

Peculiarità dei lieviti flor

MARILENA BUDRONI, GIACOMO ZARA, SEVERINO ZARA,
ILARIA MANNAZZU, GIOVANNI ANTONIO FARRIS *

Il comportamento sociale di *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae è il lievito più importante per l'industria alimentare, definito GRAS dalla *Food and Drug Administration*, ampiamente utilizzato nell'ottenimento di prodotti di importanza fondamentale nell'alimentazione umana, come il pane, o che hanno contribuito e contribuiscono ad arricchire la dieta anche di gusto e piacere, come la birra, il vino e altre bevande fermentate, ovunque nel mondo. E già questo potrebbe giustificare il titolo di questo paragrafo, tuttavia è possibile allargare questo concetto anche ad un punto di vista insolito e non strettamente antropocentrico, possiamo cioè spiegarlo anche dalla parte del lievito. Infatti, in particolari condizioni ambientali, quali la carenza di nutrienti come fonti azotate e zuccheri, le singole cellule formano aggregati, più o meno stabili nel tempo con un solo scopo: consentire alla popolazione cellulare di superare lo stato di stress. In questo lavoro vedremo che i due punti di vista, antropocentrico e "lievitocentrico", coincidono nel corso della florizzazione e cioè durante la formazione dei biofilm (flor) su vino. Infatti, questo tipo di aggregazione cellulare da un lato produce vini rinomati in tutto il mondo, come lo Sherry spagnolo, la Vernaccia e la Malvasia della Sardegna, dall'altro permette al lievito di tollerare condizioni colturali fortemente selettive quali quelle che si hanno in vino al termine della fermentazione.

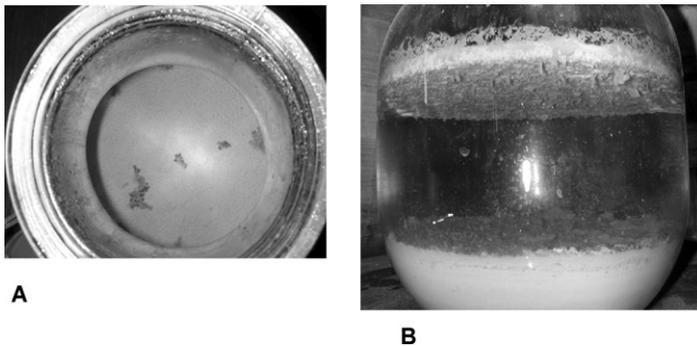


Figura 1. A. Visione del biofilm dall'alto. B. Biofilm su Vernaccia, con evidente deposito cellulare sul fondo del contenitore.

* DISAABA, Università degli studi di Sassari

Peculiarità dei lieviti flor

I lieviti flor sono ceppi vinari di *S. cerevisiae* in grado sia di svolgere la fermentazione alcolica, sia di risalire in superficie per formare il biofilm e condurre l'affinamento dei vini sotto flor, in presenza di ossigeno. Per assolvere a queste due importanti funzioni i lieviti flor devono essere in grado di adattarsi ai numerosi fattori di stress cui sono sottoposti sia in fermentazione che in fase di affinamento (Esteve Zarzoso *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2002). Durante la formazione del biofilm l'alcool etilico, principale fonte carboniosa, viene da prima ossidato ad acetaldeide e successivamente ad acido acetico (Aranda e del Olmo, 2003). Diversi autori indicano gli elevati livelli di etanolo e di acetaldeide come agenti mutageni ed inibitori di varie attività metaboliche (Ristow *et al.*, 1995; Castrejon *et al.*, 2002; Aranda *et al.*, 2002). Di conseguenza i ceppi flor mostrano caratteristiche peculiari di tipo metabolico e genetico dovute anche alle particolari condizioni ambientali e alle tecnologie di produzione dei vini florizzati, in cui sono stati selezionati e utilizzati.

Peculiarità metaboliche

Nel corso della fermentazione e del successivo affinamento i lieviti flor passano da un mezzo colturale ricco di fonti carboniose fermentescibili, come il mosto, a un mezzo carente o privo di zuccheri ma ricco di etanolo, come il vino. L'adattamento a condizioni nutrizionali e ambientali così differenti è associato allo *shift diauxico*, ovvero al passaggio da un metabolismo di tipo anaerobio-fermentativo ad uno di tipo aerobio/ossidativo. Per il lievito questo significa una rimodulazione dell'espressione genica che gli consente di utilizzare fonti di carbonio non fermentescibili (etanolo, acidi organici, etc.) e di continuare a produrre biomassa sottoforma di biofilm.

Nel corso dell'affinamento i lieviti flor producono importanti quantità di acetaldeide in seguito all'ossidazione dell'etanolo via alcol deidrogenasi (Adh3) (Garçia Maiquez, 1995). Normalmente un elevato contenuto di acetaldeide è considerato negativo nei vini bianchi da consumarsi giovani, nei quali è particolarmente ricercata la freschezza, la fragranza e la sapidità; è apprezzato invece in quelli affinati biologicamente, dove è un importante precursore di aromi. La produzione di acetaldeide è inversamente correlata alla temperatura di affinamento. In particolare Farris *et al.*, hanno osservato che mentre vini affinati a temperature comprese tra i 20 e i 25°C presentavano concentrazioni elevate di acetaldeide (320-360 mg/l), vini affinati a temperature superiori mostravano una drastica riduzione della concentrazione di questo metabolita. La produzione di acetaldeide è inoltre influenzata dalla presenza di ossigeno, dalla composizione del mezzo di coltura, dal tipo di chiarificante utilizzato, dalla concentrazione di anidride solforosa (Romano *et al.*, 1994; Berlanga *et al.*, 2001).

La maggior parte dei ceppi vinari non-flor di *S. cerevisiae* è in grado di utilizzare galattosio e maltosio, mentre la maggior parte dei ceppi flor non è in grado di fermentare e assimilare questi zuccheri (Budroni *et al.*, 2005). L'incapacità di utilizzare galattosio (GAL₀) è dovuta a mutazioni nei geni *GAL7* e *GAL10* che sono localizzati nel cromosoma II. Questi geni sono vicini ad almeno cinque ORF particolarmente soggette a rotture del doppio

filamento indotte da meiosi (DSB) come dimostrato nei ceppi flor spagnoli (Johnston et al., 2000; Infante *et al.*, 2003). Naumov *et al.* (1994) hanno dimostrato per i ceppi vinari l'esistenza di due soli loci *MAL* (*MAL1* e *MAL3*), localizzati sul cromosoma VII e II rispettivamente. La perdita della capacità di utilizzare il maltosio (MAL_0) è stata osservata nel 9% dei ceppi non flor e nel 73% dei ceppi flor (Budroni *et al.*, 2005). Considerando che i lieviti flor, durante la produzione del biofilm, producono elevate concentrazioni di acetaldeide e che questo composto è la principale causa del DSB e di altre modificazioni cromosomiche (Ristow *et al.*, 1995) è stato ipotizzato che i fenotipi GAL_0 e MAL_0 siano correlati a danni nel DNA provocati dalle elevate concentrazioni di acetaldeide (Budroni et al., 2005).

Peculiarità genetiche

La maggior parte dei ceppi vinari è caratterizzata da un elevato livello di polimorfismo cromosomico (Codon et al., 1998) e la loro architettura genetica è fortemente influenzata, oltreché da aneuploidie e poliploidie, anche da amplificazioni e delezioni di regioni cromosomali o di singoli geni, e dalla presenza di cromosomi ibridi (Adams *et al.*, 1992; Biddenne *et al.*, 1992; Rachidi *et al.*, 1999). I riarrangiamenti cromosomali dovuti a traslocazioni mediate da Ty (Longo, 1993; Rachidi *et al.*, 1999), crossingover mitotici (Aguilera *et al.*, 2000), conversioni geniche (Puig, 2000), sono indice della grande propensione all'instabilità genetica dei lieviti vinari (Pretorius, 2000), ma anche un potente strumento per l'adattamento alle variazioni ambientali.

I lieviti vinari in generale, e quelli flor in particolare, sono soggetti a una forte pressione di selezione, dovuta soprattutto alle elevate concentrazioni di etanolo (O'Neill and Kaufman, 1987; Delneri *et al.*, 2003). Inoltre, i ceppi flor isolati in Spagna sono caratterizzati da una delezione di 24 bp nella regione ITS1, sul cromosoma XII, che li identifica rispetto ad altri *S. cerevisiae* (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2004).

Budroni *et al.* (1996) hanno riscontrato un diffuso polimorfismo cromosomale nei ceppi flor isolati da Vernaccia. In particolare questi autori hanno individuato 8 cariotipi su 60 isolati provenienti da 16 cantine e osservato un marcato polimorfismo cromosomale. Tale polimorfismo probabilmente dovuto a riarrangiamenti inter ed intracromosomali rende impossibile identificare un cariotipo standard per i ceppi flor ma, come proposto per altri lieviti vinari, sia selvatici che industriali, può fornire ai ceppi flor la possibilità di adattarsi rapidamente ai cambiamenti ambientali (Budroni *et al.*, 1996).

Budroni et al. (1996) hanno inoltre rilevato la presenza di un cariotipo più frequente rispetto ad altri meno diffusi e rappresentati nella zona di Oristano. Questo risultato confermato da Pinna et al., (2000) suggerisce che tra i produttori di Vernaccia della zona è ampiamente diffuso e utilizzato un solo ceppo flor, probabilmente in conseguenza della pressione di selezione esercitata dall'intervento antropico nel corso del tempo e dallo scambio di materiale enologico tra le diverse cantine.

Infante *et al.*, (2003) hanno proposto i ceppi flor come modello per lo studio dei fenomeni di speciazione in *S. cerevisiae*, individuando nei riarrangiamenti cromosomali un im-

portante fattore per l'evoluzione adattativa dei ceppi naturali. Infatti i riarrangiamenti cromosomali condizionano anche le modalità di regolazione di alcuni geni importanti per la produzione del biofilm (Barrales et al., 2008). Alcuni autori (Johnston *et al.*, 2000; Mortimer, 2000, Fernandez-Espinar, 2001) hanno analizzato la stabilità genetica di diversi caratteri enologici, mettendo in evidenza sia la possibilità di migliorare geneticamente alcuni ceppi già in commercio, sia la presenza, sul mercato, di ceppi identici ma commercializzati con nomi diversi. La stabilità genetica è anche influenzata dal ciclo vitale (Budroni *et al.*, 2000). Il ciclo vitale dei ceppi flor presenta un'ampia gamma di possibilità che va dai classici cicli eterotallico e omotallico descritti in letteratura per *S. cerevisiae*, alla bisessualità cioè la capacità di coniugare con entrambi i segni sessuali (a e α). Tuttavia Budroni et al. (2005) hanno evidenziato che il semi-omotallismo è il ciclo vitale più frequente nei ceppi flor sardi. Tale ciclo si presta anche all'incrocio e alla manipolazione genetica dei ceppi come riportato da Zara et al., (2008).

Lieviti flor in fermentazione

Secondo le tecnologie tradizionali i tempi richiesti per lo sviluppo di un biofilm esteso e completo sono piuttosto lunghi e sono necessari da 2 a 3 anni perché il vino assuma le caratteristiche sensoriali richieste. Possibili soluzioni per ridurre i tempi di affinamento del vino sono utilizzare i lieviti flor direttamente in fermentazione (Zara et al., 2008) o coinoculare i lieviti flor con lieviti starter canonici (Farris, comunicazione personale).

Un altro problema che si può riscontrare nella fermentazione di mosti carenti in composti lipidici è la scarsa vitalità ed attività fermentativa dei lieviti flor (Zara et al., 2009). Questo problema è evidente soprattutto nella produzione di vini bianchi in quanto le tecnologie di vinificazione adottate (tempi di macerazione ridottissimi e chiarifiche eccessive) comportano una riduzione nel mosto dei lipidi insaturi provenienti dalle uve. Questa classe di molecole gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della integrità e funzionalità della membrana plasmatica ed è essenziale per la corretta attività fermentativa delle cellule (Bisson, 1999). Zara et al (2009) mostrano come durante la fermentazione in mosto carente di composti lipidici si verificano, nei lieviti flor, un notevole decremento della vitalità cellulare come conseguenza di una scarsa produzione di acidi grassi insaturi e di ergosterolo. Questo fenomeno non sembra essere legato a difetti nella funzionalità della biosintesi lipidica, dato che la saturazione del mezzo di coltura con ossigeno ripristina una corretta composizione lipidica cellulare. Gli autori suggeriscono che i ceppi flor richiedano una elevata quantità di ossigeno durante le prime fasi della fermentazione in modo da poter completare con successo i primi passaggi ossigeno dipendenti nella biosintesi di lipidi. Secondo questa teoria, quindi, una corretta gestione della ossigenazione nelle prime fasi fermentative potrebbe consentire un più rapido completamento della fermentazione alcolica. Tuttavia per confermare questa ipotesi sono necessari studi ulteriori sull'influenza della micro-ossigenazione sull'attività fermentativa dei lieviti flor.

Perché i lieviti flor risalgono in superficie?

Diversi meccanismi sono stati descritti e ipotizzati per spiegare la formazione di biofilm su superfici liquide. Secondo Cantarelli e Martini (1969), il maggiore contenuto di lipidi totali in cellule in fase esponenziale di crescita ne determinerebbe la risalita in seguito ad una diminuzione del loro peso specifico. Iimura *et al.* (1980b) ipotizzano che la risalita delle cellule sia dovuta all'aumento dell'idrofobicità di superficie causata da un incremento nel contenuto di acidi grassi insaturi sulla superficie cellulare. A supporto di questa ipotesi Farris *et al.* (1993) hanno rilevato un incremento del livello d'insaturazione degli acidi grassi totali nel passaggio dalla fase sommersa delle cellule (planctonica) alla fase di biofilm. Martinez *et al.* (1997) hanno preso in considerazione il ruolo aggregante e di trasporto della CO₂ che, intrappolata dagli aggregati cellulari, determinerebbe una minore densità delle cellule e consentirebbe il trasferimento delle stesse dalla fase planctonica a quella superficiale. Zara *et al.* (2005) hanno dimostrato che la glicoproteina di parete Flo11p svolge un ruolo importante nell'interfaccia aria-liquido, tra biofilm e superficie del liquido, in quanto le cellule del biofilm hanno una maggiore densità di galleggiamento rispetto al terreno di sospensione.

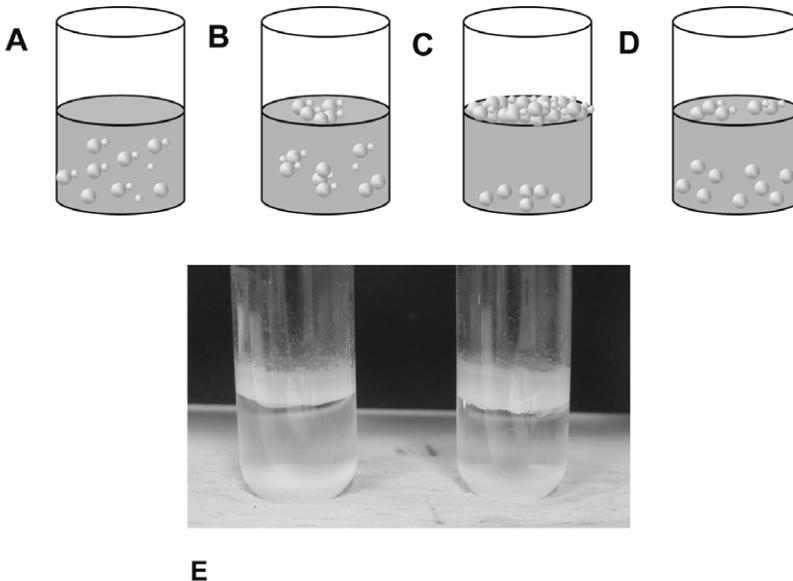


Figura 2. Modello di formazione di biofilm. (A) Le cellule di lievito fermentano gli zuccheri del mosto, non si ha formazione di biofilm. (B) Durante lo shift diauxico, quando la quantità di zuccheri raggiunge valori intorno al 0,2%, le cellule iniziano ad aggregarsi in flocculi multicellulari a causa dell'aumento dell'idrofobicità della superficie cellulare. I flocculi intrappolano CO₂, continuano ad evolversi utilizzando gli zuccheri residui e sono trasportati sulla superficie cellulare. (C) Sulla superficie del liquido si forma un biofilm. Le cellule dello strato più superficiale del biofilm sono in contatto diretto con l'aria che permette la crescita quando gli zuccheri sono completamente consumati. (D) Il biofilm si rompe e i frammenti precipitano sul fondo del vessel a causa della carenza di nutrienti quali azoto, vitamine. Le cellule vengono uccise dall'esposizione prolungata ad alte concentrazioni di etanolo e acetaldeide (Zara *et al.*, 2005). (E) Biofilm formato da un ceppo flor di *Saccharomyces cerevisiae* su terreno sintetico.

Il modello proposto da Zara *et al.* (2005) riprende in parte l'ipotesi formulata da Martinez *et al.* (1997); infatti, l'aumento di espressione di *FLO11* durante lo shift diauxico porta ad un incremento dell'idrofobicità della superficie cellulare, che favorisce la formazione di aggregati multicellulari. Gli aggregati idrofobici intrappolano il diossido di carbonio prodotto dalla fermentazione dello zucchero residuo (<0.2%), e le bolle che si formano si portano sulla superficie del liquido per formare un biofilm (Fig. 2).

Altri autori studiando la ripartizione di ceppi wild-type *FLO11* e di ceppi mutanti *Dflo11* in fase acquosa ed in ottano, avevano già dimostrato che *Flo11p* è molto idrofobica (Reynolds e Fink, 2001). Il prodotto genico del gene *FLO11* è una idrolasi, appartenente alla classe delle proteine di lievito ancorate alla parete cellulare tramite il gruppo glicosil- fosfatidil-inositolo (GPI) e ricche in serina e treonina.

Nel genoma di *Saccharomyces cerevisiae* sono presenti altri cinque geni *FLO* (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11*). *FLO10* e *FLO11* promuovono l'adesione all'agar e alla plastica e lo sviluppo pseudoifale (fig 11). *FLO1* e, in misura inferiore, *FLO5*, *FLO9* e *FLO10*, inducono l'adesione cellula-cellula (floculazione) (Guo *et al.*, 2000). Pertanto, l'espressione di ognuna delle proteine *Flo* è in grado di determinare differenti caratteristiche adesive della cellula (Fig. 3).

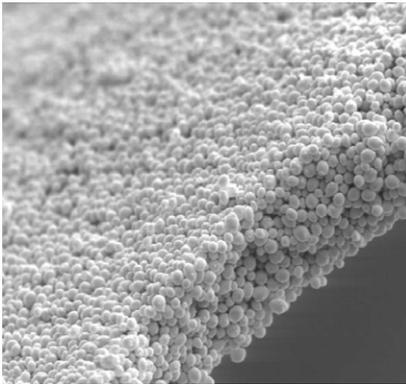


Figura 3. Biofilm di lievito flor al microscopio elettronico a scansione.

Struttura delle adesine

L'adesione fungina è mediata da proteine della parete cellulare altamente specializzate, chiamate *adesine* e *floculine* codificate da geni della famiglia *FLO* che riconoscono specifici aminoacidi o residui zuccherini sulla superficie di altre cellule o promuovono il legame con superfici di varia natura. Tutte le adesine possiedono una struttura comune costituita da tre domini: un dominio aminotermine contenente una sequenza segnale idrofobica un dominio carbossiterminale che presenta zone omologhe alle proteine ancora GPI separata da un dominio centrale contenente sequenze altamente ripetute, ricche in serina e treonina nella porzione N-terminale (A) che protrude dalla superficie della cellula, sono presenti domini di legame per carboidrati o peptidi (Kobayashi *et al.*, 1998; Groes *et al.*, 2002; Rigden *et*

al., 2004). La porzione C-terminale (C) contiene la sequenza consenso per il gruppo glicosil-fosfatidilinositolo (GPI-ancora), il quale è coinvolto nell'ancoraggio della proteina alla parete cellulare (Bony *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). Il dominio centrale dell'adesina, la cui lunghezza è estremamente variabile, è caratterizzato dalla presenza di zone ripetute ricche di serina e treonina (nel gene *FLO11* il 60% del dominio è costituito da residui di serina e treonina). Questa regione è codificata da sequenze di DNA altamente conservate che rappresentano una fonte di variabilità genetica dovuta alla elevata frequenza di ricombinazioni che si verificano in tali siti.

Il controllo genetico dell'adesione cellulare

I geni che codificano per le adesine non sono costitutivamente espressi; la loro attivazione avviene in risposta a una serie di fattori ambientali quali, ad esempio, la carenza di sostanze azotate e di carboidrati, variazioni di pH o dei livelli di etanolo (Verstrepen *et al.*, 2003; Sampermans *et al.*, 2005; Barrales, 2008). Il passaggio dal fenotipo non-adesivo a quello adesivo, probabilmente rappresenta un sistema di adattamento alle situazioni di stress (Verstrepen and Klis, 2006). L'attivazione di *FLO11* in condizioni di carenza di azoto, per esempio, induce l'adesione del lievito e l'invasione del substrato alla ricerca di elementi nutritivi (Kron, 1997; Gagiano *et al.*, 2002).

I geni che codificano per le adesine, oltre ai vari segnali a cascata che ne regolano l'espressione, sono soggetti a un controllo epigenetico (Frieman and Cormack, 2004; Halme *et al.*, 2004). In una popolazione di *Saccharomyces cerevisiae* coesistono sia cellule nelle quali *FLO11* è trascritto sia cellule nelle quali il gene è silente. Lo stato di espressione di *FLO11* è metastabile e viene normalmente ereditato per diverse generazioni; è inoltre reversibile e le cellule possono "accendere" o "spegnere" il gene. Il silenziamento è sia promotore specifico che posizione genomico-dipendente; infatti, la sostituzione del promotore di *FLO11* con un altro promotore o la ricollocazione del gene su un altro cromosoma, elimina la regolazione epigenetica.

Il cambiamento acceso/spento è sotto la regolazione delle proteine Hda1 (deacetilasi istonica) e Sfl1 (repressore della trascrizione). In *S. cerevisiae* il controllo epigenetico è stato osservato anche per il gene *FLO10* (Halme *et al.*, 2004). A differenza di *FLO11*, però, il silenziamento di *FLO10* non dipende da Hda1 ma dalle deacetilasi istoniche Hst1 e Hst2 e dal regolatore del silenziamento telomerico Sir3.

Il silenziamento epigenetico delle adesine può avere multipli scopi. In una popolazione microbica, il silenziamento genico mantiene l'equilibrio tra cellule che aderiscono al substrato colonizzandolo, e cellule non adese che possono raggiungere nuovi siti da colonizzare. Il sistema di "switching" rappresenta un meccanismo con il quale le cellule anticipano le mutevoli condizioni ambientali (Kussell and Leibler, 2005).

Gli eventi di ricombinazione originano nuove adesine

Sebbene i lieviti posseggano un numero limitato di geni che codificano per le adesine,

la variabilità delle adesine isolate da ceppi strettamente correlati è spesso molto ampia. Questa variabilità genetica ha come conseguenza una marcata differenziazione dei fenotipi adesivi tra i diversi ceppi e specie (Verstrepen *et al.*, 2003). Recenti ricerche hanno dimostrato che le sequenze di DNA altamente ripetute presenti nella porzione centrale dei geni che codificano per le adesine, costituiscono la base per la formazione di nuove adesine (Verstrepen *et al.*, 2004a; 2005).

A causa della natura ripetuta e della loro elevata similarità di sequenza, le unità ripetute inducono frequenti eventi di ricombinazione durante la replicazione del DNA (fig. 4). La rimozione o l'aggiunta di unità ripetute comporta, rispettivamente, una contrazione o una espansione del gene. Lunghe adesine, generalmente conferiscono grande aderenza, mentre adesine di piccola taglia comportano una diminuzione dell'adesione, probabilmente perché il dominio N-terminale rimane incluso nella parete cellulare (Frieman *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2005). In maniera non dissimile dalla regolazione epigenetica, questo meccanismo permette ai lieviti di generare variabilità all'interno della popolazione e di regolare il proprio comportamento adesivo in funzione dell'ambiente circostante. Inoltre, gli eventi di ricombinazione tra le sequenze ripetute di geni diversi possono generare forme chimeriche del gene, con proprietà adesive differenti (Verstrepen *et al.*, 2005). Per i funghi patogeni come *C. albicans* e *C. glabrata*, le frequenti ricombinazioni a carico dei geni che codificano per le proteine di parete, rappresentano un ulteriore sistema che permette di creare una variabilità della superficie cellulare (Verstrepen *et al.*, 2004a; 2005).

Il quorum sensing

Nel biofilm le cellule che si trovano a stretto contatto conducono uno stile di vita interdipendente. Infatti agiscono come parte integrante di una comunità microbica e adottano strategie comportamentali collettive vivendo come organismi interattivi (Nadell *et al.*, 2008). La formazione di tutti i biofilm è mediata da meccanismi di *quorum sensing*, dipendenti dalla densità cellulare che regola l'espressione di geni specifici (Kruppa, 2009). L'attivazione del *quorum sensing* avviene attraverso la produzione di piccole molecole, definite autoinduttori, responsabili della comunicazione cellula-cellula. Queste molecole attivano l'espressione dei geni ad esse correlati solo quando raggiungono una determinata concentrazione all'interno della cellula. La formazione di biofilm monospecie ad architettura definita è un fenomeno multifattoriale dinamico e complesso che coinvolge variabili genetiche, fisiologiche, ecologiche, nonché idrodinamiche e di chimica di superficie (Di Mattia, 2008; Nadell *et al.*, 2008). Per *Saccharomyces cerevisiae* sono stati indicati come autoinduttori alcuni alcoli superiori (triptofolo, feniletanolo) almeno per quanto riguarda altri tipi di aggregazione cellulare (crescita filamentosa) (Fink, 2006), ma niente è noto per la formazione del biofilm su vino.

La matrice extracellulare

L'inizio della formazione del biofilm è caratterizzato dall'interazione della cellula con la

superficie. Una volta che la cellula ha aderito alla superficie, il biofilm comincia a maturare con la produzione di una matrice extracellulare che generalmente contribuisce all'architettura della comunità. Malgrado la presenza della matrice extracellulare sia universale, essa è molto varia sia nella composizione sia nei tempi di sintesi (Davey and O'Toole, 2000).

Le caratteristiche più importanti della matrice sono correlate alla composizione e alla struttura del polisaccaride che determinano la conformazione primaria del biofilm. Infatti, la quantità di EPS (extracellular polymeric substances) varia a seconda dell'organismo e aumenta all'aumentare dell'età del biofilm (Davey and O'Toole, 2000; Varon and Choder, 2000; Branda *et al.*, 2005).

La matrice è un ambiente dinamico dove possono accumularsi nutrienti e dove le cellule microbiche mantengono il giusto grado di omeostasi. Essa mostra un alto grado di eterogeneità, infatti al suo interno possono coesistere diversi microambienti. La natura della matrice polimerica, oltre ad essere correlata alle strutture esopolisaccaridiche, dipende anche da diversi fattori estrinseci, come le proprietà chimico-fisiche dell'ambiente dove il biofilm è localizzato, e da fattori intrinseci, come il genotipo delle cellule che lo compongono (Davey and O'Toole, 2000). Ne consegue che la struttura della matrice del biofilm può variare a seconda dello stato fisiologico delle cellule, della disponibilità di nutrienti, dell'ambiente in cui si forma, e delle specie microbiche che lo compongono (Sutherland, 2001).

Le proprietà di superficie delle cellule di lievito sono fondamentali nella formazione delle comunità multicellulari e nella loro interazione con l'ambiente. Il lievito patogeno opportunistico *Candida albicans*, il maggior agente eziologico di infezioni micotiche nosocomiali gravi in soggetti immunosoppressi (Wenzel and Pfaller, 1991; Li and Palecek, 2003), rappresenta un ottimo modello per lo studio del biofilm di lievito. Il biofilm formato da *Candida albicans* è composto da cellule lievitiforimi, ife e pseudoife e materiale extracellulare (Nobile and Mitchell, 2006). La sintesi della matrice che avviene durante la formazione del biofilm di *C. albicans*, è in funzione delle condizioni di incubazione: in condizioni statiche la produzione di EPS è minima, mentre aumenta considerevolmente quando il biofilm si sviluppa in un terreno liquido in agitazione (Baillie and Douglas, 2000).

In un recente lavoro, Kuthan *et al.*, (2003), osservando l'ultrastruttura delle colonie di alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, hanno scoperto la presenza di materiale extracellulare (fig). La presenza di filamenti intercellulari nelle colonie giovani indica che la produzione di ECM che riveste e connette le cellule non è una conseguenza dell'invecchiamento della colonia come invece è stato osservato da Varon and Choder (2000). Tale struttura osservata nelle colonie *fluffy* (vaporose) sembra essere importante per distanziare le cellule e proteggere l'intera colonia contro le avversità dell'ambiente. Questo fenomeno è stato osservato in vari ceppi di *S. cerevisiae* indipendentemente dall'ambiente di isolamento. Kuthan *et al.*, (2003), dopo aver osservato la sovraespressione del gene *FLO11* nelle cellule delle colonie *fluffy*, hanno ipotizzato il coinvolgimento di Flo11p nel legame tra le cellule e materiale extracellulare e un suo ruolo attivo nel determinare la struttura della colonia. Le informazioni circa la composizione chimica della matrice di *S. cerevisiae* sono invece scarse:

la sua resistenza alle endoglicosidasi rende l'analisi di spettrometria di massa difficoltosa (Kuthan *et al.*, 2003). Come per le glicoproteine di superficie dei batteri la resistenza della matrice alle endoglicosidasi indica l'esistenza di catene di carboidrati che formano la componente extracellulare nelle colonie *fluffy* di lievito.

Beauvais *et al.* (2009) hanno descritto la presenza di una matrice esocellulare prodotta da ceppi flocculenti di *S. cerevisiae*. Le cellule flocculenti secernono polisaccaridi di glucosio e mannosio. Questa matrice sembra non abbia nessun ruolo protettivo nei confronti dell'etanolo. Tuttavia resta ancora da analizzare il ruolo che la matrice svolge in fase di biofilm nel vino, dove le cellule sono soggette sia allo stress da etanolo sia allo stress ossidativo e da essiccamento, soprattutto nella zona superiore del biofilm.

CONCLUSIONI

I lieviti flor sono tra i più studiati al mondo. Infatti lo studio del comportamento sociale di *S. cerevisiae* rappresenta un importante modello biologico per lo studio e la comprensione dei fenomeni di aggregazione cellulare, importanti non solo da un punto di vista enologico ma biologico in senso lato.

Le conoscenze attuali sui lieviti flor sono ampie e approfondite, anche se restano ancora da spiegare diversi aspetti riguardanti la risalita delle cellule in superficie e i fattori che la determinano tra cui la regolazione dei geni implicati, l'eventuale presenza e composizione della matrice esocellulare e il suo ruolo nel biofilm.

Sono attualmente a disposizione dei produttori della Vernaccia di Oristano sia una collezione di ceppi autoctoni flor caratterizzati tecnologicamente e molecolarmente, sia protocolli per il controllo microbiologico dell'intero processo di trasformazione dalla fermentazione alla fase di affinamento in botte. Tuttavia siamo di fronte a un paradosso: la Vernaccia di Oristano, vino unico nel panorama italiano, sta scomparendo, le quantità prodotte sono al minimo storico. Inoltre la fase di florizzazione è diventata per i produttori una costosa immobilizzazione di capitale e per questo si preferisce destinare buona parte delle uve alla produzione di Vernaccia del Tirso, un vino bianco da tavola. Manca infatti un progetto di ricollocazione su un mercato complesso e articolato come quello attuale, che sfrutti tutte le opportunità offerte dai prodotti di nicchia. Questo progetto deve coinvolgere i produttori in primis, ma anche l'Università e le istituzioni regionali. I produttori, in particolare, devono trovare un accordo per la messa a punto di un protocollo per l'ottenimento di un prodotto di qualità e per la sua commercializzazione. E' inoltre necessario modificare il disciplinare di produzione e imporre l'utilizzo di lieviti starter selezionati per la fase di affinamento.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS A., GOTTSCHILING D.E., KAISER C.A., STEARNS T. (1992). Methods in yeast genetics: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold. Spring Harbor, NY.
- AGUILERA A., CHAVEZ S. AND MALAGON F. (2000). Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* **16**: 731–754.
- ARANDA A., DEL OLMO M. (2003). Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several *ALD* genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* **20**(8): 747–59.
- ARANDA A., QUEROL A. AND DEL OLMO M. (2002). Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of *HSP* genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch. Microbiol.* **177**: 304–312.
- BARRALES R. R., JIMENEZ J. AND IBEAS J. I. (2008). Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**:145–156.
- BEAUVAIS A., LOUSSERT C., PREVOST M. C., VERSTREPEN K. AND LATGÉ J. P. (2009). Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in *FLO1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res* **5**:1–9.
- BERLANGA T. M., ATANASIO C., MAURICIO J. C. AND ORTEGA J. M. (2001). Influence of aeration on the physiological activity of flor yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **49**:3378–3384.
- BIDENNE C., BLONDIN B., DEQUIN S. AND VEZINHET F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **22**: 1–7.
- BISSON L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**(1): 107–119.
- BONY M., THINES-SEMPOUX D., BARRE P., BLONDIN B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* **15**:4929–36.
- BRANDA S.S., VIK S., FRIEDMAN L., KOLTER R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**(1):20–6.
- BUDRONI M., NOBILE C., ROGGIO T., PINNA G., BARDI L., FARRIS G.A. (1996). PFGE study of some *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J. Wine Res.* **7**:201–205
- BUDRONI M., ZARA S., ZARA G., PIRINO G. AND MANNAZZU I. (2005). Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Res.* **5**:951–8.
- CANTARELLI C. AND A. MARTINI. (1969). On the pellicle formation by “flor” yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* **35**:F35–F36.
- CASTREJON F., CODON A.C., CUBERO B., BENITÈZ T. (2002). Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 462–467.
- CODON A.C., BENITÈZ T., KORHOLA M. (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:154–163.
- DAVEY M.E. AND O'TOOLE G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:847–867.
- DELNERI D., COLSON I., GRAMMENOUDI S., ROBERTS I. N., LOUIS E. J., AND OLIVER S. G. (2003). Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature* **422**(6927): 68–72.
- DI MATTIA E. (2008). Biofilm microbici in Microbiologia ambientale a cura di Biavati B. e Sorlini C. Casa Editrice Ambrosiana, Milano
- ESTEVE-ZARZOSO B., PERIS-TORÀN M.J., GARCÍA-MAIQUEL E., URUBURU F. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2056–2061.
- ESTEVE-ZARZOSO B., FERNANDEZ-ESPINAR M.T. AND QUEROL A. (2004). Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* “flor” yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**:151–158.
- FARRIS G. A., SINIGAGLIA M., BUDRONI M., AND GUERZONI M. E. (1993). Cellular fatty acid composition in film-forming strains of two physiological races of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:215–219.
- FERNANDEZ-ESPINAR M.T., ESTEVE-ZARZOSO B., QUEROL A. AND BARRIO E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 87–97.
- FERNANDEZ-ESPINAR M.T., LOPEZ V., RAMON D., BARTRA E. AND QUEROL A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food. Microbiol.* **70**: 1–10.

- FRIEMAN M.B., CORMACK B.P. (2002). The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* **50**: 883-896.
- FRIEMAN M. B. AND CORMACK B. P. (2004). Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**: 3105-3114.
- GAGIANO M., BAUER F.F., PRETORIUS I.S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2**(4):433-70.
- GARCÍA MARQUEZ E. (1995). Los microorganismos de Jerez. *Microbiol SEM* **11**:51-58.
- GROES M., TEILUM K., OLESEN K., POULSEN F.M., HENRIKSEN A. (2002). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**(12):2135-7.
- GUO B., STYLES C. A., FENG Q. AND FINK G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12158-12163.
- HALME A., BUMGARNER S., STYLES C.A. AND FINK G.R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**: 405-415.
- IIMURA Y., HARA S., AND OTSUKA K. (1980). Fatty acids as hydrophobic substances on the cell surface of a film strain of *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **44**:1223-1229.
- INFANTE J.J., DOMBEK K.M., REBORDINOS L., CANTORAL J.M. AND YOUNG E.T. (2003). Genome wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* **165**: 1745-1759.
- JOHNSTON J.R., BACCARI C., MORTIMER R.K. (2000). Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol.* **151**: 583-590.
- KAPTEYN J.C., VAN DEN ENDE H., KLIS F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**(2): 373-83.
- KOBAYASHI O., YOSHIMOTO H., AND SONE H. (1998). Analysis of the genes activated by the *FLO8* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **36**: 256-261.
- KRON S.J. (1997). Filamentous growth in budding yeast. *Trends Microbiol.* **5**:450-454.
- KRUPPA M. (2008). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**(1):1-10.
- KUSSEL E. AND LEIBLER S. (2005). Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* **309**:2075-2078.
- KUTHAN M., DEVAUX F., JANDEROVÁ B., SLANINOVÁ I., JACQ C. AND PALKOVÁ Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* **47**: 745-754.
- LI F. AND PALECEK S. P. (2003). *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. *Eukaryotic Cell.* **2**: 1266-1273.
- LONGO E., VEZINHET F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(1):322-6.
- MARTINEZ P., PEREZ L. AND BENITEZ T. (1997). Mechanism of velum formation by flor yeast isolated from sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**:55-62.
- MORTIMER R.K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **10**: 403-409.
- NADELL C.D., XAVIER J.B., LEVIN S.A., FOSTER K.R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **6**(1):e14.
- NAUMOV G.I., NAUMOVA E.S., MICHELS C.A. (1994). Genetic variation of the repeated MAL loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics.* **3**:803-12.
- NOBILE C.J., MITCHELL A.P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell. Microbiol.* **8**: 1382-1391.
- O'NEILL G.T. AND KAUFMAN M.H. (1987). Cytogenic analysis of first cleavage fertilized mouse eggs following in vivo exposure to ethanol shortly before at the time of conception. *Development* **100**:441-448.
- PINNA G., BUDRONI M., GIORDANO G., USAI S., FARRIS G.A. (2000). Intraspecific characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* flor strains by mtDNA RFLP analysis. *Ann. Microbiol.* **50**:177-182.
- PRETORIUS I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine-making. *Yeast* **16**: 675-729.

- PUIG S., PEREZ-ORTIN J.E. (2000). Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast* **16**: 139-148.
- RACHIDI N., BARRE P., BLONDIN B. (1999). Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Curr. Genet.* **37**: 1-11.
- REYNOLDS T. B. AND FINK G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881.
- RIGDEN D.J., MELLO L.V., AND GALPERIN M.Y. (2004). The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesions and signaling molecules. *Trends Biochem. Sci.* **29**:335-339.
- RISTOW H., SEYFARTH A. AND LOCHMANN E.R. (1995). Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutant Res.* **326**: 165-170.
- RODRIGUEZ-PEÑA J.M., RODRIGUEZ C., ALVAREZ A., NOMBELA C., ARROYO J. (2002). Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J. Cell Sci.* **115**: 2549-58.
- ROMANO P., SUZZI G., TURBANTY L., POLSINELLI H. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Letters* **118**: 213- 218.
- SAMPERMANS S., MORTIER J. AND SOAERS E.V. (2005). Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J. Appl. Microbiol.* **98**:525-531.
- VARON M. AND CHODER M. (2000). Organization and cell-cell interaction in starved *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J. Bacteriol.* **182** :3877-3880.
- VERSTREPEN K. J. AND KLIS F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* **60**: 5-15.
- VERSTREPEN K. J., REYNOLDS T. B. AND FINK. G. R. (2004). Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 533-540.
- VERSTREPEN K.J., JANSEN A., LEWITTER F., FINK G.R. (2005). Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.* **37**: 986-990.
- VERSTREPEN K. J., DERDELINCKX G., VERACHTERT H., DELVAUX F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 197-205.
- WENZEL R.P. AND PFALLER M.A. (1991). *Candida* species: emerging hospital bloodstream pathogens. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **12**:523-524.
- ZARA G., MANNAZZU I., SANNA M. L., ORRO D., FARRIS G.A., BUDRONI M. (2008) .Exploitation of the semi-homothallic life cycle of *Saccharomyces cerevisiae* for the development of breeding strategies. *FEMS Yeast Res.* **8**(7):1147-54.
- ZARA G., ANGELOZZI D., BELVISO S., BARDI L., GOFFRINI P., LODI T., BUDRONI M., MANNAZZU I. (2009). Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Res.* **9**(2):217-25
- ZARA S., BAKALINSKY A. T., ZARA G., PIRINO G., DEMONTIS M. A. AND BUDRONI M. (2005). *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2934-2939.