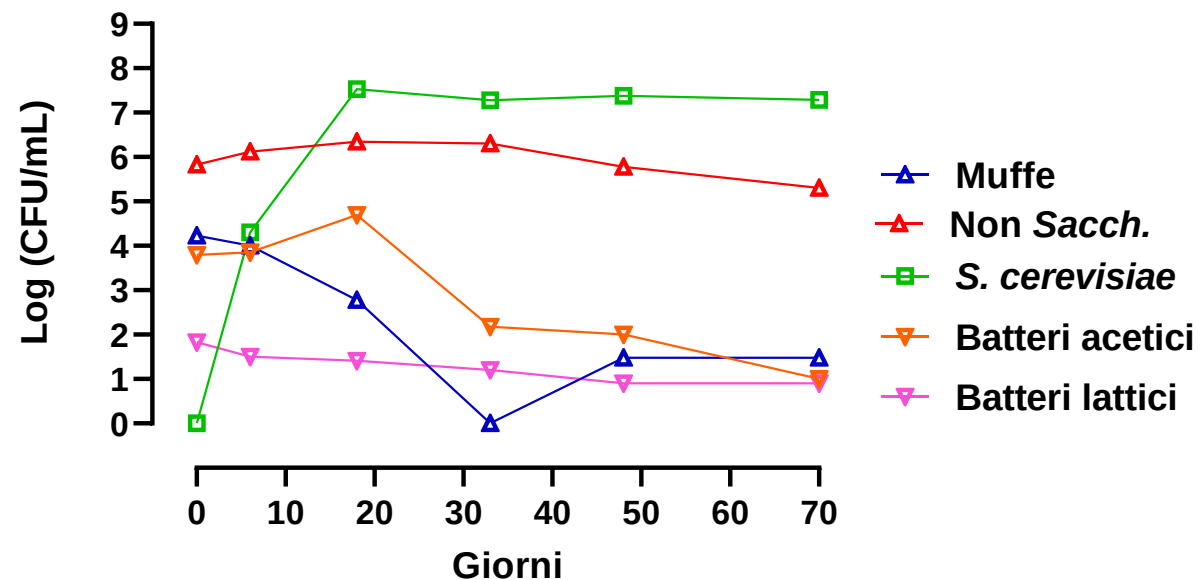
Scelta: 8M IIC8 (A)



Mosto Riseccoli Inoculato 100L

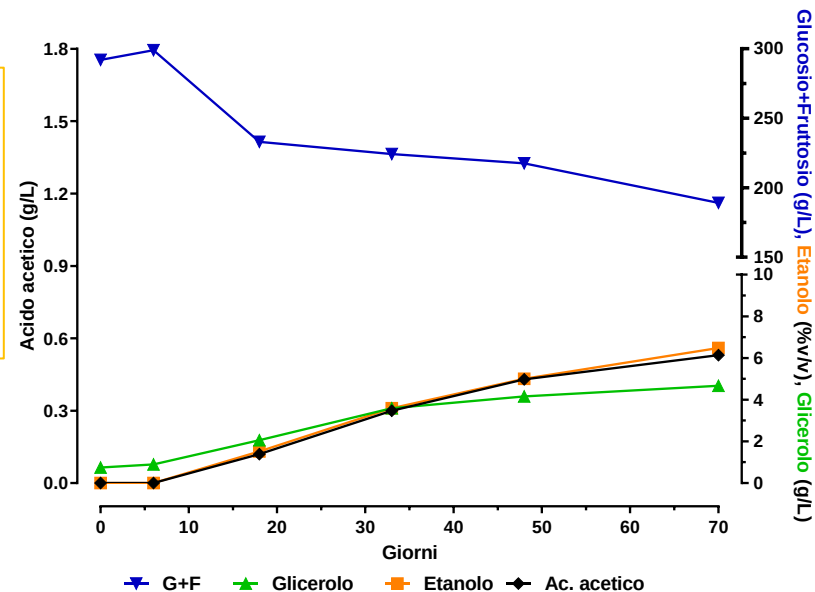


Mosto Riseccoli 100L



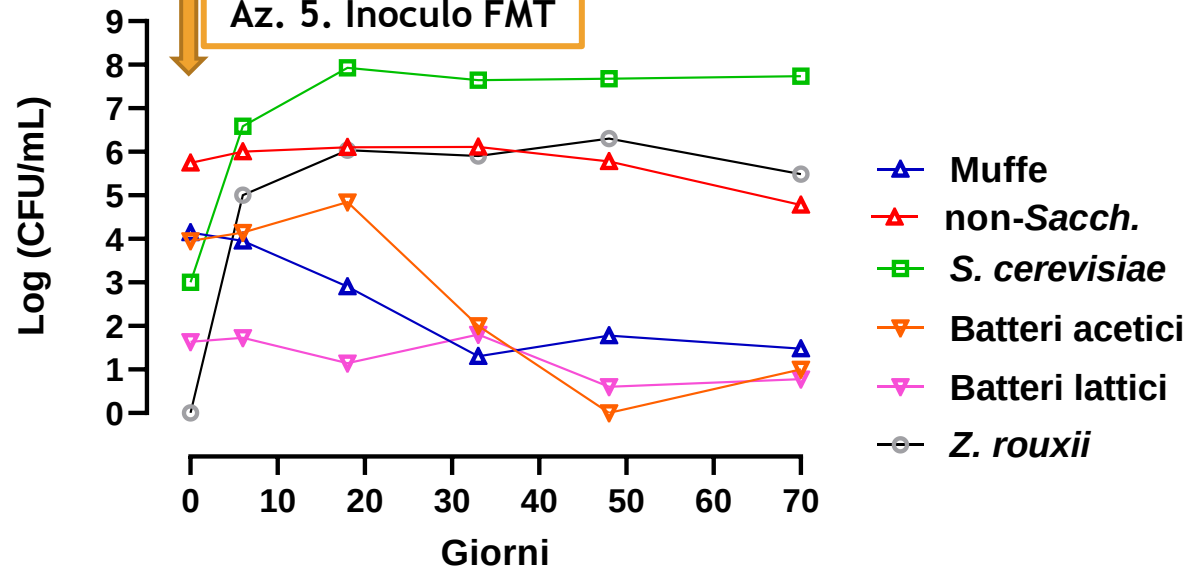
Botticella inoculata:

- Conc *S.cerevisiae* > 2 milioni dal 6° gg
- Presenza di *Z.rouxii*
- Maggior consumo di zuccheri

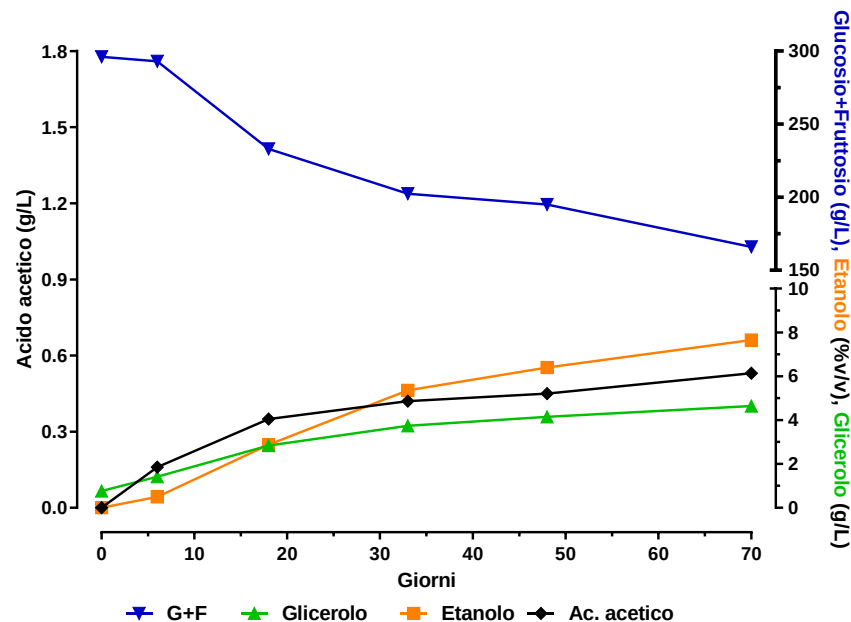
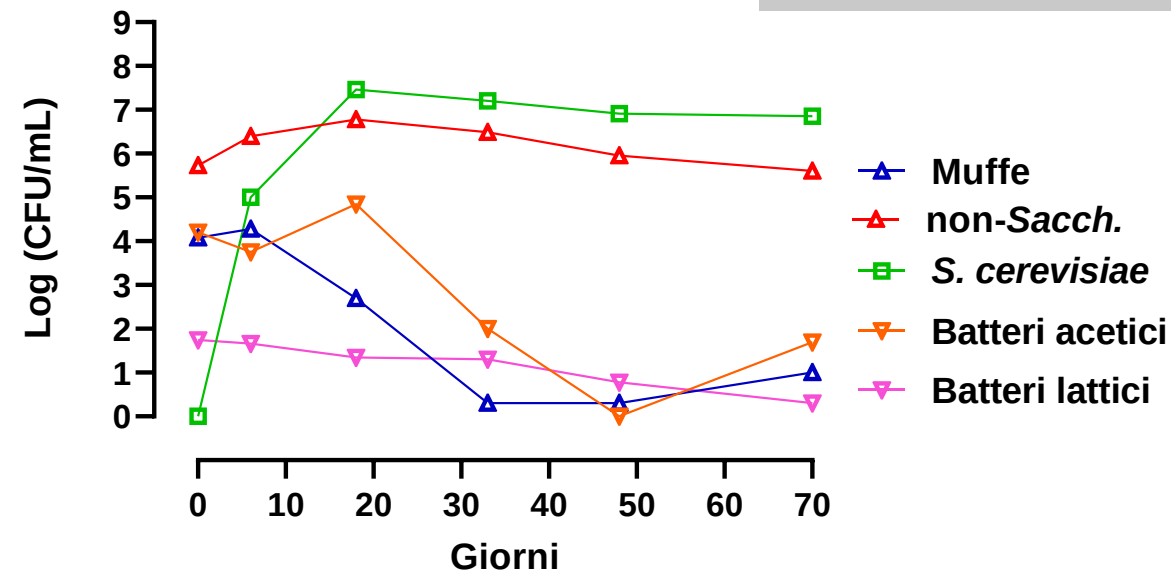


Mosto Riseccoli Inoculato 50L

Az. 5. Inoculo FMT

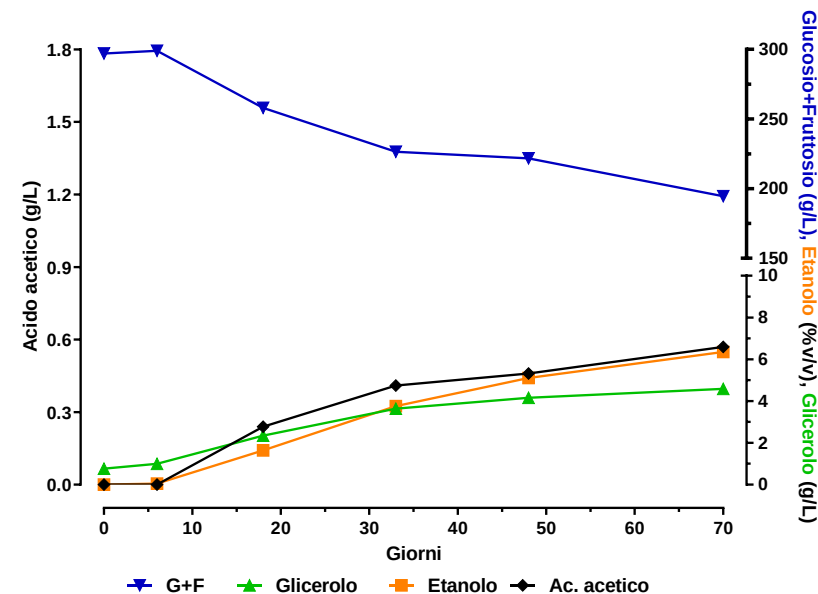


Mosto Riseccoli 50L



Botticella inoculata:

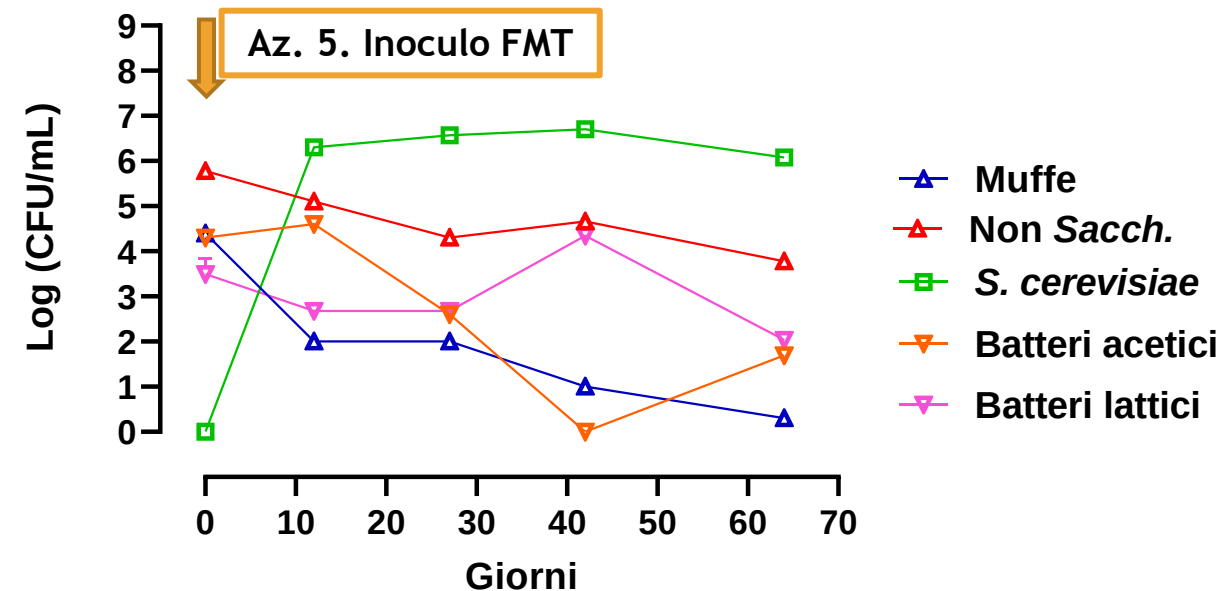
- Conc *S. cerevisiae* > 2 milioni dal 6° gg
- Presenza di *Z. rouxii*
- Maggior consumo di zuccheri



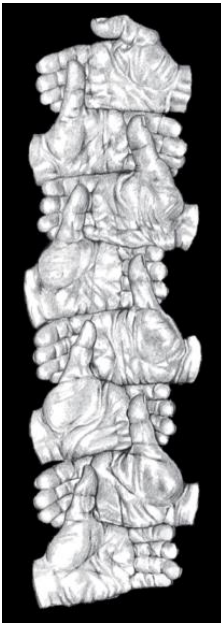
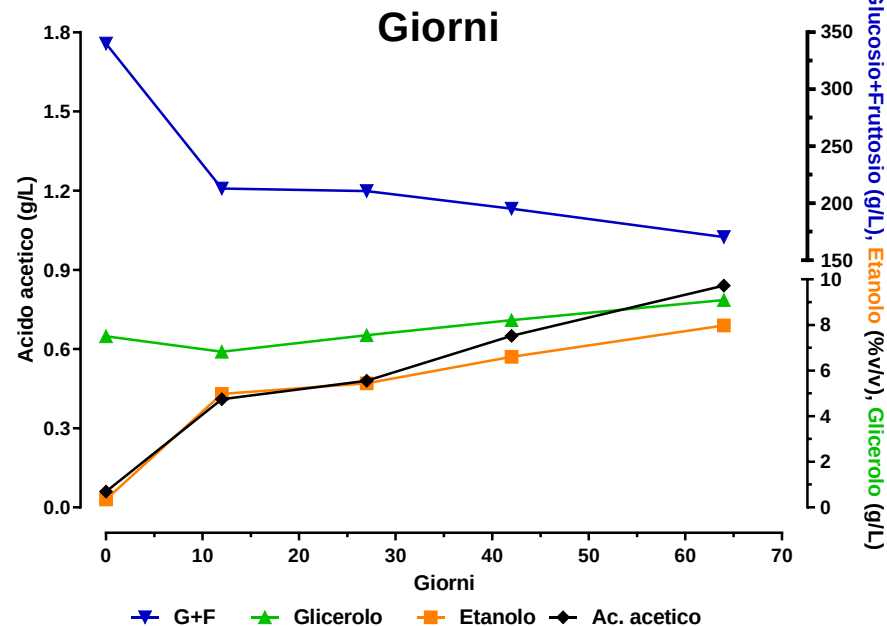
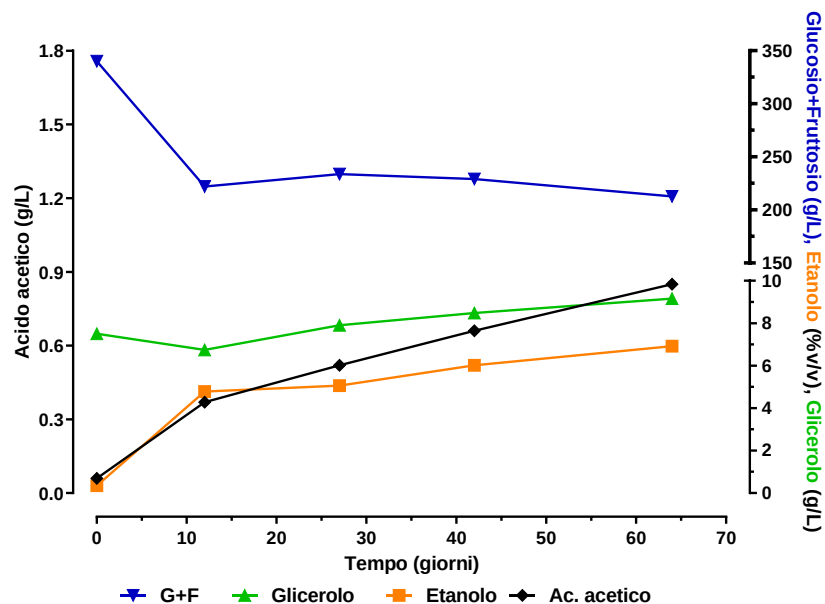
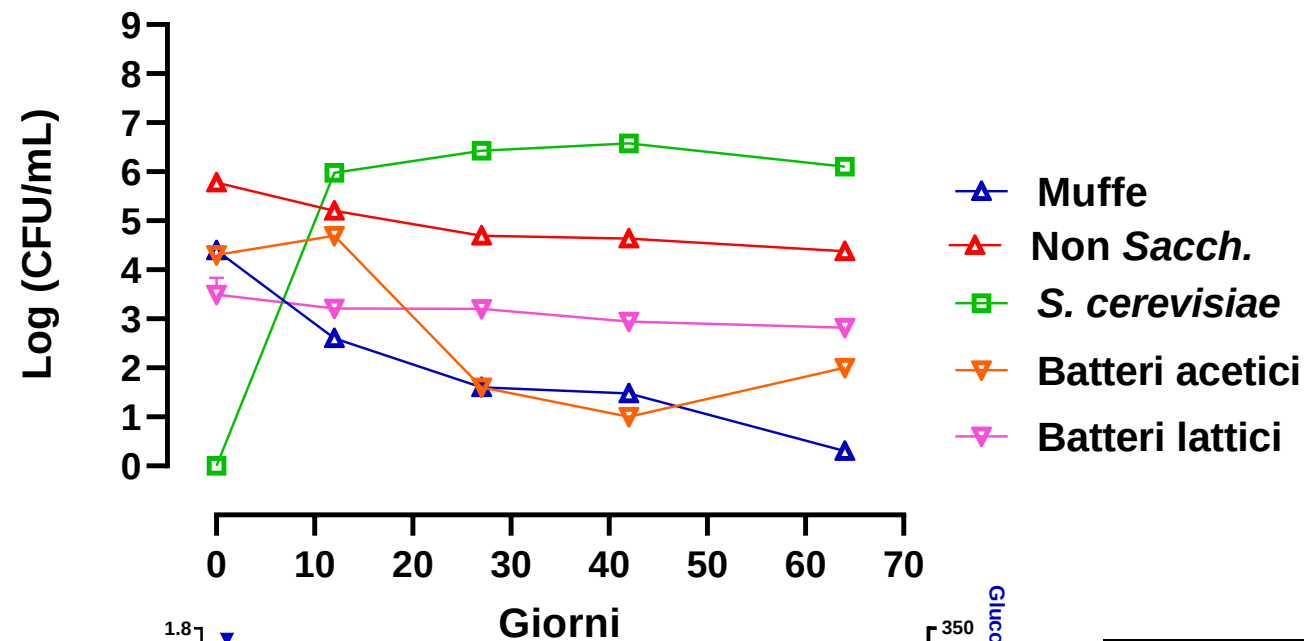
Az. 3.3 - Az. 3.4

VENDEMMIA 2024

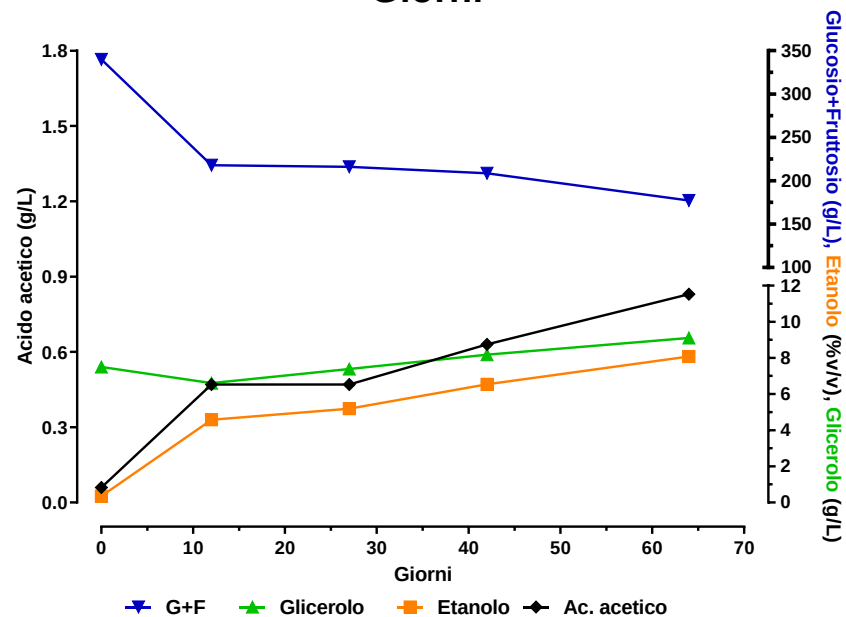
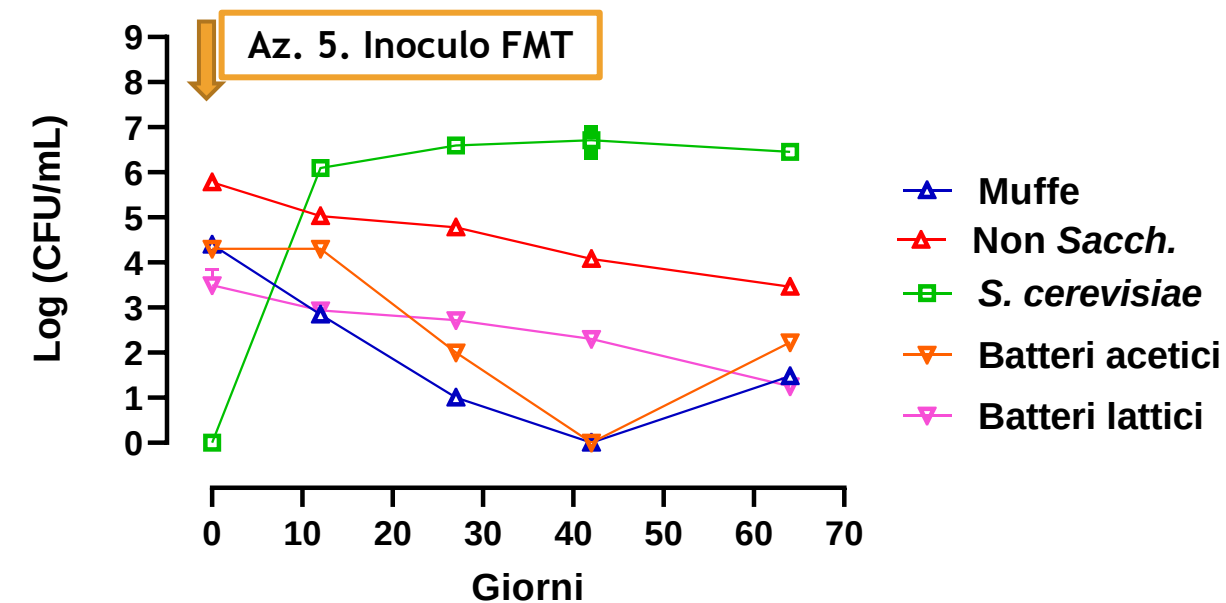
Mosto Ottomani Inoculato 100L



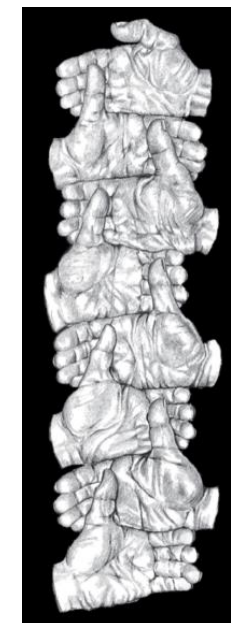
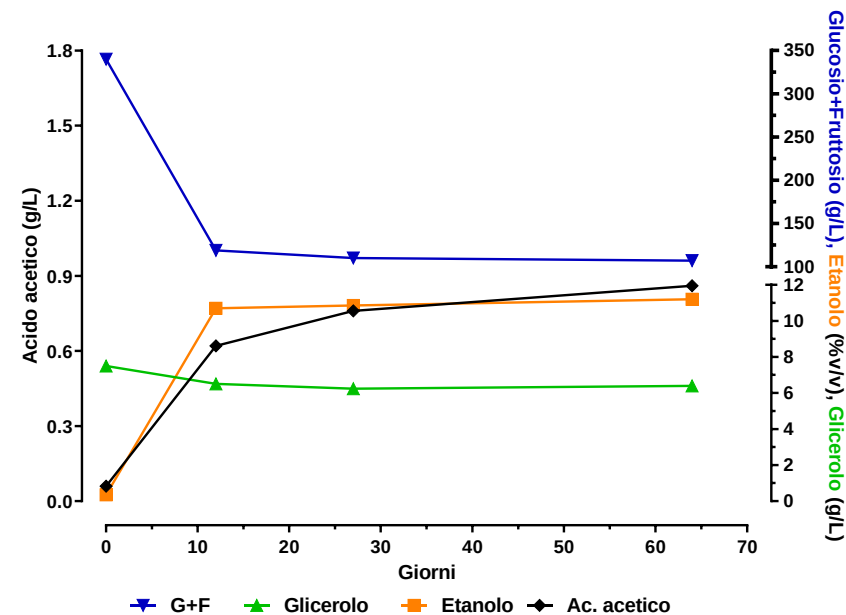
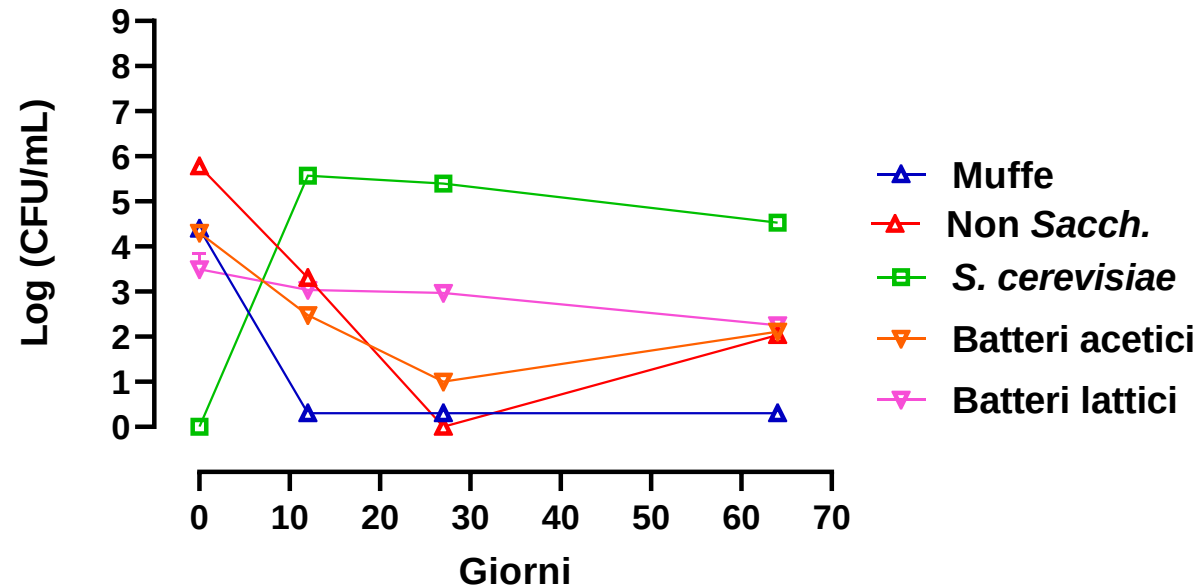
Mosto Ottomani 100L



Mosto Ottomani Inoculato 50L

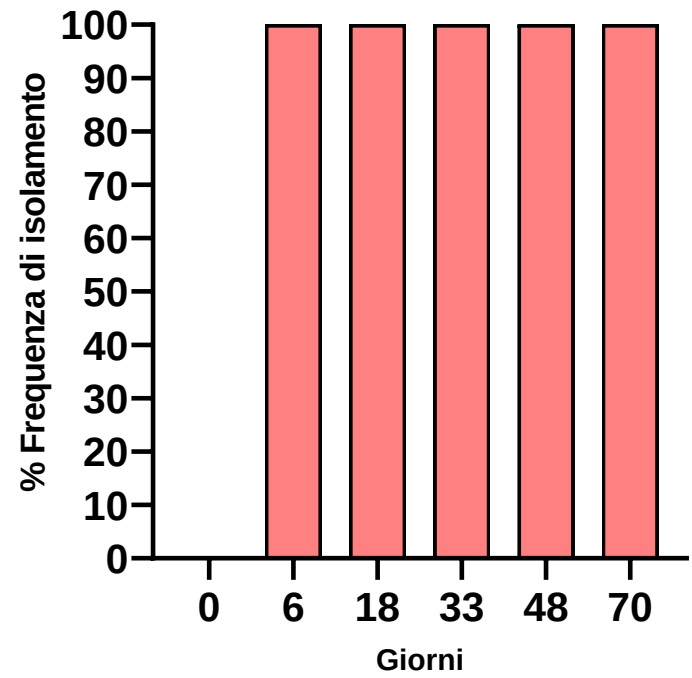


Mosto Ottomani 50L



Ceppi ricorrenti: 11
Ceppi 2024: 13

Mosto Risseccoli Inoculato 100L



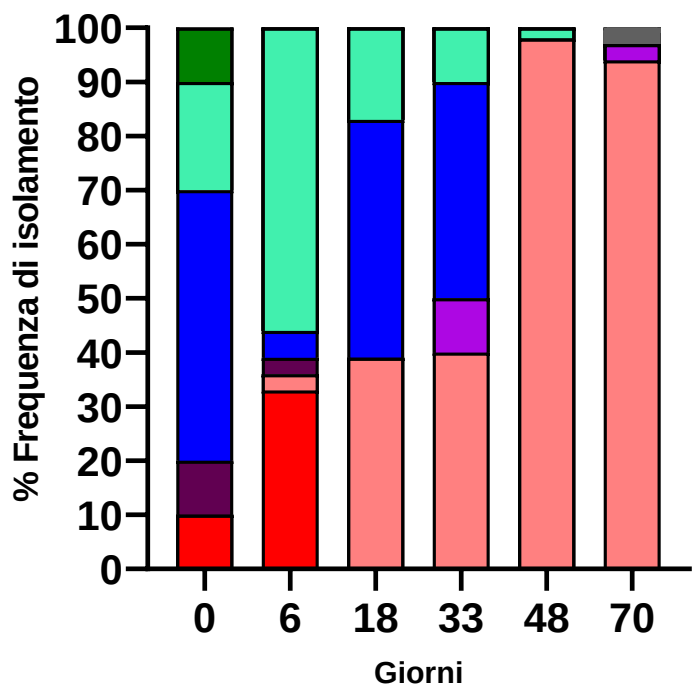
Ceppi *S.cerevisiae*

- | | |
|-----------|-------------|
| Ris XXXII | Ris XLIV |
| Ris XXXI | Ris XLIII |
| Ris XXX | Ris XLII |
| Ris XXVII | Ris XLI |
| Ris XXII | Ris XL |
| Ris XVIII | Ris XXXIX |
| Ris XI | Ris XXXVIII |
| Ris XIV | Ris XXXVII |
| Ris XII | Ris XXXVI |
| Ris V | Ris XXXV |
| Ris IV | Ris XXXIV |
| Ris III | Ris XVI |
| Ris I | Ris XXXIII |

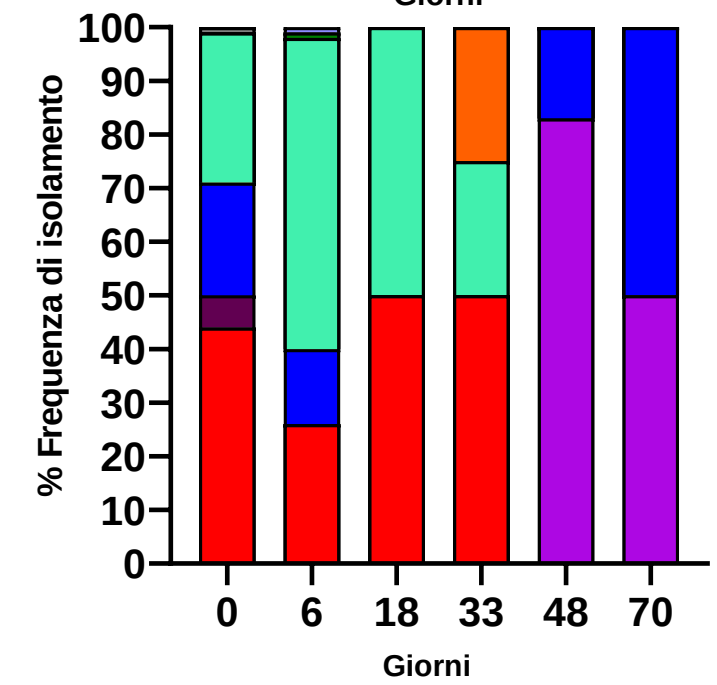
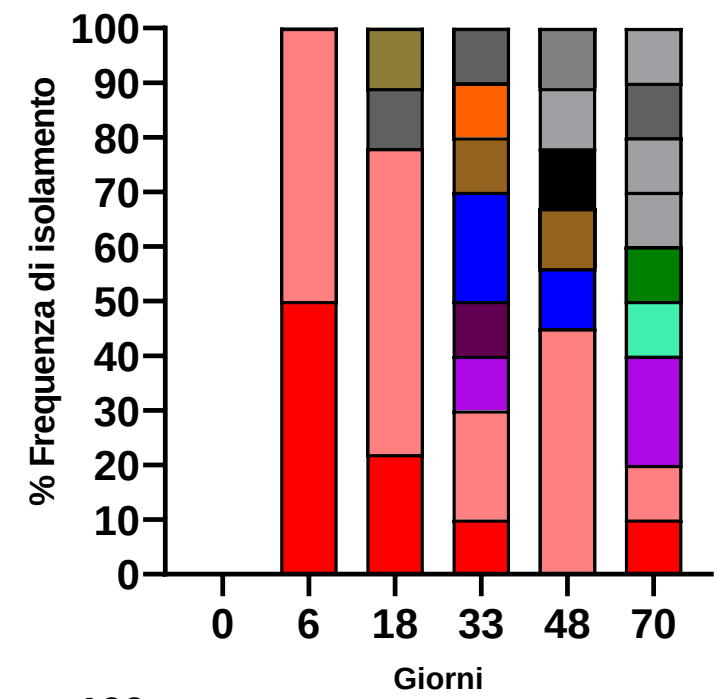


Specie non-Sacch.

- | |
|------------------------------|
| Zygosaccharomyces hellenicus |
| Pichia fermentans |
| Zygosaccharomyces bailii |
| Lachancea fermentati |
| Starmerella apicola |
| Pichia membranifaciens |
| Hanseniaspora valbyensis |
| Issatchentia terricola |
| Kloeckera apiculata |
| Starmerella bacillaris |
| Aureobasidium spp. |
| Hanseniaspora osmophila |
| Zygosaccharomyces rouxii |
| Metschnikowia pulcherrima |



Mosto Risseccoli 100L



Numero di geni di resistenza agli antibiotici	% Frequenza di isolamento
0	100
6	100
18	100
33	100
48	100
70	100

	Ris XXXII		Ris XLIV
	Ris XXXI		Ris XLIII
	Ris XXX		Ris XLII
	Ris XXVI		Ris XLI
	Ris XXII		Ris XL
	Ris XVIII		Ris XXXIX
	Ris XI		Ris XXXVIII
	Ris XIV		Ris XXXVII
	Ris XII		Ris XXXVI
	Ris V		Ris XXXV
	Ris IV		Ris XXXIV
	Ris III		Ris XVI
	Ris I		Ris XXXIII

Giorni

% Frequenza di isolamento

Giorni	Salmonella	E. coli	S. aureus	S. pneumoniae	S. typhi
0	36	18	5	2	1
6	9	18	63	0	0
18	46	38	10	2	0
33	38	38	8	10	4
48	77	18	0	3	0
70	85	12	0	2	0

Giorni

 *Zygosaccharomyces hellenicus*
 *Pichia fermentans*
 *Zygosaccharomyces bailii*
 *Lachancea fermentati*
 *Starmerella apicola*
 *Pichia membranifaciens*
 *Hanseniaspora valbyensis*
 *Issatchentia terricola*
 *Kloeckera apiculata*
 *Starmerella bacillaris*
 *Aureobasidium spp.*
 *Hanseniaspora osmophila*
 *Zygosaccharomyces rouxii*
 *Metschnikowia pulcherrima*

Stacked bar chart showing the percentage frequency of isolation for different numbers of isolates (0, 6, 18, 33, 48, 70). The y-axis is labeled '% Frequenza di isolamento' and ranges from 0 to 100. The x-axis shows the number of isolates. The bars are stacked with various colors: red, pink, purple, brown, olive, grey, and light blue.

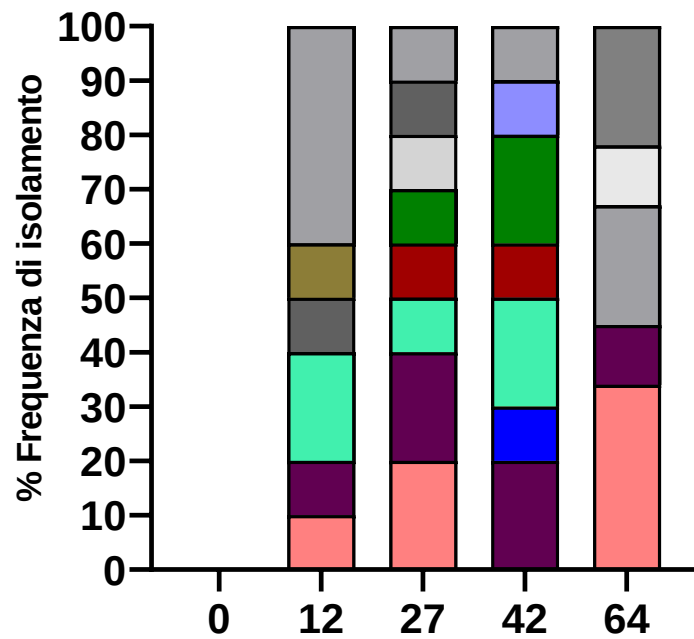
Number of Isolates	Red (%)	Pink (%)	Purple (%)	Brown (%)	Olive (%)	Grey (%)	Light Blue (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	100	0
18	11	34	11	11	11	11	11
33	11	11	11	22	11	11	0
48	11	22	11	11	11	11	11
70	34	0	22	11	11	11	11

Ceppi ricorrenti: 11
Ceppi 2024: 13

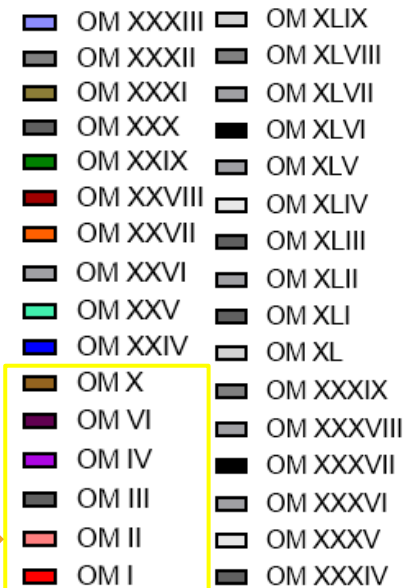
Stacked bar chart showing the percentage frequency of isolation for different bacterial strains over 70 days. The y-axis is '% Frequenza di isolamento' (0-100) and the x-axis is 'Giorni' (0, 6, 18, 33, 48, 70). The legend indicates: Red (S. aureus), Blue (S. aureus), Green (S. aureus), Purple (S. aureus), and Brown (S. aureus).

Giorni	Red (%)	Blue (%)	Green (%)	Purple (%)	Brown (%)
0	35	18	55	0	2
6	44	12	44	0	0
18	50	0	50	0	0
33	26	32	42	18	0
48	56	22	22	0	0
70	0	25	25	50	0

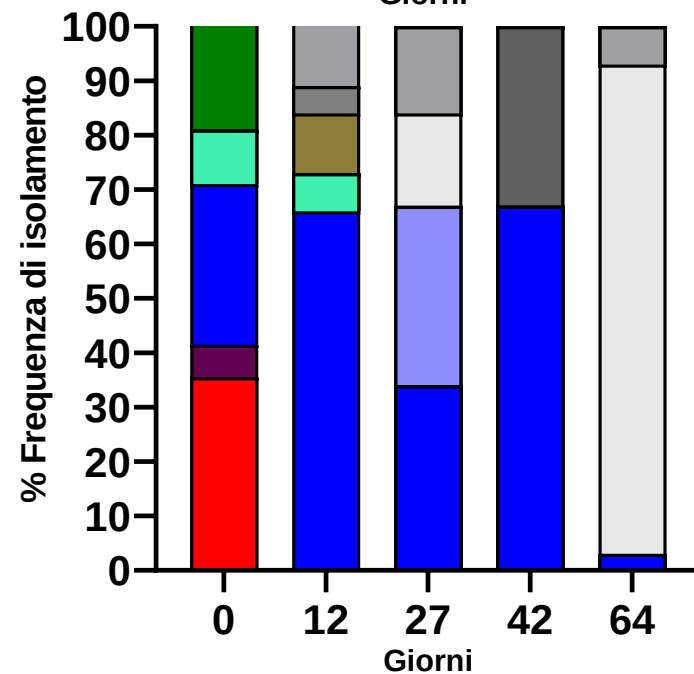
Mosto Ottomani Inoculato 50L



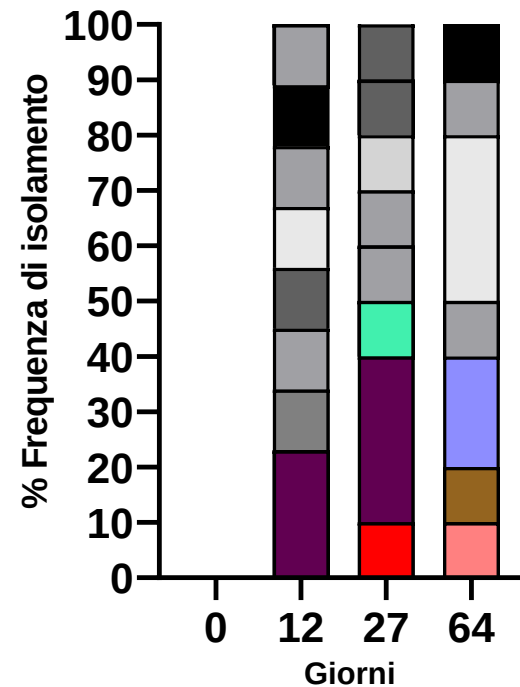
Cepi *S.cerevisiae*



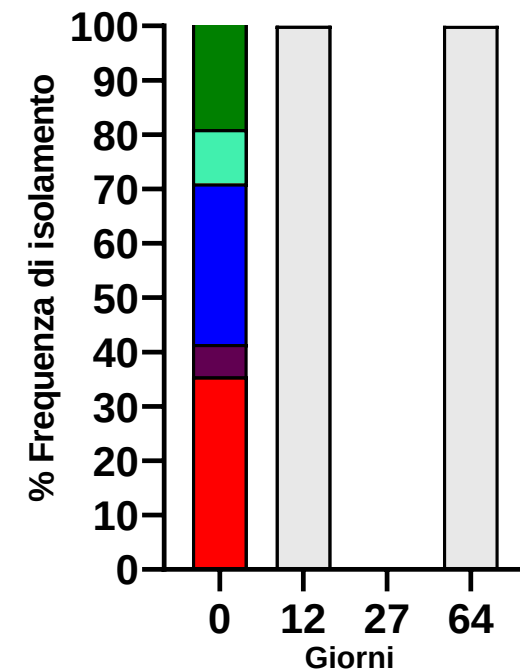
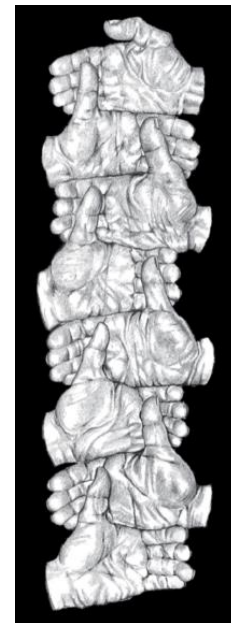
Specie non-Sacch.



Mosto Ottomani 50L



Cepi ricorrenti: 6
Cepi 2024: 26



Riassumendo: confronto 2023 vs 2024

RISECCOLI	100L	Inoc100L	100L
Annata	2024	2024	2023
tempo (giorni dall'ammontamento)	112	112	147
G + F (g/L)	147,6	135,3	210,2
Glicerina (g/L)	5,37	5,25	7,66
Ac. acetico (g/L)	0,55	0,47	1,34
Etanolo (%v/v)	9	9,86	11,2
Purezza fermentativa (ac. acetico/EtOH)	0,06	0,04	0,12

2024:

✓ purezza fermentativa migliore soprattutto su inoculato.

OTTOMANI	100L	Inoc100L	100L
DATA	2024*	2024*	2023
tempo (giorni dall'ammontamento)	119	119	148
G + F (g/L)	97,50	151,60	251,6
Glicerina (g/L)	10,40	10,40	9,69
Ac. acetico (g/L)	0,96	1,03	1,75
Etanolo (%v/v)	12,10	10,20	9,81
Purezza fermentativa (ac. acetico/EtOH)	0,08	0,10	0,18

*no malolattica

2024:

✓ EtOH più alto dei 2023 al campionamento di Aprile 2025.
✓ purezza fermentativa migliore.



Eleonora Mari
DAGRI
Università degli Studi di Firenze

eleonora.mari@unifi.it



Per l'attenzione!!!!

PROGETTO SOTTOMISURA 16.2
PSR 2014-2022 della Regione Toscana

Titolo progetto:
*Selezione di lieviti autoctoni per la
produzione di vini passiti*



Regione Toscana

