

**6.6 LINEA B2 – MIGLIORAMENTO DELLA QUALITA' DEI VINI MEDIANTE  
L' IMPIEGO DI INOCULI MISTI**

**Coordinamento scientifico: DIBA Dipartimento Biotecnologie Agrarie  
Università degli Studi di Firenze**

Partner scientifico: Dipartimento di Scienza degli Alimenti  
Università Politecnica Marche

Committente e Partner tecnico: Società Consortile Toscana srl

**Coordinamento scientifico e Autori del documento:**

**Dott.sa Paola Domizio –  
Coordinatore scientifico**

**DIBA Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Università di Firenze  
Via Donizetti N. 6 – Firenze**

**Prof. Maurizio Ciani -**

**Dipartimento di Scienza degli Alimenti  
Università Politecnica Marche  
Via Breccie Bianche - Ancona**

## 1) Stato dell'Arte

### Base di partenza scientifica nazionale o internazionale

E' noto che la qualità del vino è fortemente dipendente da quel complesso di sostanze che derivano dall'uva e dal metabolismo dei lieviti e batteri e che vanno a costituire il flavour del prodotto.

Molte vie di formazione del flavour del vino operano nello stesso tempo: processi chimici, attività enzimatiche dell'uva e quelle presenti nei lieviti e batteri modificano le sostanze (precursori) presenti nell'uva, fornendo flavour complessi che sono in grado di condizionare le caratteristiche percepibili dei vini. La possibilità di intervenire in modo specifico nella formazione del flavour con interventi mirati e soprattutto salvaguardando il patrimonio compositivo dei vini diventa per i produttori di vini un'esigenza vitale per il raggiungimento e mantenimento delle peculiarità dei propri prodotti. E' ormai noto che i trattamenti basati sull'utilizzo di sostanze quali enzimi commerciali, agenti chiarificanti ecc. e trattamenti termici come stabilizzazione a freddo, utilizzati per conseguire e stabilizzare le caratteristiche del vino, oltre agli effetti voluti possono determinare altre modificazioni indesiderate, che si traducono in perdita dei caratteri di peculiarità e nell'appiattimento dei prodotti. A tale proposito, interventi più specifici e mirati, come ad esempio l'impiego di starter di fermentazione con peculiari attività enzimatiche e differenti modalità di fermentazione, costituiscono interventi innovativi per conseguire prima e salvaguardare poi i contenuti di qualità dei vini.

Per migliorare le caratteristiche sensoriali del vino ed evitare allo stesso tempo la proliferazione di lieviti alterativi è d'altra parte indispensabile il controllo della crescita microbica durante il processo di vinificazione. Attualmente il pronto avvio della fermentazione alcolica e la produzione di vini che garantiscano nel tempo la costanza qualitativa si ottiene mediante l'aggiunta di SO<sub>2</sub> ed il successivo utilizzo di colture selezionate di *Saccharomyces cerevisiae*.

L'utilizzo ormai costante e generalizzato degli ultimi anni di colture selezionate di *S. cerevisiae* se da una parte rende sufficientemente sicuro il decorso

fermentativo dall'altra provoca l'inibizione di tutti quei microrganismi che potrebbero, in misura differente, contribuire ad aumentare la complessità del prodotto finale. L'insediamento del lievito selezionato consente infatti di inibire/controllare lo sviluppo della flora spontanea del mosto che comprende anche quei ceppi di lievito ritenuti, spesso senza alcuna discriminazione, responsabili dell'insorgenza di difetti nei vini o che possono causare problemi legati al processo fermentativo.

Rispetto al decorso fermentativo, diversi studi ecologici condotti nelle diverse aree vitivinicole per valutare la microflora associata alla fermentazione naturale del mosto d'uva, hanno messo in evidenza che i lieviti apiculati (*Hanseniaspora* /*Kloeckera*) dominano le prime fasi del processo fermentativo per essere poi sostituiti dai lieviti ellittici che proseguono e portano a termine la fermentazione (Amerine, et al. 1980; Martini, 1993). Durante le varie fasi del processo fermentativo spesso possono essere rinvenuti altri lieviti non-*Saccharomyces* appartenenti ai generi *Candida*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces* e *Metschnikowia* (Fleet et al., 1984; Heard and Fleet, 1985; Pardo et al., 1989). Studi quantitativi condotti sulla microflora dei mosti in fermentazione hanno messo in evidenza la partecipazione, anche a livelli significativi nelle varie fasi del processo, di lieviti non-*Saccharomyces* (Fleet et al. 1984; Pardo et al. 1989). La presenza di lieviti non-*Saccharomyces* è stata rilevata non solo nelle fermentazioni naturali ma anche in vinificazioni inoculate con colture selezionate (Mora et al. 1990; Ciani e Rosini, 1993).

In seguito a queste ricerche c'è stata una rivalutazione del ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* di ambito vinario (Fleet and Heard, 1993; Ciani 1997). La loro presenza e persistenza durante vinificazioni inoculate e non inoculate è ben documentata così come il loro contributo alla composizione analitica e alla caratteristiche sensoriali del vino (Romano et al., 1992; Shütz and Gafner 1993; Herraiz et al., 1990; Egli et al., 1998). Molti studi infatti hanno rilevato che i lieviti non-*Saccharomyces* contribuiscono a rendere più complesso l'aroma dei vini e quindi a migliorarne la qualità (Romano et al., 1997 a 1997b; Egli et al., 1998; Ciani and Maccarelli, 1998; Henick-Kling et al., 1998). Oltre a tali considerazioni, i lieviti non-*Saccharomyces* sono risultati interessanti per la loro

applicazione nell'industria enologica anche per le loro attività enzimatiche. Numerose ricerche condotte negli ultimi anni hanno messo in evidenza che alcuni lieviti *non-Saccharomyces* di ambito vinario sono in grado di secernere enzimi, quali proteasi, esterasi (Rosi et al. 1994) e beta-glucosidasi (Rosi et al. 1994) che influiscono positivamente sull'aspetto qualitativo del vino (Fernandez et al 2000; Strass et al. 2001; Ferriera et al. 2001). A tale proposito questi studi, sottolineando il ruolo dei lieviti *non-Saccharomyces* nel migliorare il profilo aromatico e sensoriale dei vini, hanno ipotizzato il loro uso in fermentazioni miste controllate.

Infatti, il processo fermentativo naturale anche se è preferito da taluni proprio per migliorare le caratteristiche analitico-sensoriali e rendere più complesso il futuro vino, rimane un processo incontrollato con la successione indefinita di varie specie. Questo tipo di processo quindi lasciando al caso la presenza qualitativa della microflora può portare a dei clamorosi insuccessi.

L'uso controllato di inoculi misti sono da tempo stati proposti in letteratura. Da molto tempo l'uso della specie *Schizosaccharomyces pombe* in combinazione con *S. cerevisiae* è stata proposta per la disacidificazione dei mosti (Snow e Gallender, 1973; Yokotsuka et al 1993)

Altri autori (Ciani e Ferraro 1996; Ciani, 2001) hanno evidenziato la possibilità di incrementare e raggiungere livelli elevati di glicerolo, composto che conferisce maggiore morbidezza al vino, utilizzando ceppi di lievito appartenenti alla specie *Candida stellata*.

Per queste ragioni è stata valutata la possibilità di utilizzare inoculi misti controllati utilizzando specie *non-Saccharomyces* di ambito vinario che possono avere delle potenzialità applicative da utilizzare insieme alla coltura starter di *S. cerevisiae*. Tale tipo di processo fermentativo potrebbe essere una valida alternativa all'inoculo con il solo ceppo di *Saccharomyces*.

L'inoculo di colture miste prevede quindi, oltre al ceppo di *S. cerevisiae* selezionato, anche l'aggiunta di ceppi *non-Saccharomyces* anche loro opportunamente selezionati. D'altra parte è ormai noto che esiste all'interno del genere *Saccharomyces* un'ampia variabilità tra i ceppi per la produzione di differenti composti secondari. Allo stesso modo anche all'interno delle specie di

non-*Saccharomyces* di ambito vinario è stata rilevata un'ampia variabilità per i principali caratteri legati alla vinificazione sui quali effettuare operazioni di selezione (Ciani e Maccarelli 1998; Romano 2002). Pertanto, così come negli ultimi anni la selezione operata tra i lieviti *Saccharomyces* ha consentito l'ottenimento di ceppi con caratteristiche peculiari, un'analoga operazione di selezione sui lieviti *non saccharomyces* potrà consentire di individuare ceppi con caratteristiche idonee al processo di vinificazione in cui tali ceppi interagiscono positivamente con i *Saccharomyces* selezionati, consentendo di raggiungere prodotti con caratteristiche originali e peculiari.

## Bibliografia

- Amerine, M. A., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L. and Webb, A.D., The technology of Wine Making. 2<sup>th</sup> edn., AVI Publishing, Westport, 1980.
- Ciani, M., 1997. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. In Recent Res. Develop. Microbiol. Vol. 1, ed. S. G. Pandalai., Research Signpost, Kerala, India., pp. 317-331.
- Ciani, M., 2001. Allestimento di starter con colture microbiche miste. Industrie delle Bevande 30, 35-39.
- Ciani, M., Rosini, G. 1993 Vinificazioni industriali in purezza microbiologica. Industrie delle Bevande. 22, 202-206
- Ciani, M. and Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 199-203.
- Ciani, M. and Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. J. Appl. Microbiol. 85, 247-254.
- Egli, C. M., Ediger, W. D., Mitrakul, C. M. and Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. J. Appl. Microbiol. 85, 779-789.
- Fernandez, M., Ubeda, J. F., Briones, A. I. 2000 Int. J. Food Microbiol. 59, 29-36

- Ferreira, A. M., Climaco, M. C., Faia, A. M. 2001 J. Appl. Microbiol. 91, 67-71.
- Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1034-1038.
- Fleet, G. H. and Heard, G. M., Yeasts-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, ed G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 1993, pp. 27-54.
- Heard, G. M. and Fleet, G. H., 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 727-728.
- Henick-Kling, T., Ediger, W. D., Daniel, P. And Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84, 865-876.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J. And Cabezudo, M., 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. Am. J. Enol. Vitic. 41, 313-318.
- Martini, A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Wine Res. 3,165-176.
- Mora, J., Barbas, J. I. and Mulet, A., 1990. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic. 41, 156-159.
- Pardo, I., García M. J., Zuniga M. and Uruburu F., 1989. Dynamics of microbial populations during fermentations of wines from the Utiel Requena region of Spain. Appl. Environ. Microbiol. 55, 539-541.
- Romano, P., Role of apiculate yeasts on organoleptic characteristics of wine. In *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*, ed. M. Ciani. Research Signpost, Kerala, India, 2002, pp. 99-109.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G. and Zironi, R., J., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. J. Appl. Bacteriol. 73, 126-130.

- Romano P., Suzzi G. Domizio P. Fatichenti F.: Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 239-242, 1997a.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. and Maifreni, M., 1997b. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 82, 615-618.
- Rosi I., Vinella M., Domizio P.: Characterization of  $\alpha$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 1994, 77, 519-527.
- Rosi I., Domizio P., Fia G. 1997 Characterization of esterase activity in wine related yeasts. Book of Abstract 18th ISSY-Yeast Nutrition and natural Habitats- 24-29 August, Bled, Slovenia, (Raspor P. ET AL: EDS.) Published by Biotechnological Faculty, University of Ljubljana p. P9-03
- Schütz, M. and Gafner, J., Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I. and Angulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
- Snow, P. G., Gallander, G. G., 1977 *Am. J. Enol. Vitic* 30, 45-48.
- Strauss 2001, M., L. A., Jolly, M. P., Lambrechts, M. G., van Rensburg, P. 2001 *J. Appl. Microbiol.* 91, 182-190.
- Yokotsuka, K., Otaki, A., Tanaka, H. 1993 *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 371-377.

## 2) Obiettivi del programma di ricerca

### 2.1 Descrizione del progetto

L'impiego controllato di inoculi misti con lieviti vinari appartenenti a specie differenti può consentire di migliorare da una parte e tipizzare dall'altra i vini in relazione all'incremento di composti positivi e/o alla riduzione di quelli indesiderati, risultanti delle interazioni tra lieviti di specie differenti.

Una maggiore complessità dei vini dovuta all'azione di più specie di lievito infatti è stata spesso evocata dai fautori delle fermentazioni naturali. Nel caso dell'impiego di inoculi misti controllati la maggiore complessità dei vini potrà essere raggiunta evitando i problemi legati al mancato controllo del processo fermentativo che rende spesso incostanti i risultati. La possibilità quindi di "mimare" una fermentazione naturale, mantenendo però il controllo del processo fermentativo, rendendolo quindi ripetitivo, è sicuramente un interessante aspetto dell'applicazione di tale approccio fermentativo in vinificazione.

L'obiettivo del presente progetto può essere raggiunto attraverso il seguente approccio metodologico:

- **Isolamento/selezione** di lieviti non - *Saccharomyces* per i seguenti caratteri:
  - potere fermentativo
  - purezza fermentativa
  - energia di fermentazione
  - resistenza alla SO<sub>2</sub>
  - produzione di idrogeno solforato
  - carattere killer
  - produzione di glicerolo
  - attività idrolitiche in grado di influenzare il flavour dei vini
  - rilascio di polisaccaridi durante la fermentazione
  - consumo di azoto assimilabile



- **Inoculo** dei lieviti non-*Saccharomyces* selezionati in combinazione con un ceppo di *Saccharomyces* commerciale
- **Valutazione** dei prodotti ottenuti dalle prove in scala di laboratorio e delle successive verifiche su scala industriale

## 2.2 Descrizione del programma di ricerca

Per raggiungere gli obiettivi definiti nel punto 2.1, la ricerca verrà articolata come descritto di seguito.

### 2.2.1 Primo anno di ricerca

Durante il primo anno si procederà alla selezione dei ceppi di lievito in relazione ai caratteri enologici posseduti

Le attività di ricerca saranno articolate in tre fasi.

#### **Fase 1 (4 mesi) Reperimento ceppi e loro definizione tassonomica**

In questa prima fase del progetto si provvederà al reperimento di quei ceppi di lievito non-*Saccharomyces* appartenenti ai generi *Pichia*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Saccharomycodes* e *Candida*, coinvolti naturalmente nel processo di vinificazione.

Di ciascun genere verranno inizialmente presi in considerazione 10-15 ceppi.

Per i ceppi che non sono stati definitivamente classificati dal punto di vista tassonomico si provvederà alla loro collocazione tassonomica definitiva mediante l'impiego di metodi classici (assimilazioni, fermentazioni, ID 32, etc.) e metodi molecolari quali ITS-PCR e successiva analisi di restrizione con opportuni enzimi ed il sequenziamento, previa amplificazione mediante PCR con primer specifici dei domini D1-D4 del 26 S r-DNA.

## **Fase 2 (4 mesi) Valutazione di alcuni caratteri enologici dei ceppi di lieviti non- *Saccharomyces***

I caratteri enologici dei lieviti possono essere suddivisi in due gruppi: quelli di importanza tecnologica e quelli di qualità. I primi sono quelli che influiscono sull'andamento del processo fermentativo e possono rendere competitivo in fermentazione il ceppo non-*Saccharomyces* nei confronti dello starter saccharomicetico, i secondi, sono quelli che influiscono sulla composizione chimica del vino, attraverso la produzione di composti secondari della fermentazione e di composti che derivano da modificazione o conversione dei costituenti dei mosti.

- Valutazione caratteri enologici mediante saggi su piastra

I ceppi di lievito non-*Saccharomyces* reperiti verranno valutati mediante saggi su piastra per i seguenti caratteri

**a) resistenza alla SO<sub>2</sub>**

La resistenza all'anidride solforosa verrà saggiata valutando la crescita dei ceppi di non-*Saccharomyces* su terreno YPD acidificato pH 3.5 al quale vengono aggiunte dosi crescenti di K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in modo tale da avere in piastra concentrazioni finali di SO<sub>2</sub> pari 50, 100, 200 e 300 ppm. La crescita dei ceppi a ciascuna concentrazione di SO<sub>2</sub> verrà osservata nei 3 giorni successivi all'inoculo.

**b) Presenza del carattere Killer**

Il fenotipo killer verrà evidenziato su terreno agarizzato contenente blu di metilene, tamponato a pH 4,5. Colture di 48h vengono strisciate su piastre contenenti il terreno seminato per inclusione con una sospensione del ceppo sensibile NCYC1006. Le piastre verranno osservate dopo 3-5gg per la comparsa di un alone, dove non vi è crescita del ceppo sensibile, circondato da un alone blu scuro dovuto alla presenza di cellule non vitali. I ceppi che mostreranno attività killer verranno valutati (per tale attività) anche nei confronti dei principali starter enologici del commercio appartenenti alla specie *S. cerevisiae*.

**c) Produzione di idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S)**

Colture di 48h verranno inoculate su terreno Biggy agar (Oxoid) contenente solfito di bismuto che reagendo con l'idrogeno solforato prodotto dal lievito darà una colorazione marrone. Le piastre incubate a 26°C verranno osservate dopo 4

gg. L'intensità della colorazione è in relazione con la quantità di idrogeno solforato prodotto dal lievito; verrà così adottata una scala arbitraria da 0 a 4 per definire tale intensità.

**d) Presenza di attività enzimatiche idrolitiche**

✓ Attività glicosidasica e  $\beta$ -glucosidasica

L'interesse a ricercare la presenza di enzimi idrolitici, come le glicosidasi e  $\square$ -glucosidasi, in lieviti non-*Saccharomyces* si basa sulla potenzialità di tali enzimi di incrementare l'aroma varietale e quindi la tipicità di un vino. Tra gli aromi varietali, i terpenoli o alcol terpenici sono presenti nei mosti e nei vini prevalentemente legati agli zuccheri con i quali formano complessi glicosidici privi di odore. La liberazione di questi precursori aromatici può avvenire ad opera di enzimi idrolitici come le glicosidasi e  $\square$ -glucosidasi.

La presenza di glicosidasi verrà rilevata su terreno contenente rutina (quercitina-3-rutinoside) Le piastre vengono incubate a 26°C e osservate fino a tre settimane per la comparsa di un alone di chiarificazione dovuto all'idrolisi della rutina.

La presenza di attività  $\beta$ -glucosidasica viene rilevata su terreno contenente arbutina (idrochinone- $\beta$ -D-glucopiranoside) come unica fonte di carbonio. Le piastre, incubate a 26°C vengono osservate fino a 14 gg per la comparsa di una patina marrone, indicativa dell'avvenuta idrolisi dell'arbutina. Per verificare un eventuale inibizione da glucosio il terreno verrà addizionato di 0,5% di tale zucchero. Per definire l'intensità del colore viene adottata una scala arbitraria da 0 a 4.

✓ Attività esterasica

Gli esteri rappresentano un'importante gruppo di composti volatili sintetizzati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. Essi conferiscono al vino un flavour caratteristico. La capacità quindi di idrolizzare gli esteri potrebbe incidere negativamente sulla qualità organolettica di un vino. Uno studio rivolto alla distribuzione dell'attività esterasica nei lieviti che interessano il settore enologico ha messo infatti in evidenza come tale attività risulta piuttosto

contenuta tra le specie vinarie in "sensu strictu" mentre era più elevata in quelle specie associate alla bacca d'uva e in quelle considerate inquinanti.

Il saggio per la produzione di esterasi viene effettuato stemperando le cellule in un tampone contenente p-nitrofenilacetato (pNPA). L'attività è rilevata osservando la comparsa di una colorazione gialla dovuta all'idrolisi del pNPA e conseguente liberazione del p-nitrofenolo di colore giallo. L'intensità della colorazione viene definita arbitrariamente con valori da 0 a 2.

✓ *Attività proteasica*

Nei lieviti non-*Saccharomyces* è molto diffusa l'attività peptidasi delle proteasi acide esocellulari. L'azione di questi enzimi esercita una significativa influenza sulla stabilità proteica del vino, favorisce la fermentazione alcolica e malolattica in seguito all'incremento di azoto assimilabile ed inoltre aumenta il contenuto di precursori di alcuni composti secondari della fermentazione quali esteri ed alcoli superiori.

La presenza di attività proteasica viene rilevata strisciando le colture su terreno solido contenente caseina di Hammarsten come fonte di azoto. Le piastre incubate a 26°C vengono osservate dopo 7 gg per la comparsa di un alone di chiarificazione la cui ampiezza è correlata alla quantità di proteasi prodotte.

• Valutazione caratteri enologici mediante saggi in beuta

I ceppi con attività idrolitiche ( $\square$ -glucosidasi, proteasica) più elevate verranno ulteriormente valutati attraverso prove di fermentazione in beuta.

• *Attività  $\beta$ -glucosidasi*

I lieviti vengono cresciuti in terreno liquido. L'attività  $\beta$ -glucosidasi viene dosata sul surnatante colturale. La quantità di p-nitrofenolo (pNP) liberato dal p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranoside (pNPG) utilizzato come substrato della reazione viene misurata, spettrofotometricamente.

▪ *Attività proteolitica*

I lieviti vengono inoculati in terreno liquido contenente caseina di Hammarsten come fonte di azoto. L'attività proteolitica extracellulare viene valutata dosando

la tirosina ed il triptofano liberati dal substrato proteico. La concentrazione di tali composti verrà determinata spettrofotometricamente ( $\lambda=650$  nm).

I ceppi che hanno mostrato caratteri enologici meno idonei per il processo di vinificazione (bassa resistenza alla SO<sub>2</sub>, elevata produzione di H<sub>2</sub>S, presenza carattere killer nei confronti di alcuni ceppi commerciale di *Saccharomyces*, minore attività proteasica e glucosidasi) per semplice eliminazione non verranno impiegati per il saggio successivo.

**Fase 3 (4 mesi) Valutazione dell'attitudine enologica di 90 ceppi di lievito mediante microfermentazioni** (180 fermentazioni su 140 ml di mosto)

I ceppi valutati per alcune caratteristiche durante la fase 2 verranno ulteriormente caratterizzati mediante prove di fermentazione in mosto pastorizzato al fine di valutare i seguenti caratteri: potere fermentativo, velocità di fermentazione, produzione di acido acetico, produzione di SO<sub>2</sub>, produzione di glicerolo e anche di polisaccaridi; la produzione e il rilascio di "polisaccaridi" (mannoproteine e glucani) durante la fermentazione alcolica da parte dei lieviti ha infatti riflessi positivi su diversi aspetti che contribuiscono alla qualità del vino. Molteplici studi hanno infatti messo in evidenza che queste macromolecole possono stimolare la fermentazione malolattica, aumentare la stabilità del colore e diminuire l'astringenza nei vini rossi, regolare la volatilità di alcuni composti aromatici e stabilizzare i vini nei confronti delle precipitazioni tartariche

Per ciascuno dei ceppi prescelti verranno quindi allestite delle fermentazioni in beuta da 200 ml corredata di valvola di Muller, contenenti 140 ml di mosto. Il mosto in ciascuna beuta verrà inoculato con il 5% della precoltura di ciascun ceppo fatta sviluppare a 25 °C per 48-h nel medesimo substrato. L'evoluzione della fermentazione verrà seguita registrando giornalmente la perdita in peso fino a termine della fermentazione (peso costante per tre giorni successivi).

Si prevede di valutare almeno 90 colture in duplicato per un totale di 180 microfermentazioni.

I suddetti fermentati saranno caratterizzati attraverso le seguenti analisi:

- L'acidità totale e volatile rispettivamente per titolazione dei campioni e dei relativi distillati in corrente di vapore.
- Il glicerolo e la SO<sub>2</sub> mediante kit enzimatici e letture spettrofotometriche
- L'etanolo per via gascromatografica sui distillati dei campioni
- I polisaccaridi tramite cromatografo HPLC equipaggiato con colonna oligo PW e rifrattometro

In questa fase il criterio selettivo sui ceppi in esame si baserà sull'analisi statistica univariata (analisi della varianza dei singoli caratteri presi in considerazione) e sull'analisi multivariata (PCA o altro) condotta sui risultati conseguiti e consentirà di individuare i 15 ceppi complessivamente più promettenti da sottoporre ad ulteriore valutazione nel corso del secondo anno.

### **2.2.2 Secondo anno di ricerca**

Durante il secondo anno verrà valutato il comportamento dei ceppi di lievito non-*Saccharomyces*, selezionati nel corso del primo anno, in fermentazioni con inoculi misti *Saccharomyces/non-Saccharomyces*.

#### **Fase 1 (4 mesi): Valutazione dell'attitudine enologica di 15 ceppi di lievito mediante microfermentazioni (32 prove su 1 litro di mosto)**

I 15 ceppi di lievito non-*Saccharomyces* scelti durante il primo anno della sperimentazione e 1 ceppo commerciale di *S. cerevisiae*, impiegato come riferimento, verranno sottoposti a prove di fermentazione in doppio su un litro di mosto standardizzato per: zucchero (21%) contenuto di azoto assimilabile (180 mg/L); la SO<sub>2</sub> verrà aggiunta in base al livello di resistenza dei ceppi selezionati non-*Saccharomyces*). Le prove saranno condotte in beute equipaggiate di valvole

di Müller analogamente a quanto descritto sopra. Il mosto in ciascuna beuta verrà inoculato con il 5% della precoltura, di ciascun ceppo selezionato, fatta sviluppare a 25°C per 48-h nel medesimo substrato. L'andamento delle fermentazioni condotte a 25°C verrà monitorato per via gravimetrica.

I fermentati verranno analizzati e caratterizzati in relazione a: etanolo, acidità totale e volatile, acido malico, glicerolo, polisaccaridi e per l'APA residuo, alcoli superiori ed altri composti volatili.

I suddetti composti saranno determinati come di seguito riportato:

- L'acidità totale e volatile rispettivamente per titolazione dei campioni e dei relativi distillati in corrente di vapore.
- Il glicerolo e l'acido malico mediante kit enzimatici e letture spettrofotometriche
- L'etanolo per distillazione/densimetria
- Gli alcoli superiori per via gascromatografica sui distillati dei campioni
- I polisaccaridi tramite cromatografo HPLC equipaggiato con colonna oligo PW e rifrattometro
- L'azoto prontamente assimilabile (APA) per via spettrofotometrica sugli OPA derivati dei campioni

L'analisi statistica univariata e multivariata dei dati ottenuti consentirà di individuare 6 ceppi con le migliori performances sia in termini di cinetica fermentativa sia per quanto riguarda la qualità dei fermentati.

**Fase 2 (4 mesi). Valutazione dell'attitudine enologica di 6 ceppi di lievito in combinazione con uno starter commerciale mediante microfermentazioni (50 prove su 1 litro di mosto)**

I 6 ceppi selezionati in fase 1 verranno sottoposti ad ulteriori prove di fermentazione in doppio, in combinazione con uno starter commerciale appartenente alla specie *S. cerevisiae*. In questo caso le fermentazioni verranno condotte su 1 litro di mosto pastorizzato e standardizzato per zucchero e contenuto di azoto assimilabile; la SO<sub>2</sub> verrà aggiunta in base al livello di resistenza dei ceppi selezionati non-*Saccharomyces*. Le colture di lievito *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces* verranno inoculate secondo il seguente schema:

- (i) inoculo contemporaneo con quantità uguali di ciascun ceppo:  $1 \times 10^6$  cell/ml
- (ii) inoculo contemporaneo con quantità diverse di inoculo:  $1 \times 10^6$  cell/ml di *S. cerevisiae* e  $3 \times 10^6$  cell/ml di non-*Saccharomyces*;
- (iii) inoculo sequenziale con quantità uguali dei due ceppi:  $1 \times 10^6$  cell/ml di non-*Saccharomyces* e, dopo 3 gg, inoculo di  $1 \times 10^6$  cell/ml di *S. cerevisiae*.

Ulteriori prove, nelle stesse condizioni, verranno condotte in purezza con i 6 ceppi non-*Saccharomyces* e con il ceppo di riferimento di *S. cerevisiae* per lo studio e il confronto delle cinetiche di crescita di ciascun ceppo in singolo.

In totale in questa fase verranno condotte 50 prove di fermentazione (6 combinazioni  $\times$  3 modalità di inoculo in doppio più 7 fermentazioni di controllo in coltura pura in doppio).

L'andamento del processo fermentativo verrà monitorato per via gravimetrica. Inoltre, si procederà con il monitoraggio microbiologico delle fermentazioni. In particolare si effettueranno conte vitali su WL (per la rilevazione dei *S. cerevisiae* e la conta totale dei lieviti) e Agar Lisina (per la conta dei non-*Saccharomyces*) immediatamente dopo l'inoculo e dopo 2, 6, e 10 gg di fermentazione. Inoltre, a seconda della specie di appartenenza dei ceppi utilizzati verranno utilizzati altri terreni selettivi e/o differenziali.



- Al termine della fermentazione i vini verranno sottoposti ad analisi chimiche per la determinazione di: etanolo, zuccheri residui, acido acetico, acidità totale, acido malico, glicerolo, alcoli superiori e per la produzione di polisaccaridi effettuate come riportate nella fase precedente fase 1.

L'analisi statistica univariata e multivariata dei dati ottenuti consentirà di individuare le modalità di inoculo più favorevoli, le combinazioni più promettenti in termini di cinetica fermentativa e per quanto riguarda le proprietà analitiche dei fermentati. Inoltre, il confronto dei dati relativi alle cinetiche di crescita dei ceppi in purezza ed in combinazione consentirà di comprendere come i diversi ceppi possano influire gli uni sugli altri quando inoculati in combinazione.

Le migliori tre combinazioni di inoculi verranno utilizzati su scala semi-industriale (10hl) nel corso del terzo anno di ricerca.

### **Fase 3 (4 mesi).**

#### **A) Valutazione dell'attitudine enologica di 3 combinazioni di lievito mediante microfermentazioni ( 12 prove su 1 litro di mosto)**

In questa fase si procederà con la ottimizzazione delle modalità di inoculo delle tre combinazioni scelte sulla base delle indicazioni ottenuti in fase 2.

In particolare, si effettueranno ulteriori in fermentazioni in batch da 1 litro, per verificare la combinazione di non *Saccharomyces/Saccharomyces* migliore, le quantità ottimali di biomassa e i tempi più idonei per l'inoculo.

Al termine della prova i vini verranno sottoposti ad analisi chimiche per la determinazione di: etanolo, zuccheri residui, acido acetico, acidità totale, acido malico, glicerolo, esteri, alcoli superiori e per la produzione di polisaccaridi effettuate come riportate nella fase precedente fase 2.

I composti volatili verranno determinati per via gascromatografica sugli estratti etere/esano dei campioni

L'analisi statistica univariata e multivariata dei dati ottenuti consentirà di individuare le modalità di inoculo più favorevoli, le combinazioni più promettenti

in termini di cinetica fermentativa e per quanto riguarda le proprietà analitiche dei fermentati.

### **B) Messa a punto analisi molecolare dei ceppi selezionati**

Nel corso del secondo anno si valuterà la possibilità di impiegare i RAPD o tecniche molecolari alternative, sempre basate sull'uso della PCR, per la biotipizzazione dei lieviti non-*Saccharomyces* ed il monitoraggio dei ceppi inoculati nel corso delle fermentazioni condotte da starter misti, in funzione delle specie di non-*Saccharomyces* selezionate al termine delle prove per le fermentazioni miste.

### **2.2.3 Terzo anno di ricerca**

Nel corso del terzo anno gli starter misti selezionati durante le prove del secondo anno verranno impiegati in prove di vinificazione su scala semi-industriale da condurre in cantina in fermentini da 10 hl al fine di individuare lo starter misto con più interessanti proprietà enologiche.

Le attività di ricerca verranno articolate in tre fasi.

#### **Fase 1 (7 mesi).**

##### **A) Ottimizzazione delle condizioni per la produzione della biomassa di lievito da inoculare.**

In questa prima fase verranno ricercate le condizioni nutrizionali e colturali ottimali per la produzione di biomassa, in forma di pasta, del lievito non-*Saccharomyces* da inoculare in coltura mista con il ceppo commerciale di *S. cerevisiae*, (il quale verrà invece addizionato al mosto in forma di LSA). Le prove verranno condotte in fermentatori da banco (Braun) da 3L equipaggiati per la rilevazione ed il controllo in continuo di diversi parametri operativi quali la temperatura, l'ossigeno disciolto, il pH. Il processo fermentativo sarà controllato in continuo mediante registrazione dei parametri fermentativi, utilizzando uno specifico software.

## **B) Ricerca preliminare di alcuni parametri ottimali di fermentazione per gli inoculi misti selezionati**

(16 prove su 2 litri di pigiato sangiovese)

In questa fase verrà valutata, per i due inoculi selezionati, l'influenza di due diversi diagrammi di temperatura e due diagrammi di ossigenazione della massa, in duplicato, che verranno definiti in funzione del ceppo di lievito selezionato nelle fasi precedenti.

A tal scopo le prove verranno condotte in laboratorio su pigiato di uve Sangiovese con fermentatori da banco (Braun) da 3L equipaggiati per la rilevazione in continuo ed il controllo di diversi parametri operativi quali la temperatura, l'ossigeno disciolto, il pH. Il processo fermentativo sarà controllato in continuo con le stesse modalità descritte nella precedente fase 1A.

Al termine della prova i vini verranno sottoposti ad analisi chimiche per la determinazione di: etanolo, zuccheri residui, acido acetico, acidità totale, acido malico, glicerolo, alcoli superiori e per la produzione di polisaccaridi effettuate come riportate nella precedente fase 2.

Il controllo degli starter misti inoculati verrà condotto sia utilizzando metodi microbiologici classici come la conta in piastra su terreni selettivi e non sia impiegando metodi di riconoscimento molecolari messi a punto precedentemente.

L'analisi statistica univariata e multivariata dei dati ottenuti consentirà di individuare le modalità di inoculo più interessanti in termini di cinetica fermentativa e per quanto riguarda le caratteristiche dei fermentati.

### **Fase 2 (1 mese) Produzione della biomassa di lievito da inoculare:**

Tale fase si rende necessaria al fine di produrre in loco la biomassa dei ceppi selezionati da inoculare nei fermentini da 10 hl (Fase 3, terzo anno). Per tale attività si rende necessario l'utilizzo di un fermentino da 3-5 hl provvisto di sistema di sterilizzazione *in situ* per ogni ceppo di non-*Saccharomyces*

selezionato e una centrifuga in continuo per il recupero della pasta di lievito prodotta in fermentino.

I fermentini e la centrifuga di proprietà del "consorzio Toscana" saranno impiegati poi anche durante la ripetizione delle prove previste al IV anno della sperimentazione e per eventuali successive preparazioni in loco di starter per la vinificazione.

### **Fase 3 (4 mesi). Inoculo degli starter misti e monitoraggio della fermentazione e caratterizzazione degli svinati.**

(27 prove su 10 hl di pigiato sangiovese)

Lo starter commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* e il lievito non-*Saccharomyces* verranno inoculati nelle vasche da 10hl secondo lo schema di processo messo a punto nella fase 1B del terzo anno di ricerca. Verranno quindi allestite 27 vasche di fermentazioni (2 modalità di inoculo X 2 diagrammi di temperatura X 2 livelli di ossigenazione X 3 repliche + 3 controlli)

Si procederà quindi con il monitoraggio microbiologico e molecolare della fermentazione. A tale scopo il mosto verrà campionato nel corso e alla fine della fermentazione e seminato su terreni selettivi e non per la conta vitale dei ceppi *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces*. Per verificare la effettiva dominanza dei ceppi inoculati verranno sottoposte al monitoraggio molecolare fino a 20 colonie tipo *Saccharomyces* e fino a 20 colonie non-*Saccharomyces*.

Durante le fermentazioni verranno eseguiti i controlli di routine per le fermentazioni in rosso (zuccheri, acidità totale e volatile). I fermentatori verranno quindi svinati quando le masse saranno giunte a secchezza.

Per indurre la malolattica, si provvederà ad inoculare un ceppo commerciale di batteri lattici nella massa di vino travasato ad una settimana dalla svinatura e portata a 18-20°C. L'evoluzione della malolattica verrà seguita attraverso cromatografia su carta e determinazione finale dell'acido malico con kit enzimatico.

Negli svinati ed nei vini dopo malolattica verranno svolte le seguenti determinazioni: glicerolo, polisaccaridi, alcoli superiori ed altri composti volatili, con le procedure analitiche descritte nella fase 2 del II° anno; gli indici di colore verranno determinati per via spettrofotometrica .

I vini verranno poi stabilizzati e, dopo due mesi di sosta in bottiglia, verranno analizzati in seguito da parte della Società Consortile Toscana S.r.l. secondo le seguenti modalità:

i vini verranno sottoposti nuovamente ad analisi chimiche (glicerolo, polisaccaridi, indici di colore alcoli superiori ed altri composti volatili) e analisi sensoriale (effettuata da parte del Panel del consorzio Toscana). I risultati ottenuti verranno sottoposti ad analisi statistica.



### 2.3 Tappe del progetto

**Isolamento/reperimento** di 100 ceppi non *Saccharomyces*.

**Identificazione** classica e molecolare ceppi incogniti



**Caratterizzazione enologica preliminare** di 100 ceppi di lievito

Saggi su piastra e in beuta

↓ *scelta di 90 ceppi di lievito*

**Microfermentazioni** su 140 ml di mosto, in doppio (180 prove)

↓ *analisi fermentati e scelta di 15 ceppi*

**Fermentazioni** su 1 litro di mosto, in doppio (32 prove)

↓ *analisi fermentati e scelta di 6 ceppi*

**Fermentazioni** su 1 litro di mosto, in doppio

6 combinazioni x 3 differenti modalità (50 prove)

↓ *analisi fermentati e scelta di tre combinazioni e 2 modalità di inoculo*

**Fermentazioni** su 1 litro di mosto, in doppio

3 combinazioni x 2 differenti modalità (12 prove)

↓ *analisi fermentati e scelta di 2 modalità di inoculo*

**Fermentazioni** su 2 litri di pigiato Sangiovese, in doppio

2 modalità inoculo x 2 diagrammi di temp. x 2 livelli ossig. (16 prove)

↓ *analisi fermentati e scelta di 2 modalità di inoculo, 2 livelli O<sub>2</sub> e Temp*

**Fermentazioni su** 10 hl pigiato Sangiovese, in triplo

Inoculo con starter misti e monitoraggio della fermentazione

(27 prove)

### 3) Cronoprogramma e suddivisone delle attività

Fase		Attività I° Anno	Unità ricerca	Ge	Fe	Ma	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di
1	<b>Reperimento ceppi e loro definizione tassonomica</b>	<b>Isolamento e reperimento ceppi</b>	An - Fi												
		<b>Identificazione classica e molecolare ceppi incogniti</b>	An - Fi												
2	<b>Valutazione caratteri enologici</b> (100 ceppi di lievito)	<b>Screening su piastra</b>	An												
		<b>Saggi in beuta</b>	An												
3	<b>Valutazione caratteri enologici</b> (90 ceppi di lievito)	<b>180 microfermentazioni in beuta</b> (90 prove in doppio su 140 ml di mosto)	Fi												



Fase		Attività II° anno	Unità ricerca	Ge	Fe	Ma	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di
1	<b>Valutazione attitudine enologica di 15 ceppi di lievito non-Sacch + 1 Sacch</b>	<b>32 fermentazioni in beuta</b> (16 prove in doppio su 1 litro di mosto)	<b>Fi</b>												
2	<b>Valutazione attitudine enologica di 6 ceppi di lievito</b> (in combinazione con uno starter commerciale)	<b>50 fermentazioni in beuta</b> (6 combinazioni x 3 differenti modalità, + 7 controlli, in doppio su 1 litro di mosto )	<b>An</b>												
3A	<b>Valutazione attitudine enologica di 3 ceppi di lievito</b> (in combinazione con uno starter commerciale)	<b>12 fermentazioni in beuta</b> (3 combinazioni x 2 differenti modalità, in doppio su 1 litro di mosto)	<b>Fi</b>												
3B	<b>Messa a punto analisi molecolare dei ceppi</b>		<b>An</b>												

Fase		Attività III° anno	Unità ricerca	Ge	Fe	M <sub>z</sub>	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di
1A	Ottimizzazione produzione della biomassa di lievito da inoculare.	Crescita microrganismi (in 2 litri di terreno nutritivo)	Fi												
1B	Ricerca parametri ottimali di fermentazione per gli inoculi misti selezionati	16 fermentazioni: 2 modalità inoculo, 2 diagrammi temp., 2 livelli ossigen. (in doppio su 2 litri di pigiato Sangiovese)	An												
2	Produzione della biomassa di lievito da inoculare con uno starter commerciale,	Moltiplicazione in fermentino da 5 hl e recupero pasta lievito	An												
3	Fermentazioni (scala semi-industriale)	Inoculo di 27 vasche 10 hl con starter misti e monitoraggio della fermentazione	Fi												
			An												
Elaborazione dati			An-Fi												

#### **4) Attrezzature utilizzate per la ricerca**

Nei laboratori del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (DIBA) dell'Università di Firenze e del Dipartimento di Scienze degli Alimenti (DiSA) dell'Università Politecnica delle Marche sono presenti tutte le attrezzature di base per la coltivazione dei lieviti e batteri come le autoclavi, i microscopi, e tutta la strumentazione di base per le analisi di routine.

Nella tabella successiva vengono comunque elencate le strumentazioni presenti nei due dipartimenti ed utilizzabili nell'ambito del progetto.

<b>ATTREZZATURA</b>	<b>FIRENZE</b>	<b>ANCONA</b>
Termostati		
Microscopio ottico		
Autoclave		
Agitatori magnetici		
Vortex		
Agitatore orbitale		
Piastre temiche		
Centrifuga		
Cappe a flusso laminare		
Cappe chimica		
Bagni termostatici		
Apparecchio per filtrazione sottovuoto		
Bilance (analitica, tecnica e idrostatica)		
Pompa peristaltica		
Deionizzatore		
Apparecchio per l'acqua ultrapura		
pH metro		
Spettrofotometro UV/Vis		
Gasromatografi		
HPLC		
Distillatore in corrente di vapore		
Distillatore		
Fermentatori 2 e 40 litri con controllo "on line" dei parametri		
Celle elettroforetiche per analisi DNA e proteine		
Citofluorimetro		
Termociclatore per PCR		
Apparato micron ultrafiltrazione a livello pilota		
Computers per elaborazione dati		

## **5) Partecipanti al progetto di ricerca**

### **Motivo di sinergia tra le Unità operative di Firenze e Ancona**

Il coinvolgimento nel progetto delle due istituzioni di ricerca si rende necessario per la complementarietà delle competenze microbiologiche classiche e molecolari, analitiche e tecnologico-fermentative dei ricercatori coinvolti.

I diversi aspetti della ricerca valutati dalle due unità durante le fasi di reperimento e di screening dei ceppi e le diverse metodologie da utilizzare durante il monitoraggio microbico delle fermentazioni pilota (classico e molecolare) da una parte sono appunto espressione di complementarietà di competenze. Dall'altra parte l'enorme mole di lavoro, soprattutto riguardo alle fermentazioni da allestire, condurre, monitorare e analizzare, giustifica la suddivisione delle altre attività di ricerca da svolgere nell'ambito del progetto.

### **Personale da attivare sul progetto**

Oltre al personale delle istituzioni di ricerca, per l'attuazione delle attività sopra descritte, è necessario l'attivazione delle seguenti collaborazioni:

- 1 unità operativa da attivare come assegno di ricerca per i primi due anni su fondi attribuiti al Dipartimento di Biotecnologie Agrarie di Firenze e per ulteriori due anni a diretto carico del Consorzio
- 1 unità operativa presso il Dipartimento di Scienze degli alimenti da attivare come borsa di studio per la frequenza al Dottorato di ricerca in Scienze biomolecolari applicate, cofinanziato al 50% dall'Università Politecnica delle Marche (tre anni) ed 1 Unità operativa come assegno di ricerca da attivarsi il secondo anno di ricerca

**Curricula dei partecipanti al progetto di ricerca****Unità di Firenze****Dott. Paola Domizio****QUALIFICA**

Ricercatore Confermato  
Presso la Facoltà di Agraria – Università di Firenze

**INDIRIZZO**

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE  
Sezione di Tecnologie Alimentari  
Via Donizetti, 6 – 5°144 Firenze  
Tel.: 0553220328; Fax 055355995 E-mail [domizio@unifi.it](mailto:domizio@unifi.it)

**CURRICULUM  
VITAE**

Nata a Pesaro il 18 maggio 1964 si è laureata con lode e dignità di stampa nell'aprile 1990 in Scienze Agrarie presso la Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Firenze. Nel 1994 ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in "Biotecnologie Microbiche" studiando la produzione di proinsulina umana ricombinante mediante il lievito *Hansenula polymorpha*. Durante il periodo del Dottorato svolge un periodo di ricerca presso il Biotechnology Research Institute di Montreal (Canada) lavorando nel laboratorio di "Microbial Technology" diretto dal Dr. Denis Groleau. Nel novembre del 1993 prende servizio come ricercatore per il gruppo di discipline n. G05 (Chimica, Industrie e Microbiologia Agraria) - presso l'Università degli Studi della Basilicata. Nel Novembre del 1996 prende servizio come ricercatore per il settore scientifico disciplinare AGR/15 (Scienze e Tecnologie Alimentari) presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Firenze dove è attualmente svolge ricerca.

**INCARICHI E  
FUNZIONI**

sua entrata in servizio come ricercatore, ha svolto diversi incarichi e funzioni dapprima presso l'Univ. Della Basilicata e poi presso quella di Firenze, nella quale tuttora opera.

rticolare

- è stata nominata componente del Comitato organizzatore dell'attività seminariale per il Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali dell'Università degli Studi della Basilicata per l'anno 1996
- E' stata nominata per gli a.a. 97/98 e 98/99 componente del Comitato organizzatore dell'orario di tutti i corsi di Laurea e Diploma della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Firenze
- Ha fatto parte delle Commissioni per l'accertamento della conoscenza della lingua straniera per gli studenti del Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari dell'Università degli Studi della Basilicata e del Diploma in Viticoltura ed Enologia dell'Università degli Studi di Firenze
- Dal 1999 fa parte del Collegio dei Docenti del Dottorato di ricerca in Scienze fisiologiche e nutrizionali, con sede amministrativa presso il Dipartimento Di Scienze Fisiologiche dell'Università di Firenze.
- Dal novembre 2001 è membro della Giunta del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie.

**ATTIVITÀ  
DIDATTICA**

Dal 1999 svolge per affidamento il modulo "Processo enologico tradizionale" (3 CFU) del corso di Enologia I attivato

nell'ambito del Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia

L'attività didattica ha compreso esercitazioni e cicli di seminari nell'ambito dei corsi di Tecniche microbiologiche, Biotecnologie delle fermentazioni e Principi di enologia per il Corso di laurea di Viticoltura ed Enologia.

E' stata inoltre responsabile delle seguenti attività didattiche esterne all'Università:

- Docente nell'ambito dello stage del corso per Divulgatori Agricoli dei Servizi di Sviluppo, svoltosi all'Istituto Sperimentale per la Zootecnia di Bella (PZ) dal 18 al 22/10/93. Tema del seminario: "Microbiologia del latte: le fermentazioni. Prove pratiche di laboratorio"
- Docente nell'ambito del corso di Formazione Regionale per "Esperto in biotecnologie Integrate" svoltosi presso il Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali dell'Università degli Studi della Basilicata dal 1/12/94 al 31/5/95. Tema dei seminari: "Produzione di proteine eterologhe e impiego dei microrganismi metilotrofi"; "L'impiego degli enzimi microbici nelle biotecnologie"
- Docente nell'ambito dello stage formativo in "Tecniche per le produzioni biotecnologiche" svoltosi presso il Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali dell'Università degli Studi della Basilicata dal 12 al 23/6/95, per gli studenti dell'Istituto Professionale per l'Agricoltura "Celso Ulpiani".
- Docente nell'ambito del Corso superiore di



"Tecnologia casearia" svolto presso l'Istituto sperimentale per la Zootecnia di Bella (PZ) dal 2 al 30/11/95. Tema del seminario: "Controllo microbiologico per un latte e formaggio di qualità"

- Docente nell'ambito del corso di aggiornamento " I difetti dei vini: origine e valutazione" svoltosi a S. Casciano Val di Pesa, 26-27 giugno 1997.
- Docente nell'ambito del Corso di formazione per Cantinieri ed operatori enologici organizzato dall'ARSIA - Regione Toscana- nel settembre '99
- Docente di Chimica delle fermentazioni nell'ambito del Corso per tecnico della produzione e del controllo di qualità della filiera viticolo-enologico, (Corso IFTS) presso l'Istituto tecnico Agrario di Siena (Maggio-luglio 2001)

**TEMATICHE  
DI RICERCA**

Ha svolto attività di ricerca principalmente su tematiche inerenti il miglioramento delle caratteristiche organolettiche del vino.

Le ricerche maggiormente caratterizzanti tale attività riguardano

- Selezione e caratterizzazione di lieviti e batteri malolattici di interesse enologico
- Attività enzimatiche dei lieviti e formazione di composti secondari ed aromi nei processi di vinificazione
- Ottimizzazione del processo di fermentazione nella produzione del Vinsanto

In questo ambito è stata responsabile di diversi progetti di ricerca con finanziamenti pubblici e privati

**PUBBLICAZIONI**

Di seguito si riporta l'elenco delle pubblicazioni scientifiche più significative che sono scaturite dalla citata attività di ricerca.

- Granchi L., Messini A., **Domizio P.**, Vincenzini M., Materassi R.: Caratterizzazione fisiologico-biochimica dei batteri malolattici isolati da vini del Chianti. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 1990 n. 4. :31-42
- Fatichenti F.; **Domizio P.**: I lieviti Flor. Rivista di Vitivinicoltura, N. 34, Anno 18, 1° semestre 1992: 35-37
- Rosi I., Vinella M., **Domizio P.**: Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. Journal of Applied Bacteriology 1994, 77, 519-527.
- Rosi I, **Domizio P.**, Vinella M., Salicone M.: Hydrolysis of grape glycosides by oenological yeast  $\beta$ -glucosidases. Proceedings of the 8th International Flavor Conference, 6-8 Luglio 1994. Cos, Greece, Elsevier Science, Amsterdam. The Netherlands: 1623-1635.
- Rosi I, **Domizio P.**, Vinella M.: Idrolisi di glicosidi estratti da uve, ad opera di  $\beta$ -glucosidasi prodotte da lieviti di interesse enologico. Workshop CNR-RAISA: I lieviti Saccharomyces e non Saccharomyces nella Biotecnologia della fermentazione alcolica. Potenza 14-15 Settembre 1994, 91-100.
- Rosi I., Vinella M., **Domizio P.**: Influenza delle condizioni di sviluppo sulla biosintesi di  $\beta$ -glucosidasi da parte di Debaryomyces hansenii. Workshop CNR-RAISA: I lieviti Saccharomyces e non Saccharomyces nella Biotecnologia della fermentazione alcolica. Potenza 14-15 Settembre 1994, 83-90.
- Suzzi G., Romano P., Vannini L., Turbanti L., **Domizio P.**: Cell-Recycle Batch Fermentation (CRBF) by using immobilized cells of flocculent Saccharomyces cerevisiae wine strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology Vol 12:1, 25-27 1996

- Romano P., Suzzi G., Brandolini V., Menziani E., **Domizio P.** : Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by Automated Multiple Development (AMD). Letters in Applied Microbiology
- Suzzi G., Romano P., **Domizio P.**, Fatichenti F.: Interrelations between immobilized yeast strains and byproducts during cell-recycle batch fermentation in winemaking. Atti dell' International Symposium on yeasts: "Yeast Growth and differentiation: Biotechnological, Biochemical and Genetic Aspects" Edimburgh 27-31 Agosto
- Romano P., Suzzi G., **Domizio P.**, Ciani M. Biodiversità dei lieviti non-*Saccharomyces* in una fermentazione spontanea di mosto Trebbiano dell'Emilia Romagna. Atti del 25 Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia 27-30 Settembre 1995, Porto Conte (Alghero).
- Romano P., Suzzi G., **Domizio P.**, De Simone G., Turbanti L., Polsinelli M.: La fermentazione spontanea dei mosti condotta da ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* con fenotipi diversi. Atti del Convegno congiunto dell'Associazione di Biologia cellulare e del Differenziamento; Associazione Genetica Italiana; Società Italiana di Biofisica e Biologia molecolare; Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche. Montesilvano Lido (PE) 2-6 Ottobre 1995.
- **Domizio P.**, Lanorte M., Marchese R., Suzzi G., Romano P.: Utilizzazione di spore immobilizzate di *Saccharomyces cerevisiae*. Atti del Convegno Raisa su Ricerca Biotecnologica al Servizio del Consumatore attraverso l'Industria Alimentare. Bologna 20-21 Novembre 1995.
- Romano P., Suzzi G. **Domizio P.** Fatichenti F.: Secondary products formation as a tool for discriminating non-

Saccharomyces wine strain. Antonie van Leeuwenhoek,. 71: 239-242, 1997.

- Rosi I., Vinella M., **Domizio P.** 1996 Optimization of growth conditions on biosynthesis of extracellular  $\alpha$ -glucosidase by *Debaryomyces hansenii*. Abstract 9th International Symposium on Yeasts. 25-20 August , Sydney, Australia, p. 49
- Rosi I., Vinella M., **Domizio P.** 1996 Utilizzo di  $\alpha$ -glucosidasi prodotte da lievito nell'industria delle bevande: idrolisi di glicosidi terpenici provenienti da diverse uve. Atti Convegno AAA Biotec, Biotecnologie Avanzate in Agricoltura, Alimentazione ed Ambiente, Ed. Ferrara Fiere, Vol. II, pp.393-403.
- Rosi I., **Domizio P.**, Fia G., Vinella M. 1997 Production and properties of  $\alpha$ -glucosidase by wine related yeasts. Book of Abstract 18th ISSY-Yeast Nutrition and natural Habitats-, 24-29 August, Bled, Slovenia, (Raspor P.et al. Eds.) Published by Biotechnological Faculty, University of Ljubljana p. L9-4
- Rosi I., **Domizio P.**, Fia G. 1997 Characterization of esterase activity in wine related yeasts. Book of Abstract 18th ISSY-Yeast Nutrition and natural Habitats- 24-29 August, Bled, Slovenia, (Raspor P.et al: Eds.) Published by Biotechnological Faculty, University of Ljubljana p. P9-03
- Rosi I., **Domizio P.**, Ferrari S., Zini S., Picchi M. 1998 Influenza di diversi ceppi di batteri malolattici sulla qualità del vino VigneVini N. 7/8, 60-63
- Rosi I., **Domizio P.**, Fia G., Ugolini S., Agnoletto R. 1998. Costituzione di una banca di lieviti da vino. studio dellaloro biodiversità e selezione dei ceppi presenti nell'areale del Chianti classico. Atti del Convegno "Biodiversità dei lieviti e qualità del vino nel territorio del Chianti Fiorentino".

Tavarnelle Val di Pesa, 12 dicembre 1998. pp 19-35.

- Riccio P., Rossano R., Vinella M., **Domizio P.**, Zito F., Sansevrino F. D'Elia A. and Rosi I. 1999 Extraction and immobilization in one step of two  $\alpha$ -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 123-129.
- Rosi I., **Domizio P.**, Ferrari S., Zini S., Picchi M. 1999 Influence des différentes cultures starter de bactéries malolactiques sur la qualité du vin *Revue Française d'Oenologie* N. 179, 26-29
- Rosi I., **Domizio P.**, Fia G. Lencioni L. 1999. La produzione di macromolecole da parte di lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. atti del Convegno XXIV Momevi "Nuove acquisizioni sull'elaborazione di vini bianchi di pregio" *Notiziario Tecnico* N. 58, Editore CRPV. Diegaro di Cesena (FO), pp.107-112.
- Ugolini S., Fia G., **Domizio P.**, Rosi I. 1999 Population dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spontaneous wine fermentation in two wineries of the Chianti area. XIX International Conference on Yeast genetics and Molecular Biology, Rimini, Italy, 25-30 May 1999. *Current Genetics* 35: n. 3-4. p.373.
- Fia G., Ugolini S., Agnoletto R., **Domizio P.**, Rosi I. 1999. Alcoholic fermentation of Chardonnay grape juice by a mixture of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain: dominance or coexistence? XIX International Conference on Yeast genetics and Molecular Biology, Rimini, Italy, 25-30 May 1999. *Current Genetics* 35: n. 3-4. p.301
- Rosi I., Gheri A., **Domizio P.**, Fia G. 2000 Production de macromolécules parietales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Revue des Oenologues* n. 94.

18-20.

- Rosi I., **Domizio P.**, Fia G., Agnoletto R. 2000. Biodiversità della popolazione di lieviti presente nel corso della fermentazione di mosti di uve Sangiovese. Proc. Intern. Symposium "Il sangiovese", 15-17 February 2000,
- **Domizio P.**, Rosi I.: Controllo della presenza di lieviti Brettanomyces/Dekkera durante il processo di vinificazione e affinamento del vino. VigneVini 7/8 2003

### **Dott. Livio Iencioni**

#### **QUALIFICA**

Ricercatore Confermato

Presso la Facoltà di Agraria – Università di Firenze

#### **INDIRIZZO**

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE

Sezione di Tecnologie Alimentari

Via Donizetti, 6 – 5°144 Firenze

Tel.: 0553220335; Fax 055355995 E-mail [lencioni@unifi.it](mailto:lencioni@unifi.it)

#### **CURRICULUM VITAE**

Nato a Lucca il 30 giugno 1954, laureatosi con lode nel dicembre 1979 in Scienze Agrarie presso l'Università degli Studi di Pisa, nel 1982 ha conseguito l'abilitazione all'esercizio della Professione di Agronomo.

Dal 1982 al 1987 ha collaborato con l'Istituto di Industrie Agrarie dell'Università di Pisa per ricerche sull'utilizzo di proteine vegetali in campo alimentare.

Nel 1987 consegue il titolo di Dottore di ricerca in "Colture erbacee da olio e da proteina", studiando le problematiche inerenti la utilizzazione di concentrati proteici fogliari in prodotti lattiero-caseari.

Nello stesso anno usufruisce di una borsa di studio CNR di sei mesi, presso The Institute of Food Science della Cornell University, per studiare effetti della modificazione di proteine alimentari sulle caratteristiche funzionali delle proteine stesse.

Dal 1988 al 1992 presta servizio come Tecnico laureato e poi come Funzionario tecnico, presso l'Istituto di Chimica Agraria dell'Università degli Studi di Pisa, occupandosi soprattutto degli effetti di stress ambientali sul metabolismo cellulare.

Dal 1993 fino al 1997 è stato Ricercatore universitario presso l'Università degli Studi della Basilicata, per le discipline del settore G08A: Scienze e tecnologie alimentari (prima G05 :Chimica, Industrie e Microbiologia Agraria)

Dal 1997 è stato chiamato dalla Facoltà di Agraria dell'Università di Firenze e fa parte del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie- Sezione di Tecnologie Alimentari, dove continua a svolgere le ricerche nel settore degli alimenti, ed in particolare del vino, nell'ambito di diversi progetti di ricerca dei quali è stato coordinatore e collaboratore.

## **INCARICHI E FUNZIONI**

Dalla sua entrata in servizio come ricercatore, ha svolto diversi incarichi e funzioni dapprima presso l'Univ. Della Basilicata e poi presso quella di Firenze, nella quale tuttora opera.

In particolare, dal 1993 al 1995 è stato rappresentante dei ricercatori nel Consiglio di Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari dell'Università della Basilicata e, sempre presso la stessa, dal 1995 al 1997 è stato membro della Giunta del Dipartimento di Biologia, Difesa e

Biotechnologie Agro Forestali.

Dal 1996 al 2004 è stato Segretario prima del Diploma Universitario e poi del Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia presso l'Università di Firenze e, dal 1999 fa parte del Collegio dei Docenti del Dottorato di ricerca in Scienze fisiologiche e nutrizionali, con sede amministrativa presso il Dip. Di Scienze fisiologiche dell'Università di Firenze.

**MATERIE DI  
INSEGNAMENTO**

Dalla Facoltà di Agraria dell'Università di Firenze ha avuto in affidamento i seguenti corsi:

Corso di Laurea in Viticoltura ed Enologia: Corso integrato di Enologia I, modulo di Processo enologico tradizionale e modulo di Processo enologico speciale; Corso integrato di "Enologia II, modulo di Gestione della qualità

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie v.o.: Corso integrato di Qualità dei prodotti alimentari, modulo di Gestione della qualità nell'industria alimentare (equip. con modulo di Gestione della qualità del C.I. Enologia I)

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari v.o.: Corso integrato di "Qualità dei prodotti alimentari, modulo di Gestione della qualità nell'industria alimentare

**TEMATICHE  
DI RICERCA**

L'attività di ricerca svolta ha riguardato tematiche relative alle tecnologie, alla chimica ed alla biochimica nell'ambito delle Industrie Agrarie e della Chimica Agraria. In questo ambito è stato responsabile di diversi progetti di ricerca con finanziamenti pubblici e privati

Attualmente la sua attività di ricerca riguarda soprattutto la valutazione delle caratteristiche qualitative degli alimenti,



in particolare dei prodotti enologici, in relazione ai processi tecnologici di produzione e di conservazione.

In questo ambito si inseriscono le ricerche volte alla ricerca di marker chimici correlati con le caratteristiche sensoriali dei prodotti alimentari.

Un'altra area di ricerca è lo studio delle relazioni fra specifiche di prodotto, materia prima e processo per l'ottimizzazione delle condizioni operative delle diverse fasi della filiera produttiva.

**PUBBLICAZIONI** Di seguito si riporta l'elenco delle pubblicazioni scientifiche più significative che sono scaturite dalla citata attività di ricerca.

R. Fiorentini, A.M. Pisanelli, L. Lencioni, C. Galoppini (1980) - Produzione di concentrati proteici fogliari a destinazione umana. 2: caratterizzazione analitica dei prodotti. *Industrie Alimentari*, 19 (3), 220-223.

A.M. Pisanelli, L. Lencioni (1985) - Gli amminoacidi liberi nel formaggio. In: *Aggiornamenti sulle Metodologie Analitiche per il Controllo della Qualità dei Formaggi*. Monografia CNR-IPRA n.5, 47-61.

G. Andrich, L. Lencioni, R. Fiorentini, G. Anelli (1986) - A kinetic model to evaluate the ensilage behaviour of alfalfa press-cake. *Rivista di Ingegneria Agraria*, 17 (1), 28-33

L. Lencioni, A.M. Pisanelli, E. Baldi, R. Fiorentini (1987) - Sheep milk cheese made with the addition of alfalfa leaf protein concentrate. Proteolysis during ripening. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 20 (4), 277-281.

E. Baldi, L. Lencioni, R. Fiorentini, C. Galoppini (1988) - Caratterizzazione chimica e funzionale di farine disoleate di girasole. Cong. su Stato Attuale e Prospettive delle Colture Oleaginose Erbacee in Italia, Pisa, Italia, febbraio 24-26

L. Lencioni, A.M. Pisanelli, E. Baldi, R. Fiorentini (1989) - Sheep-milk cheese made with the addition of alfalfa leaf protein concentrate: Acidity and texture during ripening. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 22, 81-87.

G.Lotti, L. Lencioni (1990) - Contributo alla conoscenza dello stato dello zolfo nel terreno. *Agrochimica*, 34 (1-2), 165-178.

L. Lencioni, G. Lotti, A. Ranieri (1992) - Influenza dello zolfo sullo sviluppo delle piante di colza e sulla composizione dell'olio. *Agrochimica*, 36, 185-192.

L. Lencioni, G. Lotti, A. Saviozzi (1993) - Indagini sui sorghi da granella. II) Composizione acidica ed amminoacidica. *L'Informatore Agrario*, 47 (11), 38-40.

A. Ranieri, L. Lencioni, G. Schenone, G.F. Soldatini (1993) - Glutathione-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open-top chambers. *Journal of Plant Physiology*, 142, 286-290.

A. Ranieri, G. Schenone, L. Lencioni, G.F. Soldatini (1994) - Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *Journal of Environmental Quality*, 23 (2), 360-364

E. Monteleone, G. Caporale, L. Lencioni, F. Favati, M Bertuccioli (1994) - Optimization of virgin olive oil quality in

relation to fruit ripening and storage. In: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. Proceedings of the 8th Int. Flavour Conference, July 6-8, Kos, Greece. G. Charalambous (Ed),. Elsevier Science (Publ), Amsterdam, The Netherlands, pp. 397-418.

F. Favati, L. Lencioni, V. De Vitis, D. Melfi, R. Fiorentini (1995) - Functional properties and physical characteristics of sunflower proteins defatted by supercritical CO<sub>2</sub>. .In: I Fluidi Supercritici e le Loro Applicazioni. Proceedings of the 3th Congresso Nazionale, September 3-6, I. Kikic and P. Alessi (Ed), Trieste, Italy, pp. 121-128.

L. Lencioni, A. Ranieri, S. Fergola, G.F. Soldatini (1997). Photosynthesis and metabolic changes in leaves of rapeseed grown under long-term sulfate deprivation. Journal of Plant Nutrition, 20 (2&3), 405-415

M. Bertuccioli, S. Ferrari, L. Lencioni (1997) Estrazione in macerazione delle componenti fenoliche di uve di Sangiovese relative a diverse tesi sperimentali del progetto Chianti Classico 2000. In: Progetto di Ricerca e Sperimentazione "Chianti Classico 2000". 2: Progressi nelle indagini sanitarie e chimico-enologiche, Consorzio Vino Chianti Classico (Ed), San Casciano V.P. (Firenze).

L. Lencioni, F. Galgano, M. Bertuccioli (1998) Metodo di estrazione per la determinazione degli acidi grassi liberi nel formaggio  
Industrie Alimentari, 37, 171-175

I. Rosi, P. Domizio, G. Fia, L. Lencioni. (1999). Produzione di

macromolecole da parte di lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*. In: Atti Convegno XXIV MOMEVI "Nuove acquisizioni sull'elaborazione di vini bianchi di pregio", 22-25 aprile 1999, CRPV (Ed.), Faenza, Italy, Tec&Doc (Publ, Paris, pag 117-112.

M. Bertuccioli, S. Ferrari, A. Gheri, L. Lencioni, S.Zini. S. Porcinai (1999)

Relazione fra il profilo di qualità del vino ed il comportamento vegeto -produttivo di alcuni cloni di "Sangiovese" allevati in cinque aree del "Chianti Classico".

In: Progetto di Ricerca e Sperimentazione "Chianti Classico 2000". 3: Comparazione di cloni omologati e selezione clonale. Consorzio Vino Chianti Classico (Ed), San Casciano V.P. (Firenze), pag. 43-72.

L. Lencioni - M. Bertuccioli, (2000). Esperienze di microossigenazione in vini Sangiovese. In: relazione Convegno Enoforum 2000, S.I.V.E. (Società Italiana di Viticoltura ed Enologia) 25-26 maggio 2000. Montesilvano-Pescara (Italy)

M. Bertuccioli, S. Ferrari, S. Zini, A. Siliani, L. Lencioni, (2000). Relazione fra le tecniche di inerbimento e il profilo di qualità del vino. In: Progetto di Ricerca e Sperimentazione "Chianti Classico 2000". 4: Risultati sulla gestione del suolo in viticoltura.. Consorzio Vino Chianti Classico (Ed), San Casciano V.P. (Firenze), pag. 29-51.

F. Galgano - F. Favati - L. Lencioni - M. Bertuccioli, (2001). Characterisation of a marketable cheese through the definition of its sensory profile. case study: the grana padano cheese. *Industrie Alimentari*, 40 (11), 171-175

M. Bertuccioli, I. Rosi, L. Lencioni, S. Zini, A. Siliani, (2001)  
Influenza dell'ossigeno sul profilo sensoriale del vino.  
L'esempio del vino da uve Sangiovese. Industria delle  
Bevande, 30 (175), 489-495.

## **UNITA' DI ANCONA**

### **Prof. Maurizio Ciani**

Professore associato presso la Facoltà di Scienze dell'Università Politecnica delle Marche (AGR 16) è membro di diverse società italiane e internazionali di Microbiologia.

### **Attività Accademica.**

Nel 2004 consegue l'idoneità a professore Ordinario presso l'Università della Tuscia.

Nel 1999 consegue l'idoneità per professore Associato (1° tornata 1999) presso l'Università di Reggio Calabria. Professore associato dal 1.10.2000.

Nel 1993 usufruisce di una borsa di studio C.N.R. presso il Department of Viticulture and Enology di Davis, California USA (06.12.1993).

Ricercatore universitario dal 1990 e confermato dal 1993 presso il Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università degli Studi di Perugia.

1984 consegue la laurea in Scienze agrarie presso l'Università di Perugia.

### **Attività Scientifica.**

Vincitore di una Borsa di Studio nazionale "Tommaso Castelli" messa a disposizione dal "Laboratorio Zimotecnico" di Firenze. Nel 1996 ottiene una citazione ufficiale tra i lavori più originali ed innovativi (Journal Highlights)

comparsi sulle varie riviste della American Society for Microbiology per il lavoro "Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells" pubblicato in Appl. Environ. Microbiol.

Nel 1997 il lavoro "Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces" pubblicato in Am. J. Enol. Vitic. è stato scelto e premiato dalla American Society for Enology and Viticulture come miglior lavoro dell'anno 1996. E' stato chiamato a valutare dei lavori per alcune riviste internazionali (Food Microbiol., Enz. Microb. Technol, Ital.J. Food Sci., J. Agr. Food Sci. etc).

Nel 2002 è stato editore di un libro a diffusione internazionale di microbiologia enologica "Biodiversity and biotechnology of wine yeasts" al quale hanno contribuito tra i migliori specialisti mondiali in tale campo di ricerca.

E' stato il responsabile scientifico e coordinatore di diversi progetti di ricerca.

Collabora con diverse aziende vinicole nella ricerca e sperimentazione in campo enologico

Linee di ricerca:

Isolamento, selezione, caratterizzazione ed ecologia dei lieviti vinari. Nuove biotecnologie di fermentazione applicate all'industria enologica (colture immobilizzate, colture multistarter)

Studi sulla fisiologia dei lieviti vinari: caratterizzazione delle attività metaboliche di lieviti di interesse enologico, metabolismo respiro-fermentativo, produzioni di metaboliti di interesse per le caratteristiche finali dei vini.

Studio dei composti antimicrobici prodotti da lieviti: caratterizzazione biochimica e molecolare di composti antimicrobici di interesse industriale e alimentare.

### **Pubblicazioni recenti significative**

- 1- **Ciani, M.**, Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Word J. Microbiol. Biotechnol. 14: 199-203

- 2- **Ciani, M.** 1998. Wine vinegar production using wines made with different yeast species. *J. Sci. Food Agric.*78: 290-294.
- 3- **Ciani, M.**, Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 247-252
- 4 - **Ciani, M.**, Fatichenti, F. 1998. Metabolismo energetico di *Candida stellata* DBVPG 3837. Convegno Congiunto ABCD-AGI-SIBBM-SIMGBM 1-4 Ottobre 1998 Montesilvano (PE)
- 5 - **Ciani, M.** Fatichenti, F.1999 Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 203-206
- 6 - **Ciani M.** Fatichenti F. 1999. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076: properties and activity on apiculate yeasts. XIX Int. Conference on yeast genetics and molecular biology. p. 298. Rimini, Italy 23-30 May.
- 7 - Picciotti G., **Ciani M.**1999 Valutazione di alcuni caratteri fisiologici e tecnologici di colture selezionate per vinificazione. *Industrie delle Bevande* 28: 243-247
- 8 - **Ciani M.** Pepe V. 1999. Influenza della microflora sulle caratteristiche analitiche e sensoriali dei vini. *L'Enotecnico* 35:99-103
- 9 - Ferraro, L., Fatichenti, F. and **Ciani M.** 2000. Pilot scale vinification process by immobilised *Candida stellata* e *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* 35:1125-1129
- 10 - **Ciani M.** Menghini L., Mariani F., Pagiotti R., Menghini A. and Fatichenti F. 2000. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts. *Biotech. Lett.* 22: 1007-1010
- 11 **Ciani M.** and Fatichenti F. 2000. Innovative fermentation technologies in winemaking. ., in "Recent Res. Devel. in Biotech. and Bioeng." Eds. S.G. Pandalai Vol. 3 pp. 95-106 Research Signpost, Trivandrum, India
- 12-**Ciani M.**, Ferraro, F. and Fatichenti, F. 2000 Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 698-703
- 13-**Ciani, M.** 2001. Allestimento di starter con colture microbiche miste. *Industrie delle Bevande.* 30: 35-39

- 14- **Ciani M.** and Fatichenti F. 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 67:3058-3063
- 15 - **Ciani M.** and Pepe V. 2002 The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. J. Sci. Food Agric. 82: 573-578
- 16- **Ciani M.** F. Fatichenti and Mannazzu I. 2002. Yeasts in winemaking biotechnology. In *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. (Ciani M. Ed.) pp. 111-123 Research Signpost, Kerala, India.
- 17 - Mannazzu I, Clementi F. and **Ciani M.** 2002. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters In *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. (Ciani M. Ed.) pp. 19-33 Research Signpost, Kerala, India.
- 18- **Ciani M.** 2002. Biodiversity and biotechnology of wine yeasts. Research Signpost, Kerala, India.. ISBN 81-7736-120-1
- 19- **Ciani M.** Maccarelli, F. and Fatichenti, F. 2003. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 419-422
- 20 -Selvi S., Cardinali, G. and **Ciani , M.** 2003.Variability of *HXT2* at the protein and gene level among the *Saccharomyces sensu stricto* group. FEMS Yeast Research. 4: 247-252
- 21- Marinangeli, P, Angelozzi, D., Clementi, F., **Ciani, M.** and Mannazzu, I Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes: a new way towards wine strains identification. 23<sup>rd</sup> YSSY 26-29 August 2003 , Budapest, Hungary
- 22- **Ciani, M.** 2003 Processi biologici per il risanamento di siti contaminate: risultati di un biennio di attività. 31° Congresso Nazionale S.I.M. Roma 19-22 Ottobre 2003
- 23- Birch, R. M., **Ciani, M** and Walker, G. M. 2003 Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts. J. Wine Res, 14: 3-15.
- 24- **Ciani, M**, Mannazzu, I, Marinangeli, P., Clementi, F. and Martini, A. 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to



- spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 85: 159-164
- 25-Marinangeli, P., Angelozzi, D., **Ciani, M.**, Clementi, F. and Mannazzu, I. 2004. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Research*. 4: 427-435
- 26-Comitini, F., Di Pietro, N., Zacchi, L, Mannazzu, I and **Ciani, M.** 2004. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterisation. *Microbiology SGM*. 150:2535-2541
- 27-Comitini, F., De Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I and **Ciani, M.** 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/ Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 235-240.
- 28- Marinangeli, P., Clementi, F., **Ciani, M.** and Mannazzu, I. 2004. *Sed1* polymorphism within the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Research* 5: 73-79.
- 29-Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G. and **Ciani, M.** 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*. 5: 237-245.
- 30-Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F. Mannazzu I. and **Ciani, M.** 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterisation of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 99: 105-111.

### **Prof. Ilaria Maria Mannazzu**

Ilaria Maria Mannazzu, nata a Sassari il 17/04/1965. Da ottobre 2001 è Professore Associato di Microbiologia Agraria presso la Facoltà di Agraria dell'Università degli studi di Ancona (ora Università Politecnica delle Marche). 1989: si laurea in Scienze Agrarie, Università degli Studi di Sassari (110/110 con lode e dignità di stampa). 1991: prende servizio come Ricercatore di Microbiologia presso la Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Ancona. 1991-1993 e

1998: svolge attività di ricerca presso il laboratorio del Dr. Peter Sudbery, Department of Molecular Biology and Biotechnology della Università di Sheffield (UK). 1994: consegue il titolo di Dottore di Ricerca in Biotecnologie Microbiche, VI ciclo, Università di Sassari e Ancona. E' membro del collegio dei docenti del Corso di Dottorato di Ricerca in Alimenti e Salute presso l'Università Politecnica delle Marche e, oltre alle attività didattiche svolte nell'ambito dei corsi in affidamento (Microbiologia Enologica, Microbiologia Agraria, Microbiologia del Suolo, Biotecnologia dei Microrganismi, Chimica delle Fermentazioni, Igiene e controllo qualità), svolge attività didattica e seminariale nell'ambito di corsi di Dottorato e Master. Ha svolto attività di ricerca principalmente presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica "A. Capriotti" dell'Università degli Studi di Sassari (1989-1991), il Department of Molecular Biology and Biotechnology dell'Università di Sheffield (U.K.) (1991-1993 e 1998) ed il DiBiAgA, poi DiSA dell'Università Politecnica delle Marche (dal 1993 al presente) prevalentemente su tematiche inerenti la genetica e fisiologia di microrganismi di interesse biotecnologico. Le ricerche maggiormente caratterizzanti la sua attività riguardano: Isolamento di promotori di lievito e loro impiego per la produzione di proteine eterologhe; Risposta cellulare a metalli pesanti nel lievito *Hansenula polymorpha*, Messa a punto di metodi molecolari per la identificazione di lieviti vinari e per la rilevazione di patogeni negli alimenti, Studio di interazioni tra microrganismi per lo sviluppo di antimicrobici naturali, Studio del metabolismo lipidico dei lieviti vinari in relazione agli arresti di fermentazione. E' stata ed è responsabile scientifico di unità operativa in due progetti Cofin (Isolamento e caratterizzazione di geni coinvolti nella resistenza ai metalli pesanti, 1998; Valutazione di parametri funzionali relativi alle membrane cellulari in ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentazione in assenza e presenza di ossigeno, 2003), è responsabile di convenzioni con enti privati e ha promosso il finanziamento privato di una borsa triennale nell'ambito del corso di dottorato in Alimenti e Salute. Ha coordinato l'attività di ricerca nei progetti "Costituzione di una banca di lieviti selezionati per il miglioramento qualitativo dei vini delle Marche" finanziato dalla Regione Marche (Reg.CEE 2081/93 Ob.5b) e "Piano di potenziamento della ricerca scientifica e tecnologica" finanziato dal MURST e

riguardante la Valorizzazione dei prodotti e degli scarti vegetali. E' socio della Società di Microbiologia Agraria, Alimentare e Ambientale (SIM3A) e della Società Italiana di Microbiologia (SIM).

### **Pubblicazioni recenti significative**

1. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1475 (2): 151-156 ( **I. Mannazzu**, E. Guerra, R. Ferretti, D. Pediconi, F. Fatichenti).
2. Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the *PMA1* promoter. (2000) *Yeast* 16: 1191-1203 (H. Cox, D. Mead, P Sudbery, M. Eland, **I. Mannazzu**, L. Evans)
3. 12 hours PCR-based method for *Salmonella* spp. detection in food. (2001) *Applied and Environmental Microbiology* 67: 977-978 (R. Ferretti, **I. Mannazzu**, L. Cocolin, G. Comi, F. Clementi).
4. Vanadium detoxification and resistance in yeast: a minireview. (2001) *Ann. Microbiol.* 5: 1-9 (**I. Mannazzu**).
5. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. (2002) *J. Appl. Microbiol* 92:297-306 (A. Ricciardi, E. Parente, M.A. Crudele, F. Zanetti, G. Scolari, **I. Mannazzu**).
6. *SED1* gene length and sequence polymorphisms in feral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5437-5444 (**I. Mannazzu**, E. Simonetti, P. Marinangeli, E. Guerra, M. Budroni, M. Thangavelu, S. Bowen, A. E. Wheals, F. Clementi).
7. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* cell wall genes: a new way towards wine strain identification. (2004) *FEMS Yeast Research* 4:427-435 (P. Marinangeli, D. Angelozzi, M. Ciani. F. Clementi and **I. Mannazzu**).
8. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. (2004) *Antonie van Leeuwenhoek*

- 85 (2), 159-164 (M. Ciani, **I. Mannazzu**, P. Marinangeli, F. Clementi, A. Martini).
9. A Synthetic Lethal Screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. (2004) *Genetics*. 166(2):707-19. (A. Care, K. Vousden, K. Binley, P. Radcliffe, J. Trevethic, **I. Mannazzu**, P. Sudbery).
10. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. (2004) *Journal of Microbiological Methods* 57: 197-206 (L. Aquilanti, **I. Mannazzu**, R. Papa, L. Cavalca, F. Clementi).
11. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterisation. (2004) *Microbiology* 150:2535-2541 (Francesca Comitini, Natalia Di Pietro, Laura Zacchi, **I. Mannazzu**, Maurizio Ciani).
12. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/ Brettanomyces* spoilage yeasts. (2004) *FEMS Microbiology Letters* 238: 235-240. (Francesca Comitini, Jessica De Ingeniis, Laura Pepe, **Ilenia Mannazzu**, Maurizio Ciani).
13. *SED1* polymorphism within the genus *Saccharomyces*. (2004) *FEMS Yeast Research* 5(1): 73-79 (Paola Marinangeli, Francesca Clementi, Maurizio Ciani, **Ilenia Mannazzu**).
14. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. (2005) *Journal of Applied Microbiology* 99(1): 105-111 (F. Comitini, R. Ferretti, F. Clementi, **I. Mannazzu**, M. Ciani).
15. Peculiarities of *flor* strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. (2005) *FEMS Yeast Research* 5:951-958 (Marilena Budroni, Severino Zara, Giacomo Zara, Giorgia Pirino and **Ilenia Mannazzu**).

#### Capitoli di libro

16. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. (2002) In "Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts" pp

- 19-33 M. Ciani (ed.) Research Signpost (Trivandrum, India) (**I. Mannazzu**, F. Clementi and M. Ciani).
17. Yeast in winemaking biotechnology. (2002) In "Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts" pp 111-123 M. Ciani (ed.) Research Signpost (Trivandrum, India) (M. Ciani , F. Fatichenti and **I. Mannazzu**).
18. Immunogold-labelling of invertase in *Hansenula polymorpha*. (2003) In "Non-conventional yeasts in Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Practical protocols" pp 117-123. K. Wolf, K. Breuning and G. Barth (eds.) Springer Company (Berlin, Heidelberg and New York) (**I. Mannazzu** and R. Strabbioli).
19. Identificazione e caratterizzazione molecolare dei lieviti vinari. (2005) In: "Microbiologia del Vino" G.A.Farris, P. Romano, M. Vincenzini (eds.) Casa Editrice Ambrosiana (Milano) (Ilaria Mannazzu and Marilena Budroni).

### **Dr. Francesca Comitini**

Francesca Comitini, nata a Jesi il 19.04.1977 e residente a Jesi, via Cesare Anconetani 45.

Nell'anno scolastico 1995-1996 conseguimento della Maturità Scientifica; nell'Anno Accademico 2000-2001 conseguimento del Diploma di Laurea presso la Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali, corso di Laurea in Scienze Biologiche, Università degli studi di Ancona, con discussione della Tesi Sperimentale dal titolo: "Studio delle interazioni tra *Saccharomyces cerevisiae* ed *Oenococcus oeni* e relative implicazioni biotecnologiche in vinificazione". Abilitazione all'esercizio della professione di Biologo conseguita a nella seconda sessione, Giugno 2002.

Novembre 2002 ammissione al IV ciclo del Dottorato di Ricerca in Scienze Biomolecolari Applicate presso la facoltà di Scienze MM.FF.NN. dell'Università Politecnica delle Marche.

Gennaio-Dicembre 2003 / Gennaio 2004-ad oggi: assunzione con contratto di Assegno di Ricerca presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, per lo studio

del biorisanamento microbiologico delle acque contaminate; delle tossine killer in modelli microbiologici lieviformi.

Attività di supporto didattico: supporto alle prove pratiche in laboratorio e partecipazione alle commissioni di esame di Biotecnologia delle Fermentazioni, Microbiologia Industriale e Microbiologia Industriale Applicata, della Facoltà di Scienze. Correlatore di varie tesi di Laurea sperimentali.

Pubblicazioni scientifiche su varie riviste internazionali, in ambito microbiologico.

### **Dr. Manuela Taccari**

Manuela Taccari è nata a Macerata il 12/08/1976

Nell'anno scolastico 1995-1996 consegue la Maturità Scientifica presso il Liceo Leonardo da Vinci di Tolentino.

Nel luglio 2003 si laurea Dott.ssa presso l'Università Politecnica delle Marche discutendo una tesi sperimentale dal titolo: "L'impiego del S.O.U.R. come tecnica respirometrica per la valutazione dell'attività microbica nel controllo ambientale".

Nel 2003 ottiene l'abilitazione alla Professione di Biologo.

Nel febbraio 2004 ottiene la Specializzazione in Tecnico Controllo e Tutela Ambientale.

3/11/2003-15/03/2003 Contratto a tempo determinato per attività di collaborazione coordinata e continuativa presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, con l'incarico di: "Valutazione della microflora anche mediante metodi respirometrici dei biobeds per il controllo delle contaminazioni puntiformi da composti xenobiotici"

17/05/2004-31/07/2004 Contratto a tempo determinato per attività di collaborazione coordinata e continuativa presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, con l'incarico di: "Valutazione della microflora anche mediante metodi respirometrici di processi in bioreattore per il biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi".

22/11/2004–22/02/2005 Borsa di studio finanziata dalla Provincia di Macerata svolta presso il "Circolo il Pettiroso" di Tolentino, argomento della ricerca: "Monitoraggio dello stato di qualità dei corsi d'acqua".

01/03/2005–30/04/2005 Contratto a tempo determinato per attività di collaborazione coordinata e continuativa presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, con l'incarico di: "Definizione di indicatori microbiologici di qualità nel salame Ciauscolo, mediante tecniche molecolari".

16/05/2005 a tutt'oggi. Assegno di ricerca in tema di "Messa a punto di un bioprocesso di risanamento e ricerca di microrganismi e/o composti microbici di interesse industriale", presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche.

**Risorse umane impegnabili (mesi/uomo) nel programma**

<b>Personale</b>	<b>qualifica</b>	<b>I anno</b>	<b>II anno</b>	<b>III anno</b>
Maurizio Ciani	Professore	3	3	3
Ilaria Mannazzu	Professore	3	3	3
Manuela Taccari	Assegnista	4	3	4
Francesca Comitini	Assegnista	4	3	4
Paola Domizio	Ricercatore	5	6	6
Livio Lencioni	Ricercatore	4	5	5
Paolo Adoni	tecnico	2	3	3
Collaboratore a contratto*	Borsista	11	6	11
Collaboratore a contratto*	Assegnista	11	6	11
Collaboratore a contratto*	Assegnista	11	11	11

(\* da attivarsi da parte del consorzio)