



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



Università degli Studi  
di Sassari

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE  
AGRO-ALIMENTARI**

**Università degli Studi di Sassari**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI AGRARIE E BIOTECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI**

**SEZIONE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA**

**Peculiarità di *Saccharomyces  
cerevisiae* e quantificazione  
tramite Real-Time PCR delle  
specie microbiche panarie**

Tutor:  
Prof.ssa Marilena Budroni

Tesi di Dottorato di:  
Dott.ssa Antonella Marongiu

Coordinatore:  
Prof. Giovanni Antonio Farris

**CICLO XXI**

**2005-2008**

<b>PREMESSA</b> .....	5
<b>CAPITOLO I</b> .....	7
<b>Peculiarità genetiche e metaboliche di <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
<b>isolato da paste acide artigianali</b> .....	7
<b>Il pane in Sardegna</b> .....	8
<b>Ruolo dei lieviti</b> .....	10
<b>Biodiversità e lieviti panari</b> .....	11
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	12
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	29
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	31
<b>Ceppi e condizioni colturali</b> .....	32
<b>Identificazione</b> .....	33
<i>Estrazione DNA</i> .....	33
<i>Amplificazione delle ITS</i> .....	34
<i>Analisi di restrizione</i> .....	34
<b>Caratterizzazione molecolare</b> .....	35
<b>Analisi statistica</b> .....	38
<b>Assimilazione fonti carboniose (Kurtzman and Feil, 1998)</b> .....	38
<b>Amplificazione dei geni coinvolti nelle pathway del trealosio</b> .....	39
<b>Analisi di restrizione</b> .....	40
<b>Sequenziamento dei geni <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i></b> .....	41
<b>RISULTATI</b> .....	42
<b>L'amplificazione dei minisatelliti <i>SED1</i> e <i>DAN4</i> rivela la diversa</b>	
<b>architettura genetica di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> panario</b> .....	43

L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza .	49
L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari ....	54
L'analisi delle sequenze di <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i> rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati.....	58
<b>DISCUSSIONE</b> .....	65
L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza .	67
L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari ....	69
L'analisi delle sequenze di <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i> rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati.....	70
<b>CAPITOLO II</b> .....	72
<b>Messa a punto di un metodo molecolare mediante RealTime PCR per la quantificazione delle specie microbiche presenti nelle paste acide</b> .....	72
<b>Il lievito naturale e il lievito compresso</b> .....	73
<b>La microflora delle paste acide e la loro classificazione</b> .....	75
<b>Stabilità delle paste acide e monitoraggio dei microrganismi</b> ....	77
Metodiche basate sulla RealTime-PCR .....	79
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	82
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	84
<b>Ceppi e condizioni colturali</b> .....	85
<b>Identificazione</b> .....	85
<b>Analisi delle sequenze e progettazione di primer specie specifici</b>	86
<b>Validazione dei primer specie-specifici mediante real-time PCR. ...</b>	86
<b>RISULTATI</b> .....	88

<b>Metodo rapido di identificazione degli isolati .....</b>	<b>89</b>
<b>Costruzione di primer specie-specifici .....</b>	<b>89</b>
<b>Validazione su RealTime PCR dei primer specie specifici .....</b>	<b>92</b>
<b>Curve standard .....</b>	<b>93</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>98</b>

# PREMESSA

In questa tesi di dottorato sono stati sviluppati due temi di grande interesse per il miglioramento qualitativo dei prodotti da forno, che sono stati trattati in due capitoli separati; il primo dal titolo: “Peculiarità genetiche e metaboliche di *Saccharomyces cerevisiae* isolati da paste acide artigianali” e il secondo: “Messa a punto di un metodo molecolare mediante RealTime PCR per la quantificazione delle specie microbiche presenti nelle paste acide”.

Scopo del primo capitolo è stato analizzare le peculiarità genetiche e metaboliche dei lieviti delle paste acide utilizzate per la fermentazione di alcuni pani tradizionali sardi. In questo lavoro abbiamo determinato il grado di similitudine dei ceppi panari e di altri ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di diversa origine combinando la caratterizzazione molecolare con l'analisi di alcuni geni coinvolti nel metabolismo del trealosio, un composto chiave per la risposta allo stress.

Lo scopo del secondo capitolo è stato mettere a punto un metodo molecolare mediante RealTime PCR per quantificare le specie microbiche e monitorarne l'evoluzione nel corso dell'ottenimento e dell'utilizzazione della pasta acida, per garantire la sua stabilità nel tempo.. Sono stati progettati dei primer specie-specifici che hanno permesso la quantificazione delle specie *Saccharomyces cerevisiae*, *S. exiguus*, *Issatchenkia orientalis* *Pichia anomala* e *Lactobacillus pentosus*.

# **CAPITOLO I**

## **Peculiarità genetiche e metaboliche di *Saccharomyces cerevisiae* isolato da paste acide artigianali**

## Il pane in Sardegna

“Il pane è una manifestazione della cultura popolare che si espande in infinite variazioni di forme e di ingredienti: con e senza sale, con farine di qualità o farine povere. La storia del pane è stata sempre legata sia alla storia dell'uomo, alla sua evoluzione fisica ed intellettuale, sia a movimenti politici ed economici” (Capello, 1998). Dal punto di vista legale per pane si intende:” *il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano (farina di grano tenero, di grano duro – semola/semolato – farina integrale) acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune cui è possibile aggiungere farine di cereali maltati, estratti di malto, alfa e beta amilasi ed altri enzimi, farine pregelatinizzate di frumento, glutine, amidi alimentari e zuccheri*” (art. 3 DPR 502/98). Nella definizione sopra citata è compreso anche il pane ottenuto con farine di altri cereali (orzo, segale) ma è difficile includere la forma, lo spessore e la consistenza dei pani, dato che questi parametri sono suscettibili di ampie variazioni dipendenti dal tempo, dal luogo, e dalle occasioni in cui viene fatto il pane (Angioni, 1994).

La pasta acida o madre acida (sourdough) rappresenta, probabilmente, il primo alimento fermentato utilizzato dall'uomo ed è il risultato della miscelazione di farina e acqua lasciata riposare fino allo sviluppo di un caratteristico aroma acido (Hammes & Gänzle, 1998). Storicamente, la prima testimonianza dell'impiego di un impasto lievitato è documentata in bassorilievi egiziani datati intorno al 1500 a.C. (Von Stokar, 1956); da più di 5000 anni, inoltre, il pane ottenuto con l'impiego di madre acida fa parte della dieta europea (Währen, 1985). La madre acida è stata utilizzata come unico agente lievitante fino al 19<sup>mo</sup> secolo; attualmente è utilizzata nella produzione di alcuni pani tipici, dolci di ricorrenza e altri prodotti da forno, ed il suo utilizzo sta destando nuovo interesse nella preparazione di prodotti ottenuti da farine di diverse specie di cereali (Ottogalli *et al*, 1996; Foschino *et al* 1999; Vogel *et al.*, 1999; De Vuyst & Gänzle, 2005). Diversi prodotti da forno del Sud America e della California, svariate tipologie di pane di segale dell'est europeo, in Scandinavia e nel centro Europa sono



ottenuti con l'utilizzo di paste acide (De Vuyst & Neysen 2005). Il pane è da sempre l'alimento principale delle popolazioni del Mediterraneo, e in Sardegna, come in molte altre parti del mondo, assume ancora oggi altri significati, strettamente legati all'economia agro-pastorale. La preparazione del pane ha sempre costituito un rito sociale e un incontro tra le famiglie. Durante tutte le varie fasi della panificazione (la pulitura e la setacciatura delle cariossidi, l'impasto, la modellatura delle forme e l'infornatura) venivano recitate preghiere e si tracciava sul pane il segno della croce. La molteplicità dei pani è dovuta anche all'utilizzo di diversi tipi di sfarinati: in primo luogo semola di grano duro, ma anche d'orzo e in misura più ridotta di altri cereali. In base alle materie prime, alle forme e alla tecnologia utilizzata la Sardegna può essere idealmente suddivisa in tre grandi zone, ciascuna delle quali è caratterizzata da un pane tipico dominante. Nella parte settentrionale è prodotto un pane sottile, di consistenza morbida, privo di mollica, facilmente separabile in due fogli, conosciuto con il nome di Spianata. Nel Nuorese si produce il pane Carasau, la cui origine si intreccia con la cultura ed i modi di vita delle popolazioni locali, dedite principalmente alla pastorizia sino a poco tempo fa transumante. Il Carasau è un pane sottile e biscottato perché infornato due volte. La sua particolarità è la lunga conservazione che consentiva ai pastori di utilizzarlo nei lunghi periodi della transumanza. Nella zona meridionale i pani più importanti sono invece di grossa pezzatura e con mollica come il Moddizzosu, il Civraxiu e il Coccoi. Questa molteplicità di pani era ed è caratterizzata ancora dalla lievitazione naturale a pasta acida. In Sardegna il lievito naturale a pasta acida assume diverse denominazioni secondo il luogo: *frammentarzu*, *frammetazzu*, *frammentu*, *fermentu*, *madrighe*. Si tratta di un impasto costituito da semola e "poddine" (fior di semola), mescolati con acqua tiepida, lasciato acidificare spontaneamente. In passato, ma ancora oggi in molte zone della Sardegna, i preparativi per la panificazione iniziavano di solito la sera in modo che la cottura potesse essere effettuata la mattina successiva. Il "frammentarzu" si scioglieva in un po' di acqua tiepida e si amalgamava

con la semola fino ad ottenere un impasto di media consistenza “*sa madrighe*”. Questa era ricoperta con della farina e tenuta al caldo per favorire la lievitazione, che poteva durare dalle sei alle dieci ore. Durante la preparazione, estremamente variabile, avviene la “contaminazione”, lo sviluppo e la selezione dei microrganismi provenienti dall’ambiente circostante, dalla farina e dai vari ingredienti volontariamente aggiunti all’impasto. Tradizionalmente si usava aggiungere all’impasto miele, uva, prugne, fichi e gioddu; ingredienti che forniscono sia zuccheri fermentescibili sia microrganismi. Dopo una serie di “rinfreschi”, che consistono nell’aggiunta di farina e acqua, l’impasto acquista una capacità lievitante e acidificante che si mantiene costante nel tempo se le condizioni di conservazione e di rinnovo sono eseguite correttamente. La fermentazione dell’impasto dipende da una microflora spontanea eterogenea, ma specifica di ciascuna zona di produzione (Farris *et al.*, 2005).

### **Ruolo dei lieviti**

I lieviti sono una componente fondamentale della panificazione, in quanto responsabili della trasformazione degli impasti in pane. Nella pasta acida, subito dopo l’impastamento, prevale il metabolismo ossidativo in quanto è stato incorporato ossigeno che favorisce la respirazione dei lieviti. Una volta esaurito l’ossigeno i lieviti cambiano il loro metabolismo da ossidativo a fermentativo (Carrai, 2001). Nel corso della fermentazione viene prodotta anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), a partire da maltosio e glucosio, derivati dall’idrolisi dell’amido. L’anidride carbonica esercita una pressione sulla maglia glutinica, impermeabile a questo gas, determinando il rigonfiamento della pasta (lievitazione); la CO<sub>2</sub> contribuisce, inoltre, a dare al pane una struttura finemente porosa ed influenza direttamente la sofficità, la fragranza, la consistenza e l’elasticità dell’impasto, tutte importanti qualità reologiche che influiscono sulla qualità del prodotto finito (Carrai, 2001). Il numero medio di lieviti riscontrato nelle paste acide di solito si aggira intorno a 10<sup>7</sup> UFC/g. Nella conduzione del processo di

panificazione esistono molti parametri che possono essere controllati e variati a seconda della tipologia di prodotto da ottenere; durante il processo fermentativo la temperatura, la durata della fermentazione e la specie o le specie di lievito che condurranno la lievitazione sono dei fattori di primaria importanza. Nell'impiego delle paste acide il "fattore lievito" è forse quello meno controllabile in quanto risultato di una selezione operata dai fattori ecologici che si determinano nel sistema pasta acida e dall'interazione tra lieviti e batteri lattici (De Vuyst & Neysens, 2005).

### **Biodiversità e lieviti panari**

La biodiversità è il risultato delle infinite ricombinazioni geniche e delle interazioni tra individuo e ambiente. E' stata definita come una misura di importanti processi ecologici quali la ripartizione delle risorse, la competizione, la successione e la produttività della comunità, oltre che un indicatore della stabilità (McArthur *et al.*, 1961). La biodiversità microbica ha ricevuto particolare attenzione soprattutto nei settori in cui si hanno importanti applicazioni industriali, ma nonostante tale interesse la diversità biologica degli habitat naturali è costantemente erosa dalle attività umane (Contoli, 2001). Pertanto un obiettivo della ricerca scientifica deve essere quello di cercare di conciliare le esigenze di mercato al rispetto della biodiversità, utilizzando proprio la diversità biologica come fattore di qualità.

I lieviti formano comunità multispecifiche e ogni comunità ha un suo habitat, con diverse nicchie, in cui è possibile distinguere i lieviti generalisti dai lieviti specialisti e i membri autoctoni (essenziali) dai membri alloctoni (transienti e fortuiti). I lieviti sono sempre presenti sulla farina, ma nel corso della lievitazione la comunità microbica può cambiare, sia qualitativamente che quantitativamente, essendo fortemente influenzata dalle condizioni colturali. In questi ultimi anni, grazie soprattutto alla messa a punto e all'applicazione di metodiche molecolari di analisi delle popolazioni di lieviti, è emerso che le fermentazioni spontanee sono caratterizzate da una significativa biodiversità intraspecifica (Succi *et al.*,

2003). Tuttavia l'uso massivo del lievito compresso sta erodendo la biodiversità della microflora autoctona. La maggior parte delle industrie produttrici di starter hanno sempre focalizzato la loro attenzione solo su pochissimi ceppi.

### ***Saccharomyces cerevisiae***

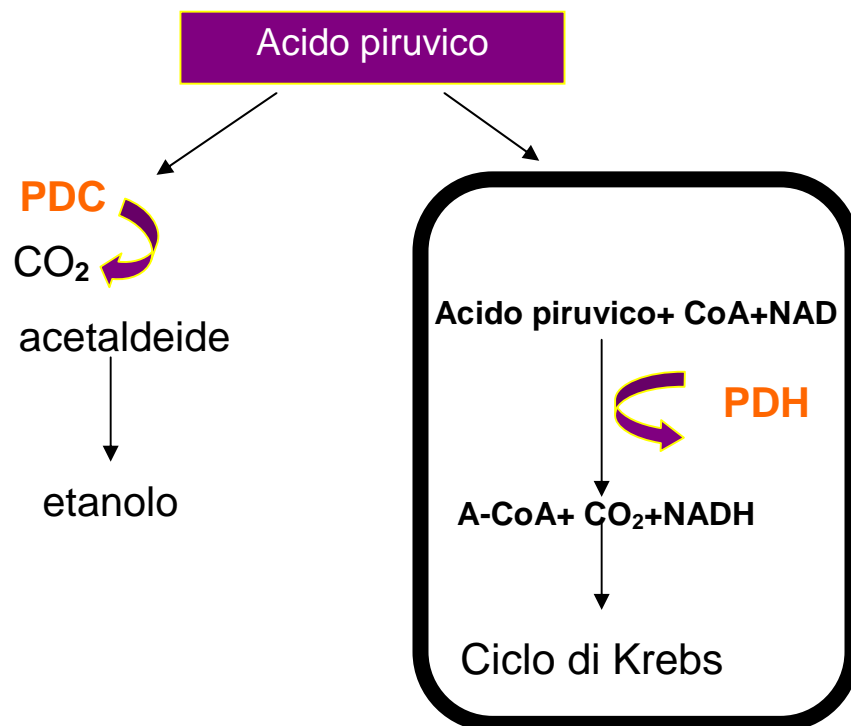
Attualmente il genere *Saccharomyces* è definito come clade, in base alle relazioni filogenetiche delle specie che vi appartengono, determinate sulla base dell'analisi di sequenza di 150 geni. A questa clade appartiene il gruppo *Saccharomyces sensu stricto* in cui sono incluse 5 specie: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* (Kurtzman e Robnett, 2003; Scannell *et al.*, 2007). *S. cerevisiae* è stato il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato (Goffeau *et al.*, 1996) e recentemente è stato utilizzato come modello nella genetica evolutiva (Landry *et al.*, 2006; Zeyl 2006; Kao e Sherlock, 2008).

Il titolo di fermento alcolico spetta alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, il tipico lievito del pane, della birra e del vino, quello che industrialmente viene prodotto in grandi quantità e trova utilizzazione nei più svariati settori alimentari. Infatti, la grande variabilità intraspecifica che caratterizza questa specie ha consentito la selezione di ceppi con caratteristiche genetiche e tecnologiche adattate ai diversi substrati e alle diverse tecnologie di produzione. La tolleranza a bassi valori di pH e la sua capacità di crescere ad elevate concentrazioni di zucchero, di etanolo ed in condizioni anaerobiche sono state le principali ragioni per il maggior interesse sorto nei confronti di *S. cerevisiae* nel campo delle biotecnologie tradizionali ed industriali (Attfield, 1997).

*S. cerevisiae* fermenta il glucosio ed il fruttosio producendo anidride carbonica ed alcool ed una discreta varietà di composti volatili ed alcoli a corta catena che conferiscono proprietà sensoriali dei prodotti fermentati. Gli enzimi presenti nelle farine o nel malto diastatico (amilasi), scindono l'amido in destrosio e maltosio, i quali a loro volta vengono scissi in

glucosio e fruttosio e successivamente in anidride carbonica ed alcool (Zambonelli *et al.*, 2001).

La concentrazione di glucosio e ossigeno influiscono sul tipo di via catabolica utilizzata da *S. cerevisiae*. A basse concentrazioni di glucosio (< 5mM) e in condizioni aerobiche diminuisce la velocità di trasporto dello zucchero rispetto a quanto accade in condizioni anaerobiche. Questo fenomeno, noto come “*effetto Pasteur*”, ha nella panificazione la sua applicazione pratica più importante (Fig. 1).



**Figura 1.** Rappresentazione delle due vie cataboliche: fermentazione e respirazione in *Saccharomyces cerevisiae*

La piruvato decarbossilasi (PDC) e la piruvato deidrogenasi (PDH) competono nel catalizzare fermentazione e respirazione dell'acido piruvico; tale competizione potrebbe giustificare l'inibizione della fermentazione operata dalla respirazione. La PDH ha maggiore affinità nei

confronti dell'acido piruvico e solo quando la concentrazione di piruvato supera la soglia di saturazione della PDH, è possibile registrare fenomeni fermentativi.

L'inibizione degli enzimi glicolitici operata dall'ATP spiega in gran parte l'effetto Pasteur. L'ATP prodotto dalla fosforilazione ossidativa inibisce la fosfofruttochinasi (PFK), enzima della glicolisi, appartenente alla classe delle transferasi e produce un accumulo degli esosi fosforilati a livello citoplasmatico. La fosfofruttochinasi è un enzima allosterico. Esso può essere inibito dall'ATP, dal citrato e dal suo prodotto, il fruttosio-1,6-bisfosfato. Viene invece attivato dall'ADP, dall'AMP e dal fruttosio-2,6-bisfosfato. Questo enzima è disattivato dal ATP; causando quindi una diminuzione del consumo di glucosio. L'attività della fosfofruttochinasi è saldamente legata al bilancio cellulare di ATP/AMP, che può essere a buon ragione inteso come la riserva corrente di energia cellulare, a cui le vie energetiche come la glicolisi sono tenute ad adattarsi (Berg *et al.*, 2003).

L'effetto Pasteur è di bassissima entità per lieviti fermentativi che non hanno alti livelli di respirazione in terreni contenenti glucosio a concentrazioni intorno ai 10 g/L. In condizioni aerobiche, dove normalmente prevale la respirazione, se nel substrato la concentrazione di zuccheri supera il 5%, si ha la prevalenza dell'attività fermentativa. Questo fenomeno viene definito *effetto Crabtree*. L'effetto Crabtree limita la crescita del lievito ed è perciò normalmente indesiderato.

### **S. cerevisiae e le sue origini**

Negli ultimi anni è stato riconosciuto che *S. cerevisiae* occupa numerosi habitat e le popolazioni mostrano importanti variazioni genetiche. Vi è quindi un crescente interesse per la comprensione delle forze evolutive che agiscono sul genoma del lievito (Landry *et al.*, 2006).

*Saccharomyces cerevisiae* è stato per un lungo tempo considerato un organismo unicellulare "addomesticato", distinto da una qualsiasi delle sue controparti presente negli habitat naturali (Ciani *et al.*, 2004; Legras *et al.*,

2007), e questa sua peculiarità risale a tempi ben lontani. Infatti, i primi processi fermentativi quali la produzione della birra, del vino o del pane, risalgono al periodo degli antichi Egizi (Cavaliere *et al.*, 2003).

Inoltre, la dettagliata conoscenza del genoma del lievito, combinata con la notevole tracciabilità della genetica e della biologia molecolare, ha inserito *S. cerevisiae* al centro dei programmi di ricerca che vanno dallo studio di geni delle malattie umane (Foury, 1997; Botstein & Fink 1988), all'evoluzione sperimentale (Ferea *et al.*, 1999) e agli studi di biologia dei sistemi (DeRisi *et al.*, 1997; Velculescu *et al.*, 1997; Ideker *et al.*, 2001).

Diverse prove suggeriscono che *S. cerevisiae* esisteva come una specie distinta in ambienti naturali molto tempo prima che venisse utilizzato nella produzione alimentare. Fay & Benavides (2005) sostengono l'ipotesi che i ceppi addomesticati derivano da ceppi di popolazioni naturali piuttosto che il contrario. I ceppi di lievito utilizzati nella produzione di birra, di vino e del pane differiscono gli uni dagli altri in termini delle loro caratteristiche fermentazioni e della formazione di sottoprodotti, anche se quasi tutti appartengono alla specie *Saccharomyces cerevisiae* o sono strettamente connessi a questa specie (Barnett, 1992; Kurtzman e Robnett 2003; Pretorius, 2003; Hansen e Kiehlbrandt, 2003; Randez-Gil *et al.*, 2003; Donalies *et al.*, 2008). Così, le loro informazioni genetiche dovrebbero avere un elevato grado di somiglianza con i ceppi di laboratorio la cui sequenza genomica è nota (Goffeau *et al.*, 1996).

Le caratteristiche genetiche e biologiche di *S. cerevisiae* sono state recentemente rivedute da Landry *et al.* (2006). *S. cerevisiae* è un lievito omotallico, che conferisce la possibilità di rigenerazione delle cellule diploidi a partire da cellule aploidi, fenomeno che potrebbe essere interpretato come un modo per rinnovare il genoma (Mortimer *et al.*, 1994). Questo meccanismo potrebbe essere responsabile dell'elevato tasso (28%) di ceppi omozigoti trovati in vigneti (Mortimer *et al.*, 1994). Molti studi, inoltre, hanno sottolineato l'aneuploidia nei ceppi di vino (Bakalinsky & Snow, 1990; Guijo *et al.* 1997; Nadal *et al.* 1999), della birra o del pane (Codon *et al.*, 1998). Questa potrebbe essere una strategia del

lievito per adattarsi ai vari ambienti, modificando il dosaggio di alcuni geni importanti per l'adattamento (Bakalinsky & Snow 1990; Salmon, 1997).

### ***Saccharomyces cerevisiae* e la risposta agli stress**

La fermentazione panaria è un processo chimico attuato principalmente da *Saccharomyces cerevisiae* che spesso è sottoposto ad una serie di stress ambientali: stress iperosmotico, termico, ipossia, carenza di nutrienti, presenza di CO<sub>2</sub>, o presenza di tossine di vario genere. Tutti questi stress possono provocare variazioni allo stato fisiologico e alle proprietà delle cellule (Attfield, 1997). *Saccharomyces cerevisiae* reagisce agli stress attraverso meccanismi di risposta generali e/o specifici. La variazione dell'espressione genica in risposta a differenti stress sono un indicatore delle variazioni che possono avvenire in seno al processo fermentativo a causa di cambiamenti delle condizioni ambientali. Per poter individuare i geni target attivi in risposta agli stress da fermentazione, bisogna conoscere i meccanismi molecolari che regolano la risposta allo stress. Il primo gruppo di proteine studiato per la risposta allo stress in *Saccharomyces cerevisiae* è stato quello delle Hsp (*heat shock proteins*), la cui sintesi aumenta notevolmente quando la cellula è esposta ad incrementi di temperatura. Ma le Hsp (classe di proteine presenti anche negli eucarioti superiori) sono indotte da diversi tipi di stress e la loro funzione è quella di dare una protezione generale dagli stress (Mager e Hohmann, 1997). Questa protezione generale è implementata da un adattamento specifico per ogni tipo di stress, come per esempio la sintesi di glicerolo in risposta a stress iperosmotico, la sintesi di glicogeno in risposta a stress da carenza di fonti carboniose o la sintesi di trealosio in risposta alla disidratazione, al congelamento, alla presenza di etanolo, ecc.. Caratteristica delle Hsp è che rispondono ad uno stress specifico conferendo alla cellula una maggiore resistenza ad altri tipi di stress. Questo fenomeno è noto con il nome di "protezione incrociata". La percezione del segnale da stress avviene a livello della membrana cellulare a carico di alcune proteine dette "sensing", che sentono lo

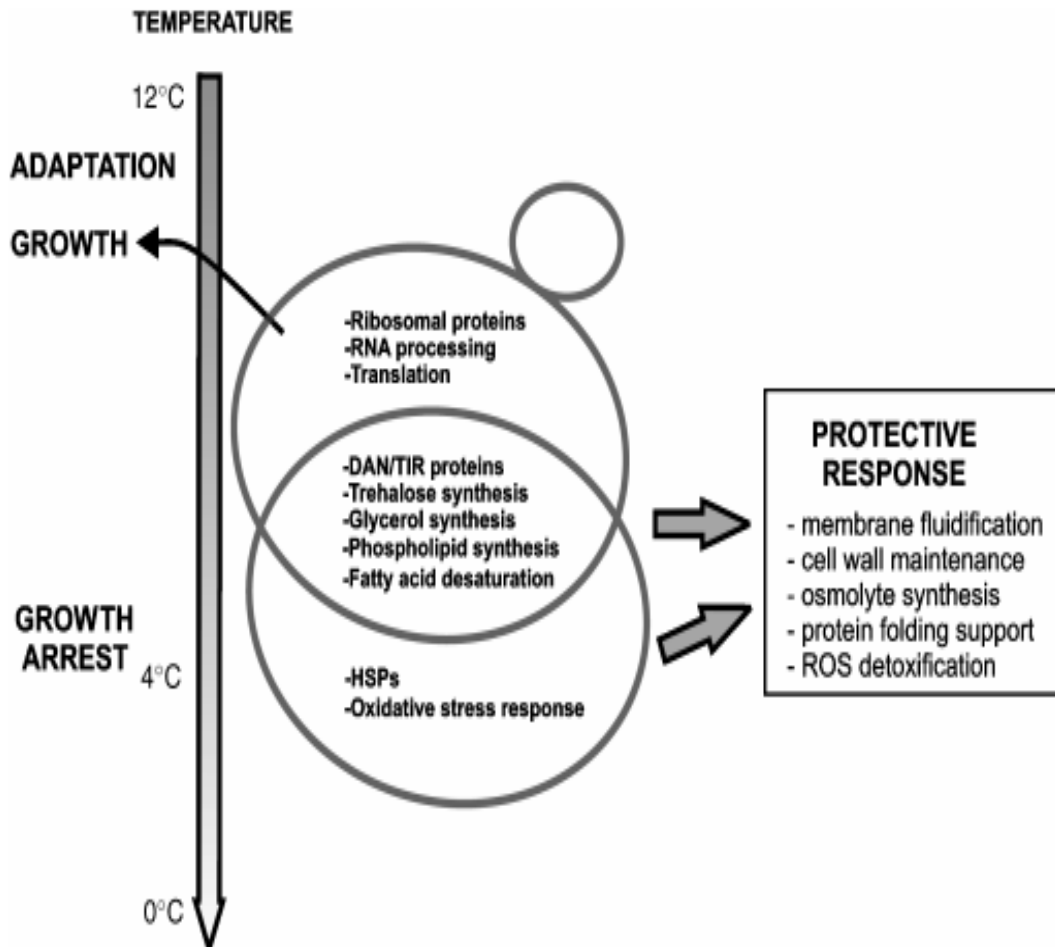


stimolo dello stress esterno. Queste proteine trasferiscono il segnale ad altre proteine che attraverso un sistema a cascata costituito da diverse chinasi e fosforilazioni successive trasferiscono il segnale a dei fattori di trascrizione situati all'interno del nucleo. I fattori di trascrizione a loro volta attivano o reprimono i geni che codificano le proteine di risposta allo stress. Analizziamo i principali stress a cui possono essere sottoposti i lieviti durante il processo di panificazione.

#### *Stress da elevate e basse temperature*

Ogni cambiamento nella temperatura ambientale viene percepito dalla cellula come stress (Piper, 1997). Le alte temperature ( $T > 35^{\circ}\text{C}$ ) inducono la denaturazione delle proteine e cambiamenti nella membrana plasmatica (Watson, 1987; Suutari *et al.*, 1990). Lo stress da alte temperature può anche far variare il gradiente protonico transmembrana, abbassando notevolmente il pH intracellulare (Piper *et al.*, 1997). Quando le cellule sono esposte ad uno shock dovuto alle alte temperature le HSPs (Hecker *et al.*, 1996) promuovono il corretto ripiegamento dei nuovi polipeptidi, l'assemblaggio di proteine complesse, la degradazione e la traslocazione di proteine.

Un repentino abbassamento della temperatura, al di sotto di  $0^{\circ}\text{C}$  riduce la fluidità della membrana plasmatica e, di conseguenza, dell'attività delle proteine ad essa associate, il cambiamento nel livello di avvolgimento del DNA e la formazione di strutture secondarie stabili nel DNA e nel RNA che inibiscono la replicazione, la trascrizione e la sintesi di proteine (fig. 2). L'adattamento alle basse temperature è di vitale importanza in quanto diverse fermentazioni vengono avviate mediante l'utilizzo di colture starter liofilizzate o congelate, che quindi traggono beneficio da una maggiore sopravvivenza al congelamento. Il congelamento può causare delle complesse condizioni di stress in quanto le cellule possono essere danneggiate non solo dalla formazione di cristalli di ghiaccio, ma anche in seguito all'elevata osmolarità dovuta all'alta concentrazione interna di soluti.



**Figura 2.** Principali risposte di *Saccharomyces cerevisiae* dovute alla diminuzione della temperatura (Tratto da Aguilera *et al.*, 2007).

Generalmente, non appena diminuisce la temperatura di crescita, aumenta il rapporto fra acidi grassi a catena corta e lunga e tra acidi grassi insaturi e saturi dei lipidi di membrana; ciò permette di raggiungere un ottimo grado di fluidità nella membrana citoplasmatica favorendo l'attività di proteine intrinseche della membrana stessa che svolgono diverse funzioni come la traslocazione ionica e l'acquisizione di nutrienti. È stata dimostrata la produzione di una collezione di specifiche "proteine indotte dalle basse temperature" (CIPs) in seguito ad uno shock da freddo (Wouters *et al.*, 2000). Le CIPs sono probabilmente sintetizzate per mantenere la fluidità di membrana mediante l'incremento del rapporto fra acidi grassi a catena corta e lunga oppure fra acidi grassi insaturi e saturi

dei lipidi; l'avvolgimento del DNA mediante la riduzione di avvolgimenti negativi; l'efficienza di trascrizione per le cellule adattate alle basse temperature.

#### *Stress osmotici ed ossidativi*

Un improvviso incremento di osmolarità dell'ambiente (stress iperosmotico), si traduce in un movimento dell'acqua dalle cellule verso l'esterno, che provoca una nociva perdita di pressione di turgore, un cambiamento della concentrazione dei soluti intercellulari e una variazione del volume cellulare. Gli stress ossidativi sono associati a condizioni in cui la produzione di "forme di ossigeno reattive" (ROS) comportano effetti dannosi nella vitalità delle cellule. La reazione di riduzione dei quattro elettroni dell'ossigeno molecolare  $O_2$  in  $H_2O_2$  genera l'anione radicale superossido.

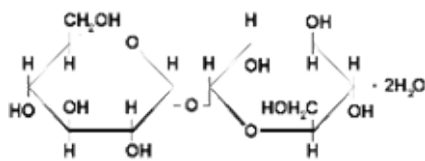
#### *Carenza di nutrienti*

In presenza di nutrienti la cellula cresce velocemente e le vie metaboliche di risposta allo stress sono represses, mentre quando questi sono assenti o la loro presenza poco rilevante le vie sono riattivate. *S. cerevisiae* ha sviluppato diverse strategie in risposta alla mancanza di nutrienti ad esempio attraverso il blocco del ciclo cellulare: le cellule diploidi, entrano in meiosi, formando 4 ascospore, altamente resistenti alle avverse condizioni nutritive ed infine le cellule si allungano, gemmando in modo unipolare senza separarsi e formando, nella ricerca di nutrienti, delle pseudoife. In tutti questi casi si ha attivazione di geni in risposta allo stress che favoriscono la sintesi di composti riserva come glicogeno o trealosio. Uno dei segnali di trasduzione che controllano la mancanza di nutrienti è la PKA (*c-AMP-dependent kinase*), via metabolica attiva in presenza di glucosio che favorisce la glicolisi, la crescita e la proliferazione cellulare. In queste condizioni reprime i fattori di trascrizione come Msn2/Msn4. Invece, in condizioni di stress da carenza di nutrienti il livello della PKA è basso ed

in questo modo attraverso i fattori di trascrizione vengono attivati i geni di risposta allo stress.

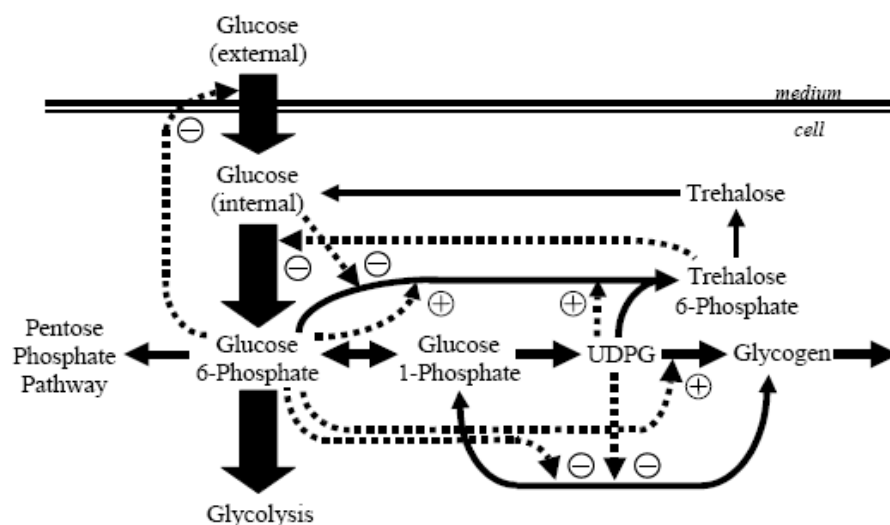
### Il trealosio in *Saccharomyces cerevisiae*

Il trealosio è un disaccaride non riducente formato da due molecole di glucosio unite da un legame  $\alpha$  glucosidico 1-1. Questo disaccaride è presente nelle piante, negli insetti, nei batteri, nei funghi e nei lieviti (Fig. 3);



**Figura 3.** Struttura del trealosio: 2 molecole di glucosio unite da legame  $\alpha$  1-1

Si accumula nelle cellule in determinati stati fisiologici, come la fase stazionaria e la sporificazione. Durante la fase stazionaria di crescita il trealosio è lentamente utilizzato come fonte di riserva energetica (Kim *et al.*, 1996; Mensonides *et al.*, 2005). La stabilità di legame e l'assenza di gruppi funzionali riducenti rendono il trealosio compatibile con le proteine in quanto non avviene l'indesiderata "reazione di Maillard", di imbrunimento non enzimatico. Le funzioni del trealosio sono molteplici e il suo ruolo diventa di cruciale importanza in condizioni di stress cellulari. La molecola del trealosio in campo industriale è importante per determinare la stabilità a lungo termine del lievito commerciale panario; un alto contenuto di questo disaccaride protegge le cellule da autolisi e aumenta la capacità di lievitazione in pasta (Attfeld, 1997; Quain, 1988; Randez-Gil *et al.*, 1999). In figura 4 è schematizzato il pathway di biosintesi e idrolisi del trealosio di *Saccharomyces cerevisiae*.



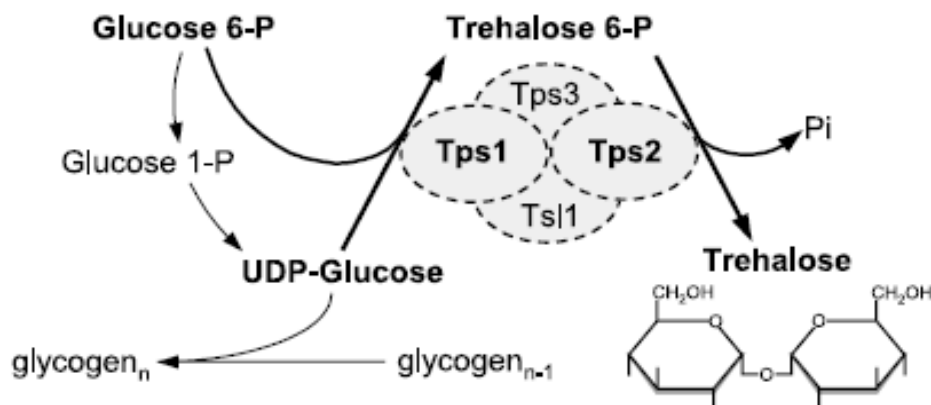
**Figura 4.** Pathway di biosintesi e idrolisi del trealosio in *S. cerevisiae* (tratto da Voit, 2003).

Il trealosio in campo industriale è usato come stabilizzatore per diverse molecole e gioca un ruolo chiave nella preservazione dell'integrità strutturale e funzionale di componenti cellulari (Gadd *et al.*, 1987; Gelinas *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1990). Il pattern di accumulo e utilizzazione del trealosio mostra come la funzione principale di questo carboidrato è quella di costituire una riserva energetica per la cellula (Singer e Lindquist, 1998). In condizioni di sviluppo esponenziale, infatti, le quantità intracellulari di questo disaccaride sono minime, mentre in fase stazionaria costituisce circa il 20% del peso secco cellulare (Singer e Lindquist, 1998). È stato osservato che in *Saccharomyces cerevisiae* l'accumulo intracellulare di trealosio comporta un aumento della tolleranza ad elevate concentrazioni di etanolo (Mansure *et al.*, 1994).

### Sintesi del trealosio

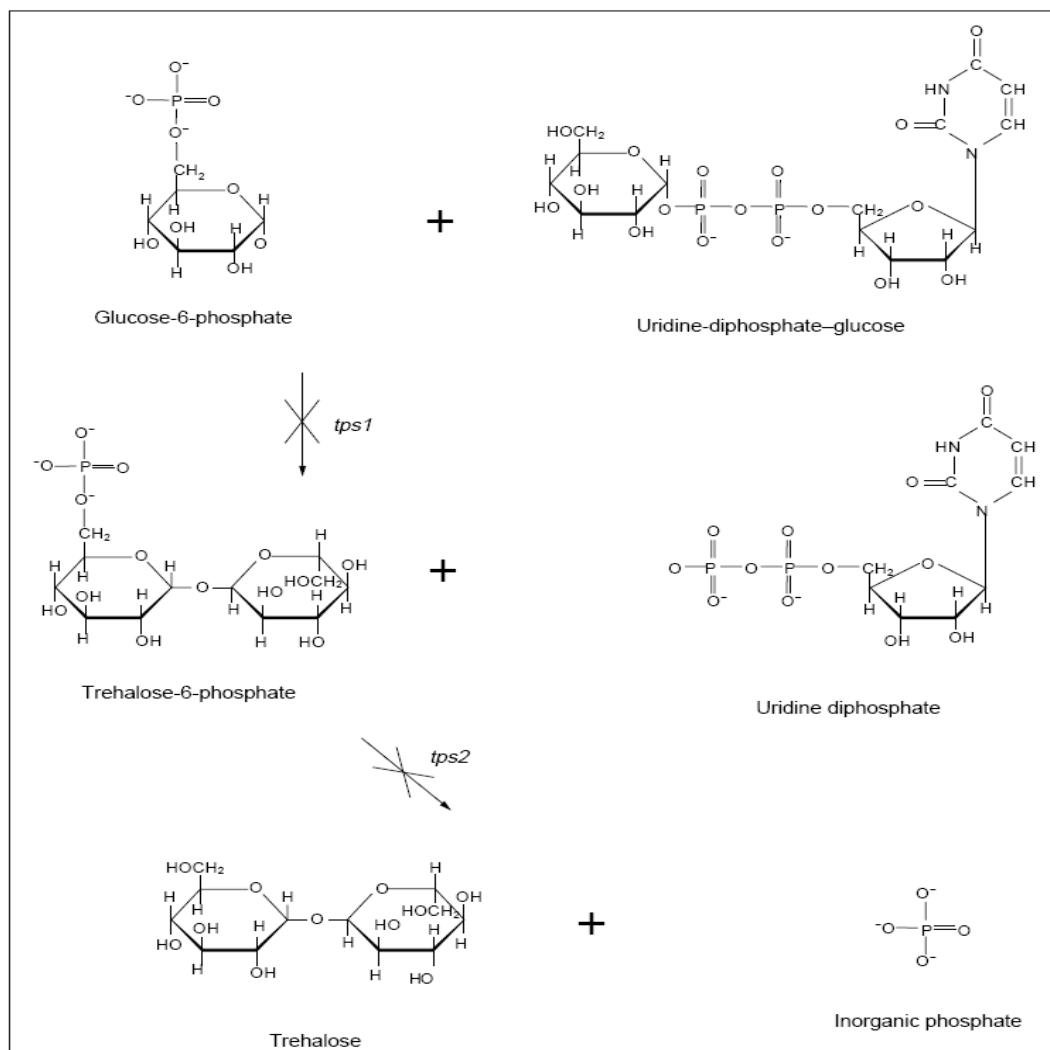
Sono state identificate diverse vie per la biosintesi del trealosio (Jules *et al.*, 2008). L'accumulo di trealosio avviene attraverso la sintesi intracellulare o attraverso la via dell'assorbimento del trealosio extracellulare. L'accumulo di trealosio inizia durante lo shift diauxico e

raggiunge il massimo all'inizio della fase stazionaria o quando la cellula è stressata. La sintesi di trealosio endogeno inizia con il trasferimento di un residuo glucosidico da UPD e glucosio 6P per sintetizzare trealosio 6P che è successivamente defosforilato per dare trealosio in due successive reazioni enzimatiche catalizzate da T6P sintetasi e T6P fosfatasi (Bonini *et al.*, 2003; Jules *et al.*, 2004). Gli enzimi T6P sintetasi (Bell *et al.*, 1992) e T6P fosfatasi (De Virgilio *et al.*, 1993) che catalizzano la reazione di biosintesi del trealosio fanno parte di un complesso di sintesi al quale partecipano altre 2 enzimi: TSL1 123 KDa (Vuorio *et al.*, 1993) e TPS3 115 KDa senza attività catalitica. Le proteine Tsl1 e Tps3 sono implicate nella stabilità e nell'integrità del complesso e sono coinvolte nella regolazione dello stesso (Petit and François, 1994, Hazell *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1998; Voit, 2003) (Fig. 5).



**Figura 5.** Pathway di sintesi del trealosio in *Saccharomyces cerevisiae* (tratto da Gancedo e Flores, 2004).

L'espressione dei geni coinvolti nella sintesi del trealosio non è sempre correlata con i livelli di trealosio interni nella cellula (Godon *et al.*, 1998). In realtà la concentrazione intracellulare del trealosio è il risultato dell'equilibrio tra l'attività sintetica del complesso sintetasi, in particolare degli enzimi TPS1 e TPS2, (Bell *et al.*, 1992; Vuorio *et al.*, 1993; Parrou *et al.*, 1997) e l'attività degradativa delle trealasi (Alexandre *et al.*, 1998) (Fig. 6).



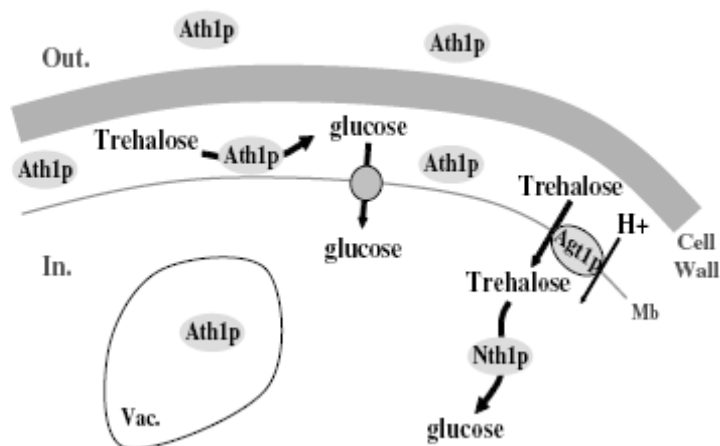
**Figura 6.** Biosintesi del trealosio. *Saccharomyces cerevisiae* produce trealosio nel citosol attraverso l'azione consecutiva delle proteine Tps1p e Tps2p (Tratto da Singer e Lindquist, 1998).

### Degradazione del trealosio

In *Saccharomyces cerevisiae* la degradazione del trealosio avviene tramite due trealasi funzionali: una trealasi citosolica neutra, codificata dal gene *NTH1* che ha un pH ottimale intorno a 7.0 (Londesborough *et al.*, 1984; Kopp *et al.*, 1993; Nwaka *et al.*, 1995) e una trealasi endogena codificata dal gene *ATH1* che ha un pH ottimale intorno a 4.5- 5.0 (Keller *et al.*, 1982; Mittenbuhler *et al.*, 1988; Harris *et al.*, 1988; Destruelle *et al.*, 1995; Parrou *et al.*, 2007). Il livello del trealosio nelle cellule è principalmente controllato dalla trealasi neutra ed è responsabile dell'idrolisi del trealosio citosolico. Questa trealasi è attivata tramite

fosforilazione cAMP dipendente che si svolge in risposta a diversi stimoli fisiologici (ripresa attiva di crescita, stress, ecc.) (Londesborough e Varimo, 1984; Thevelein, 1984; Kopp *et al.*, 1993; Thevelein, 1995; François *et al.*, 1997; Nwaka e Holzer, 1998). Il gene *NTH1* è localizzato nel cromosoma IV e codifica una proteina da 80 kDa; è omologo a *NTH2*, presente sul cromosoma II, il cui prodotto è identico a Nth1p per il 77%. La delezione di *NTH1* impedisce al lievito di mobilizzare il trealosio endogeno. Al contrario, non si osserva nessun cambiamento nell'attività della trealasi in un mutante Nth2. L'espressione di *NTH1* è indotta da shock termici, stress ossidativi e agenti chimici tossici come anche dall'esaurimento del glucosio presente nel terreno (Zähringer *et al.*, 2000). La regolazione della trealasi acida vacuolare Ath1p è sconosciuta ma la repressione catabolica e la compartimentazione sono state suggerite come probabile meccanismo regolatore. La trealasi acida sembra essere coinvolta nell'assorbimento e utilizzazione del trealosio esogeno. Recentemente è stato riportato che il 90% dell'attività della trealasi acida in *S. cerevisiae* è extracellulare e rompe il trealosio extracellulare in due molecole di glucosio nello spazio periplasmico (Jules *et al.*, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* può utilizzare il trealosio extracellulare come fonte di carbonio. Per l'utilizzazione del trealosio extracellulare sono riportati in letteratura almeno due trasportatori: uno a bassa affinità ed un altro ad alta affinità symporter Agt1p (Han *et al.*, 1995; Stambuk *et al.*, 1996, 1998, 1999, 2001; Plourde-Owobi *et al.*, 1999). La presenza di Ath1p nei vacuoli può precedere semplicemente la relativa degradazione proteolitica. Alternativamente, questa localizzazione può essere richiesta per la degradazione di trealosio intracellulare, che potrebbe essere trasportato al vacuolo per autofagia come descritto per il glicogeno (Wilson *et al.*, 2002). È stata, inoltre, trovata una seconda via per l'assimilazione del trealosio in lievito che accoppia il trasporto del trealosio tramite Agt1p con l'idrolisi del trealosio tramite Nth1p (Fig. 7).





**Figura 7.** Modello di assimilazione del trealosio nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* (tratto da Parrou *et al.*, 2005).

L'analisi del promotore di *AGT1* ha rivelato la presenza di una regione di 489 pb identica a quella del gene *MAL61* (Hong *et al.*, 1987). Diversamente da Mal61p che è specifica per l'assorbimento del maltosio, Agt1p può anche attivamente trasportare altri  $\alpha$ -glucosidi quali trealosio, isomaltosio, maltotriosio. Quando le cellule crescono in YPD contenente trealosio, rispetto alle cellule cresciute su glucosio, si può osservare una lunga fase logaritmica. L'aggiunta di una fonte velocemente fermentabile di carbonio, come il glucosio, durante la crescita cellulare di *S. cerevisiae* su maltosio stimola la perdita molto veloce di attività di trasporto del maltosio (Jiang *et al.*, 2000).

### Funzione del trealosio

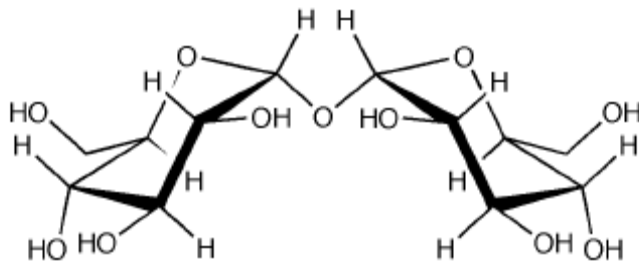
*Saccharomyces cerevisiae* ed altri lieviti mostrano capacità di sopravvivenza alla disidratazione e al congelamento grazie alla sintesi del trealosio (Eleutherio *et al.*, 1993; Singer e Lindquist, 1998). Il trealosio tende a distrutturare la rete tetraedrica dell'acqua impedendo la transizione a ghiaccio, transizione che si rivela dannosa per tutti gli organismi viventi. Quando le cellule del lievito sono esposte a temperature

fra 10 e 0° C sono indotti reversibilmente geni che codificano per proteine coinvolte nella sintesi del trealosio (Viner e Clegg, 2001; Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004). Gli studi effettuati da Kandror *et al.*, (2004) hanno messo in evidenza, sia in lievito che in altri organismi eucarioti una risposta adattativa alle basse temperature. L'incapacità di sintetizzare il trealosio deriva da una perdita di vitalità a 0° C, mentre l'accumulo del disaccaride assicura una sopravvivenza a lungo termine a questa temperatura ed anche alla temperatura di freezer.

Le cellule del lievito inoltre possono sopravvivere con pressioni fino a 220 MPa (Palhano *et al.*, 2004) e rispondere a questo stress inducendo la sintesi di piccole proteine quali Hsp12p, Hsp26p e Hsp30p (Fernandes *et al.*, 2004). I fattori di trascrizione addetti alla regolazione di questi geni in risposta a questo stress non sono conosciuti. Ciò ha spinto i ricercatori a credere che un aumento della pressione idrostatica causa la denaturazione della proteina, la fluidità ridotta della membrana e danni della parete cellulare (Fernandes *et al.*, 2004; Motshwene *et al.*, 2004), tutti fattori comuni a shock termici e stress di integrità delle cellule.

Il trealosio è importante anche durante l'essiccazione perchè sostituisce il contenuto di acqua legata delle cellule. Questo si intercala tra i gruppi di testa fosfolipidici adiacenti nella membrana plasmatica e l'idrogeno lega successivamente i gruppi idrossilici nel trealosio e il gruppo di testa polare dei fosfolipidi. Questo diminuisce la temperatura di melting della membrana plasmatica (più permeabile), ostacolando la fase di transizione e la fusione della membrana durante l'essiccazione.

La particolare flessibilità del legame glicosidico tra i due carboni anomeric, permette una migliore interazione tra lo zucchero e la superficie delle biomolecole durante il processo di essiccamento (Fig. 8).

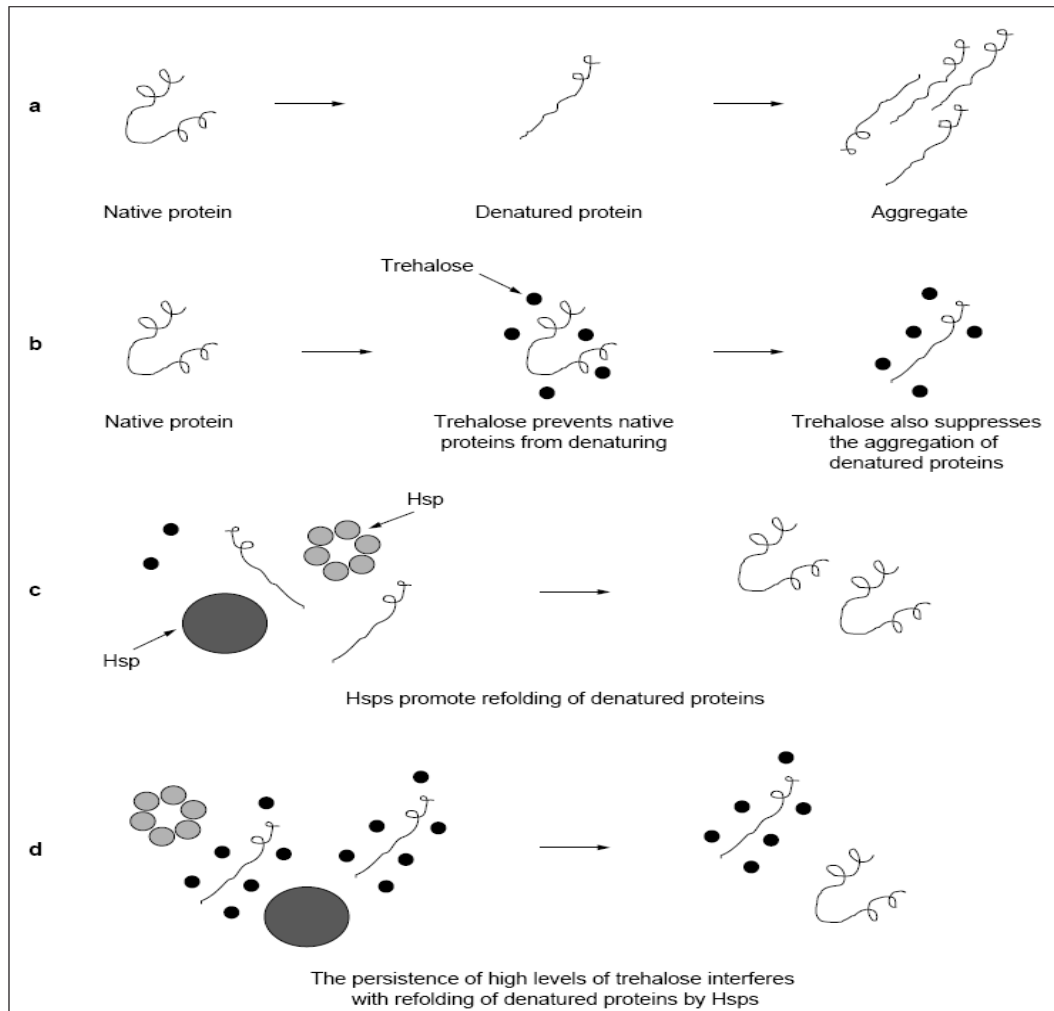


**Figura 8.** Isomero  $\alpha$  1-1 del trealosio (tratto da Elbein *et al.*, 2003)

In tali condizioni, proteine, acidi nucleici e membrane cellulari rimangono intrappolati in una superficie vetrosa di trealosio protetta in tal modo dai processi di degradazione. Il trealosio è coinvolto nella protezione delle cellule dai danni causati dall'etanolo sulla permeabilizzazione della membrana. Inoltre, analisi molecolari hanno rivelato come i geni necessari per il metabolismo di questo zucchero (*NTH1*, *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* e *TSL1*), presentano la sequenza STRE nel loro promotore (Zahringer *et al.*, 2000). L'espressione del gene *TPS1* è importante per monitorare l'integrità della membrana in seguito agli incrementi nella concentrazione di etanolo. La proteina Tps1, oltre al suo ruolo nella sintesi enzimatica del trealosio, è necessaria per l'espressione genica delle proteine HSP, compreso Hsp12p (Hazell *et al.*, 1995). Il trealosio permette la sintesi delle Hsps che consentono alle cellule di sopravvivere agli shock termici (Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004).

Sia il trealosio che Hsp104 sono necessari per il ripiegamento delle proteine nel citosol (Singer and Lindquist, 1998a), e per riparare la conformazione delle glicoproteine danneggiate dal calore nel lumen del reticolo endoplasmatico (Simola *et al.*, 2000). Il trealosio mantiene le proteine in uno stato non ripiegato prevenendo così un cattivo ripiegamento delle stesse (*misfolding*) e proteggendole dalla denaturazione. Una volta passato lo shock, le proteine protette tornano al loro stato naturale, funzionando da chaperonina (Lee e Goldberg., 1998; Lucero *et al.*, 2000; Benaroudj *et al.*, 2001; Viner and Clegg, 2001). La sinergia tra il trealosio e le proteine Hsp nella tolleranza agli stress è

efficiente soltanto se l'accumulo del disaccaride in risposta a stress è seguita dalla sua rapida mobilitazione e al ritorno successivo alle condizioni normali (Singer e Lindquist, 1998b) (Fig. 9).



**Figura 9.** **a** Le alte temperature causano la denaturazione delle proteine che possono formare degli aggregati. **b** *S. cerevisiae* sintetizza trealosio durante gli shock termici, stabilizza le proteine allo stato nativo e non permette l'aggregazione delle proteine denaturate. **c** Le cellule di lievito esposte ad alte temperature degradano subito il trealosio. Le Hsps promuovono il refolding dei substarti denaturati. **d** La persistenza di alte concentrazioni di trealosio interferisce con la riattivazione delle proteine denaturate da parte di Hsps (tratto da Singer e Lindquist, 1998).

## SCOPO DEL LAVORO

Il prodotti delle fermentazioni sono fortemente caratterizzati dall'intervento di una specifica e complessa microflora. Questa, in molti casi, è responsabile ed esalta le caratteristiche peculiari di alcune produzioni tecnologiche alimentari locali e/o regionali, come ad esempio pani tradizionali fermentati con la pasta acida.

In questo capitolo abbiamo analizzato le peculiarità genetiche e metaboliche dei lieviti delle paste acide utilizzate per la fermentazione di alcuni pani tradizionali sardi. L'origine dei ceppi panari è infatti oggetto di dibattito. Diversi autori hanno evidenziato che la maggior parte degli isolati di lievito da paste acide appartengono alla specie *Saccharomyces cerevisiae* e questi ceppi presentano caratteristiche genetiche diverse rispetto ai ceppi commerciali (Foschino *et al.*, 1999, Succi *et al.*, 2003, Pulvirenti *et al.*, 2004, Paramithiotis *et al.*, 2007). Tuttavia, altri autori ritengono che la presenza di questa specie sia dovuta all'inoculo nell'impasto acido di lievito commerciale (Corsetti *et al.*, 2001; De Vuyst e Neysens, 2005). Inoltre, solo di recente alcuni autori hanno evidenziato come "l'addomesticamento" di *Saccharomyces cerevisiae* ha selezionato ceppi caratterizzati da peculiarità genetiche, genomiche e metaboliche diverse a seconda del loro utilizzo tecnologico (Dunn *et al.*, 2005; Legras *et al.*, 2007; MacKenzie *et al.*, 2008)

In questo lavoro abbiamo determinato il grado di similitudine tra i ceppi panari e altri ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di diversa origine combinando la caratterizzazione molecolare e l'analisi di alcuni geni coinvolti nel metabolismo del trealosio, un composto chiave per la risposta allo stress.

# MATERIALI E METODI

## Ceppi e condizioni colturali

In questo studio sono stati utilizzati i ceppi riportati in Tabella 1, isolati da paste acide provenienti da diverse zone della Sardegna, dove è ancora presente la tradizione della panificazione casalinga con pasta acida prodotta artigianalmente senza aggiunta di lievito compresso. Questi ceppi sono stati confrontati con altri provenienti da paste acide del milanese e siciliani. I ceppi isolati sono depositati presso la collezione di microrganismi del DiSAABA (Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli studi di Sassari).

**Tabella 1. Ceppi utilizzati**

<b>Substrato di isolamento</b>	<b>Nome identificativo</b>
Vino	V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13
Paste acide Marmilla	S1, S2, S3 produttore <b>a</b> S4, S5, S6 produttore <b>b</b> S7, S8, S9 produttore <b>c</b>
Paste acide Nurra	S10, S11, S12, S13 produttore <b>d</b> S14, S15, S16, S17 produttore <b>e</b>
Paste acide Mejlogu	S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, produttore <b>f</b> S33, S34, S35, S36, S37, S38, S39, S40, S41, S42 produttore <b>g</b>
Paste acide Lombardia	S43, S44, S45, S46
Pasta acida Sicila	S47, S48, S49, S50, S51

Come ceppi di confronto sono stati utilizzati il ceppo tipo *CBS1171* (*Saccharomyces cerevisiae*), acquistato presso il Centraalburau voor Schimmelcultures. Inoltre, il ceppo di laboratorio S288c, 4 ceppi commerciali panari CP1, CP2, CP3 e CP4 e 6 ceppi commerciali vinari X5, SV04, 2056, M69, EC1118, ICVK1.

I ceppi da testare sono stati fatti crescere su piastre di YPD (estratto di lievito 20 g/l, peptone 20 g/l, glucosio 20 g/l, bacto-agar 20 g/l) e per



verificare lo stato di purezza di ciascuna coltura è stato utilizzato il terreno colturale WL (*Wallerstein Laboratoty Nutrient Agar*, OXOID). Una volta stabilita la purezza dei ceppi questi sono stati identificati e caratterizzati.

### **Identificazione**

L'identificazione degli isolati mediante PCR-RFLP delle regioni ITS dell'RNA ribosomiale, ha previsto l'estrazione del DNA genomico degli isolati (Adams *et al.*, 1997), in seguito l'amplificazione delle regioni ITS e l'analisi di restrizione degli ampliconi (Guillamòn *et al.*, 1998; Esteve-Zaroso *et al.*, 1999).

### *Estrazione DNA*

I ceppi di lievito sono stati fatti crescere overnight in YPD liquido a 25° C in agitatore termostato a 3000 rpm, fino a raggiungere una densità di  $2 \times 10^8$  cell/ml. Il giorno successivo 1,5 ml di precoltura sono stati omogeneizzati e centrifugati a 14000 rpm per 5 sec ed è stato eliminato il surnatante; il pellet è stato risospeso e sono stati aggiunti i mix di estrazione 1 (Triton X 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, Na<sub>2</sub> EDTA 1mM) e 2 (fenolo 25%, cloroformio 24%, alcol isoamilico 1%%) e 0,3 g di sfere di vetro (Sigma glass beads 710-1,180 microns). Il mix ottenuto è stato prima vortexato per 2 min e centrifugato a 14000 rpm per 5 min, dopo centrifugazione il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova eppendorf. La sospensione ottenuta è stata precipitata a -80° C per 20 min, con 3 volumi di EtOH 100% e 0,1 volumi di NaCl 3M. Alla precipitazione ha fatto seguito la centrifugazione del campione a 5° C a 14000 rpm per 15 min. Il pellet ottenuto, dopo eliminazione del surnatante, è stato lavato con EtOH 70% e centrifugato a 14000 rpm per 15 min, successivamente asciugato sottovuoto, risospeso in 50 µl di dH<sub>2</sub>O e conservato a -20° C.

### *Amplificazione delle ITS*

Sono stati utilizzati 2 µl di DNA genomico (50 ng/µl) ottenuto dall'estrazione per le reazioni di PCR, secondo il protocollo descritto in tabella 2.

**Tabella 2. Protocollo di amplificazione delle regioni ITS**

<b>FASE</b>	<b>T° C</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cicli</b>
Denaturazione iniziale	95	5'	1
Denaturazione	95	1'	35
Appaiamento	58	2'	35
Estensione	72	2'	35
Estensione finale	72	10'	1

I primers utilizzati sono ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ed ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), che amplificano la regione di DNA comprendente il gene 5,8 S e gli spaziatori ITS1 ed ITS2 tra i quali è compreso (Esteve- Zarzoso *et al.*, 1999). Ogni reazione di 25 µl comprendeva: 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> 15mM; 0,5 µl dNTPs 10 mM; 0,5 µl ITS1 10 µM; 0,5 µl ITS4 10 µM; 0.5 U Taq Polymerase (Euroclone), 2,5 µl Taq buffer 10X.

Un'aliquota di 2 µl del prodotto di amplificazione è stata analizzata su gel di agarosio all'1,5%, in TAE buffer a 70V per 60 min. Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande. Successivamente colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad).

### *Analisi di restrizione*

Poiché la determinazione del peso dell'amplificato identifica solo il genere, per arrivare alla specie occorre ottenere il profilo di restrizione. Pertanto di tutti gli ampliconi è stato ottenuto il profilo di restrizione utilizzando le endonucleasi *HaeIII*, *CfoI* e *Hinfi* (BioLabs, New England). Le reazioni sono state condotte a 37° C per 120 min e successivamente

inattivate a 80° C per 20 min. In tabella 3 sono riportati i parametri di reazione utilizzati.

**Tabella 3. Reazioni di restrizione**

Reagenti	<i>Haelll</i>	<i>Hinfl</i>	<i>CfoI</i>
Prodotto PCR	2 µl	2 µl	2 µl
Buffer 10 X	2 µl	2 µl	2 µl
Enzima	1 µl (10 U)	1 µl (10 U)	0,5 (10 U)
BSA			0,2 µl
dH <sub>2</sub> O	A volume	A volume	A volume
Volume finale	20 µl	20 µl	20 µl

Un'aliquota di 10 µl del prodotto di restrizione è stata analizzata su gel di agarosio al 3%, in TAE buffer a 70V per 80 min. Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande. Successivamente colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad).

### Caratterizzazione molecolare

La caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* oggetto di studio è stata fatta attraverso due tecniche: i marcatori molecolari minisatelliti (*VNTR: Variable Number Tandem Repeats*) e la RAPD-PCR. Per la prima tecnica di caratterizzazione molecolare sono stati impiegati primers specifici per *AGA1*, *DAN4*, *HSP150* e *SED1* (Marinangeli *et al.*, 2004), quattro geni di parete di *S. cerevisiae*. Per la RAPD-PCR sono stati impiegati i primers M13 (Andrighetto *et al.*, 2000) e 1254 (Torriani *et al.*, 1999).

Le reazioni di PCR, indicate di seguito, sono state fatte utilizzando il termociclatore "MyCycler Thermal Cycler System" (Biorad, Lombardia) in condizioni di PCR fortemente stringenti, secondo i protocolli termici

riportati in tabella 4 per i minisatelliti e in tabella 5 per le RAPD-PCR, utilizzando 2 µl del DNA genomico come template.

**Tabella 4. Protocollo di amplificazione Minisatelliti**

	AGA1			DAN4 (*)			HSP150			SED1		
FASE	T°C	Tempo	Cic	T°C	Tempo	Cic	T°C	Tempo	Cic	T°C	Tempo	Cic
Denaturaz. Iniz	94	3'	1	94	3'	1	94	3'	1	94	3'	1
Denaturazione	94	1'	35	94	45"	30	94	45"	35	94	1'	35
Appaiamento	64	1'	35	68	30"	30	68	30"	35	64	1'	35
Estensione	72	2'	35	72	1'	30	72	1'	35	72	2'	35
Estens. finale	72	7'	1	72	7'	1	72	7'	1	72	7'	1

(\*): il protocollo termico di 30 cicli indicato è preceduto da uno stage di 9 cicli (denaturazione 94 x 45", appaiamento 70 x 30", estensione 72 x 1') nei quali ad ogni ciclo si ha la riduzione di 0,5° C della temperatura di appaiamento.

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti in un volume finale di 25 µl per reazione:

AGA1: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 3 pmol AGA1f (5'-GTGACGATAACCAAGACAAACGATGCAA-3'); 3 pmol AGA1r (5'-CCGTTTCATGCATACTGGTTAATGTGCT-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf, North America), 1X Taq buffer.

DAN4: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 30 pmol DAN4f (5'-AGCGCTTTCAAAGGATGGTATTTACA-3'); 30 pmol DAN4r (5'-CCGTTTCATGCATACTGGTTAATGTGCT-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

HSP150: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 30 pmol HSP150f (5'-CACTTTGACTCCAACAGCCACTTACA-3'); 30 pmol HSP150r (5'-TACCGGACAAACATTGGTAGAAGACA-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

SED1: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,12mM dNTPs; 2 pmol SED1f (5'-ATGAAATTATCAACTGTCCTATTATCTGCCGG-3'); 2 pmol SED1r (5'-

TTATAAGAATAACATAGCAACACCAGCCAAACC-3'); 0,6 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

Un'aliquota di 1 µl del prodotto di amplificazione è stata analizzata su gel di agarosio all'1,4%, in TAE buffer a 60V per 80 min. Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) e il 100 bp sono stati utilizzati come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande. Successivamente colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad).

**Tabella 5. Protocollo di amplificazione di RAPD-PCR**

FASE	M13			1254		
	T °C	Tempo	Cicli	T °C	Tempo	Cicli
Denaturaz. iniz	94	2'	1	94	2'	1
Denaturazione	94	1'	40	94	1'	40
Appaiamento	36	1'	40	36	1'	40
Estensione	72	2'	40	72	2'	40
Estensione finale	72	7'	1	72	7'	1

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti in un volume finale di 25 µl per reazione:

M13: 5mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 20-30 ng di M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer;

1254: 6mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 20-30 ng di 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

Un'aliquota di 1 µl del prodotto di amplificazione è stata analizzata su gel di agarosio al 2,5%, in TAE buffer a 60V per 120 min. Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande. Successivamente

colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad).

### **Analisi statistica**

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati tre algoritmi qui di seguito descritti.

*Metodo K-means.* Il metodo *k*-means (Mc Queen, 1967) considera la bipartizione del collettivo che minimizza la devianza interna ai gruppi e procede, ad ogni passo, suddividendo il gruppo avente devianza maggiore, in modo che la devianza interna complessiva risulti minima (il che equivale a massimizzare la distanza tra i centroidi dei gruppi). Tale impostazione è applicabile anche qualora si facciano  $K > 2$  suddivisioni all'interno di ogni gruppo. Questo criterio viene utilizzato anche nell'ambito delle tecniche non gerarchiche di raggruppamento.

*Metodo di Ward.* Ad ogni passo vengono calcolate le devianze associate a tutti i raggruppamenti possibili e viene effettuata l'aggregazione che dà luogo al gruppo avente devianza minima. La distanza tra due gruppi è data dalla differenza tra la devianza complessiva e la somma delle devianze interne ai due gruppi, ovvero dall'incremento della devianza entro i gruppi dovuto all'aggregazione in questione.

*Metodo UPGMA.* La distanza fra due cluster è calcolata come la distanza media fra tutte le coppie di oggetti nei due cluster differenti.

### **Assimilazione fonti carboniose (Kurtzman and Feel, 1998)**

Per i test di assimilazione i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono stati piastrati in YNB agarizzato con 1 ml di indicatore blu di bromotimolo al quale sono stati aggiunti singolarmente glucosio, galattosio, saccarosio, raffinoso, maltosio, xilosio e trealosio (2% W/v).

Le prove di assimilazione del trealosio sono state fatte in YNB liquido ed agarizzato con 1 ml di indicatore blu di bromotimolo ed aggiunta del tampone NaOH/succinato a pH 4, 4.8, 6.7, aggiungendo il trealosio al 2%

(W/v) come unica fonte carboniosa (Jules *et al.*, 2004). Tutte le prove sono state eseguite in triplo.

### **Amplificazione dei geni coinvolti nelle pathway del trealosio**

Per l'amplificazione dei geni *TPS1*, *NTH1*, *ATH1*, e *AGT1/AGT1/MAL11* sono stati utilizzati 3 µl di DNA genomico ottenuto dall'estrazione per le reazioni di PCR, secondo il protocollo descritto in tabella 6.

I primers per l'amplificazione del gene *ATH1*, *NTH1*, *TPS1* e di *AGT1/MAL11* sono stati costruiti sulla base della sequenza dell'ORF di S288C corrispondente di ciascun gene presente in banca dati.

**Tabella 6. Protocolli di amplificazione dei geni *TPS1*, *NTH1*, *ATH1* e *AGT1/AGT1/MAL11***

	<i>TPS1</i>			<i>NTH1</i>			<i>ATH1</i>			<i>AGT1/AGT1/MAL11</i>		
<b>FASE</b>	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli	T°C	Tempo	Cicli
Denaturaz. Iniz	95	4'	1	95	4'	1	95	4'	1	95	4'	1
Denaturazione	94	1'	35	94	1'	35	95	1'	35	95	1'	35
Appaiamento	56	1'	35	55	1'	35	57	1'	35	59	1'	35
Estensione	72	1'	35	72	1'	35	72	1'	35	72	1'	35
Estens. finale	72	7'	1	72	7'	1	72	10'	1	72	10'	1

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti in un volume finale di 25 µl per reazione:

*TPS1*: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 30 ng di *TPS1*<sub>up</sub> (5'-GTACAGCCGGGTGGTAGAGA-3') e *TPS1*<sub>lo</sub> (5'-GCATCGGGTTCATCAGTTTT-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

*NTH1*: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 30 ng di *NTH1* overdir (5'-CGGGATCCATGAGTCAAGTTAATACAAGC-3') e *NTH1* overrev (5'-CGGGATCCTATAGTCCATAGAGGTTTC-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

ATH1: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 30 ng di ATH1overdir (5'-CGGGATCCATGAAAAGAATAAGATCGCTT-3') e ATH1overrev (5'-CGGGATCCTTAATCATTGAGAACAATTTTC-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

AGT1/MAL11: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 200mM ciascuno di dATP, dCTP, dGTP, e dTTP, 30 ng di AGT1/MAL11up (5'-GGGCTTGAGGGACATACAGA-3') e AGT1/MAL11lo (5'-CGAGCTAGCTGAGGGTTTTG-3'), 30 ng di DNA genomico, 0.5 U Taq Polymerase (Eppendorf), 1X Taq buffer.

Un'aliquota di 2 µl del prodotto di amplificazione è stata analizzata su gel di agarosio all'1,5%, in TAE buffer a 70V per 60 min, successivamente colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al transilluminatore Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad). Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) è stato utilizzato come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande.

### Analisi di restrizione

I prodotti di amplificazione relativi ai geni *ATH1* e *AGT1/MAL11* sono stati analizzati rispettivamente con l'impiego delle endonucleasi di restrizione *StyI* e *MlyI* (BioLabs, New England). Le reazioni sono state condotte a 37° C per 120 min e successivamente inattivate a 65° C per 20 min.

In tabella 7 sono riportati i parametri di reazione utilizzati.

**Tabella 7. Reazioni di restrizione**

Reagenti	<i>StyI</i>	<i>MlyI</i>
Prodotto PCR	100 ng	100 ng
Buffer 10 X	2 µl	2 µl
Enzima	1 µl (10 U)	1 µl (10 U)
BSA 100 X	0,1 µl	0,1 µl
dH <sub>2</sub> O	A volume	A volume
Volume finale	20 µl	20 µl



Un'aliquota di 10 µl del prodotto di restrizione è stata analizzata su gel di agarosio al 3%, in TAE buffer a 60V per 90 min. Il DNA Ladder 1KB (10-0,5 kb Sigma) e il 100 bp (100-1500 bp Sigma) sono stati utilizzati come marcatore di peso molecolare per la determinazione della dimensione delle bande. Successivamente colorato in soluzione di bromuro di etidio ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, e fotografato al Chemi Doc XRS Imaging System (BioRad).

### **Sequenziamento dei geni *AGT1/MAL11* e *ATH1***

Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando i primers progettati sulle sequenze delle ORF dei geni *AGT1/MAL11* e *ATH1*; è stato realizzato dal servizio sequenziamento BMR Genomics dell'Università degli Studi di Padova (<http://www.bmr-genomics.it>).

I primer di sequenziamento utilizzati per il gene *AGT1/MAL11* sono stati i seguenti: *AGT1/MAL11a* (5'-TTACAGTAATCAAGAG-3'), *AGT1/MAL11b* (5'-GGTACTTTGAACGGGG-3'), *AGT1/MAL11c* (5'- AAGAAAGACTTTTAGC-3'), *AGT1/MAL11d* (5'- ACAGCAGTCACTTTAG-3') .

I primer di sequenziamento utilizzati per il gene *ATH1* sono stati i seguenti: *ATH1a* (5'-TCGCTTTGGTTCAATG-3'), *ATH1b* (5'-AATTCAACAACTTCC-3'), *ATH1c* (5'-GTATGTTGGTATTATG-3'), *ATH1d* (5'-CTGAGATATACTACAT-3'), *ATH1e* (5'-CCAGCATTCCCCTTTT-3'), *ATH1f* (5'-TTGATTGATTTAGGTG-3').

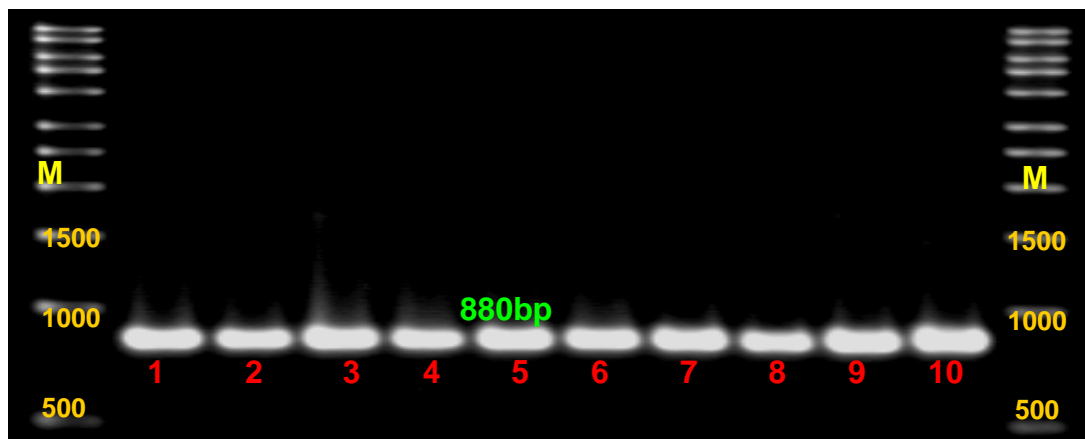
Le sequenze geniche ottenute sono state allineate utilizzando il software BLAST 2 (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Successivamente sono state predette le sequenze proteiche e confrontate tramite il programma Swiss Prot (<http://www.expasy.org/uniprot>).

## RISULTATI

## L'amplificazione dei minisatelliti *SED1* e *DAN4* rivela la diversa architettura genetica di *Saccharomyces cerevisiae* panario

L'amplificazione della regione ITS dell'rDNA ha prodotto un amplificato di 880 bp che in accordo con quanto riportato in letteratura identifica il genere *Saccharomyces* (foto1) (Guillamòn *et al.*, 1998; Granchi *et al.*, 1999; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999; Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve Zarzoso *et al.*, 2004).

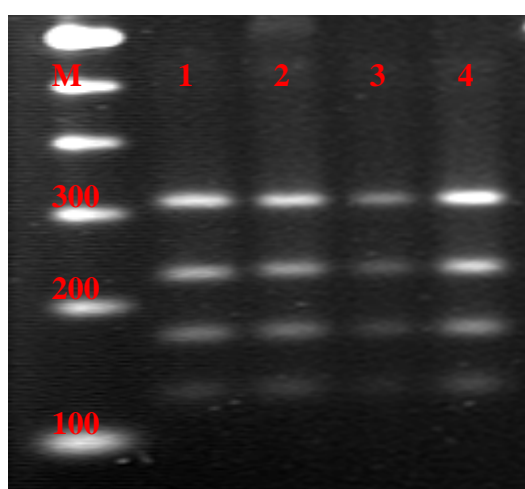


**Foto 1.** Prodotti delle regioni ITS: 1) amplificato di 880 bp ottenuto per amplificazione del DNA genomico del ceppo tipo (*CBS1171*) 2-10) amplificati della stessa dimensione in bp ottenuti per amplificazione del DNA di alcuni ceppi di diverse paste acide; M: marcatore di peso molecolare (1Kb) e dimensioni corrispondenti delle bande in bp.

Tuttavia, poiché gli ampliconi ottenuti da generi diversi possono risultare uguali o simili, per la corretta identificazione della specie è necessario ottenere e analizzare i profili di restrizione degli amplificati ottenuti. Per tutti i 75 ceppi utilizzati nel lavoro è stato riscontrato il profilo riportato in bibliografia per la specie *Saccharomyces cerevisiae* (tabella 8) (Kurtzman e Robnett, 1998; Guillamòn *et al.*, 1998; Esteve Zarzoso *et al.*, 1999).

**Tabella 8.** Dimensione in bp dei prodotti di PCR e dei frammenti di restrizione del ceppo tipo e dei ceppi analizzati

Ceppi	Prodotto PCR (bp)	Frammenti di restrizione (bp)		
		<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>CfoI</i>
CBS1171 <sup>1</sup> <i>S.c</i>	880	320-230-180-130	360-155	385-365
Ceppi in studio	880	320-230-180-130	360-155	385-365



**Foto 2.** Pattern di restrizione della regione ITS ottenuto con *HaeIII*: (M) marcatore di peso molecolare 100 bp; (1) CBS1171; corsie da 2 a 4 alcuni dei ceppi oggetto di studio isolati da paste acide

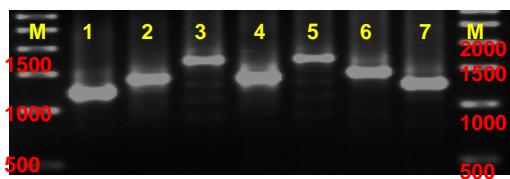
Per la caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* oggetto di studio sono stati utilizzati i marcatori molecolari minisatelliti, in accordo con Marinangeli *et al.*, (2004) e i primers di RAPD-PCR M13 e 1254, in accordo con Andrichetto *et al.*, (2000) e Torriani *et al.*, (1999). Sono stati amplificati i quattro geni di parete di *S. cerevisiae* *AGA1*, *DAN4*, *HSP150* e *SED1*. Le ORF dei quattro geni scelti presentano minisatelliti che causano polimorfismo di lunghezza. I risultati ottenuti mostrano che non tutti i minisatelliti hanno lo stesso potere discriminante; per esempio il gene *AGA1* nel 96% dei ceppi analizzati ha fornito un amplificato di uguale dimensione. Le dimensioni degli amplificati ottenuti

con l'uso dei minisatelliti sono state determinate attraverso l'opzione di calcolo disponibile nel software di acquisizione *Chemi Doc XRS Imaging System* (Quantity One, quantitation software - User Guide for Version 4) (BioRad Laboratories Inc., California), rispetto al marcatore di peso molecolare utilizzato (1Kb e/o 100bp). L'analisi dei risultati è stata effettuata sul potere discriminante di ciascun minisatellite, sulla base della frequenza (intesa come percentuale sul totale dei ceppi analizzati) con la quale lo stesso amplificato compare nei ceppi isolati dalle diverse paste acide. Qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti per i 4 geni analizzati:

AGA1: sono stati ottenuti 3 amplificati di dimensione compresa tra 1150 e 1270 bp (1150 bp; 1200 bp; 270 bp). Il ceppo tipo *CBS1171* ha mostrato l'amplificato di 1200 bp come riportato da Marinangeli *et al.* (2004). Nel 96% dei ceppi è stato ottenuto un singolo amplificato di 1150 bp, e nel restante 4% amplificati di dimensioni diverse.

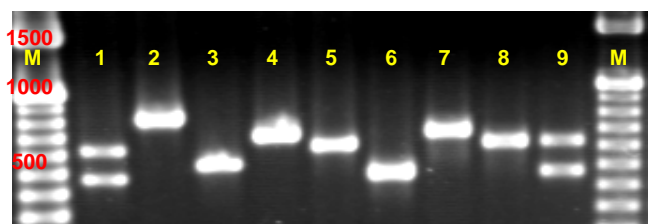
HSP150: l'amplificazione del gene *HSP150* ha fornito 3 amplificati di dimensione variabile tra 800 e 1200 bp. L'amplificato più frequente è quello di 1000 bp, evidenziato nel 31% dei ceppi; seguito dall'amplificato di 1100 bp presente nel 28% dei ceppi, nella maggior parte dei ceppi come singola banda (20%).

DAN4: l'amplificazione di *DAN4* ha prodotto 7 amplificati diversi, di dimensione compresa tra 850 e 1700 bp. Il 34% dei ceppi mostra un profilo con un singolo amplificato dove il più frequente ha una taglia di 1400 bp, il 13,5% mostra un profilo con due bande e il 9% un profilo con 3 bande (foto 3).



**Foto 3.** Amplificati ottenuti dall'amplificazione del gene *DAN4*: (1) CBS1171 di 1200 bp; corsie da 2 a 5 amplificati di diversi ceppi panari, corsie 6-7 amplificati di due ceppi vinari

*SED1*: per il gene *SED1* sono stati ottenuti 9 ampliconi di dimensione variabile da 900 a 1400 bp (900; 1000; 1100; 1150; 1200; 1230; 1300; 1350; 1400 bp). La taglia di amplificato più frequente per questo gene è di 1000 bp (nel 35% dei casi in singolo) seguita da quella di 1150 bp trovata nel 22% dei ceppi; nella foto 4 sono mostrati alcuni dei profili ottenuti.



**Foto 4.** Amplificati ottenuti per amplificazione del gene *SED1*: corsia 1: CBS1171 (1000 bp); corsie da 2 a 9 amplificati ceppi: V1-S18-S21-S33-S34-S42-S51.

Nella tabella 9 che segue è riportato per ciascun ceppo il “profilo” di caratterizzazione molecolare che deriva dalla combinazione dei 4 minisatelliti.

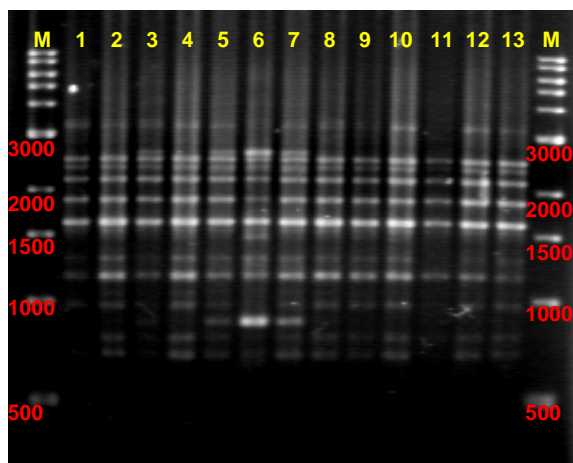
**Tabella 9. Profili dei ceppi per combinazione dei 4 minisatelliti. La dimensione degli amplificati espressa in bp**

Area	Substrato	Produttore	Ceppo	<i>AGA1</i>	<i>DAN4</i>	<i>HSP150</i>	<i>SED1</i>
Ceppo Tipo			<b>CBS1171</b>	1200	1470	850	1150
			<b>S228C</b>	1200	1470	850	1150
	vino		<b>V2</b>	1150	1100	850	1000
	vino		<b>V3</b>	1150	1400	1100	1350
	vino		<b>V4</b>	1150	1400	1150	1000
	vino		<b>V5</b>	1150	1400	1200	1200
	vino		<b>V6</b>	1200	1400	1300	1000

Area	Substrato	Produttore	Ceppo	AGA1	DAN4	HSPI50	SED1
	vino		<b>V7</b>	1200	850+1200	1150	1000
	vino		<b>V8</b>	1150	1400	1200	1200
	vino		<b>V9</b>	1150	1150	1100	1200
	vino		<b>V10</b>	1150	1700	850	1000+1150
	vino		<b>V11</b>	1150	1200	1100	1000+1150
	vino		<b>V12</b>	1150	1100	800+1100	1000+1150
	vino		<b>V13</b>	1150	1500	1100	1000+1150
Ceppi comm	Starter enol		<b>X5</b>	1150	1100	1000+1100	1000
Ceppi comm	Starter enol		<b>SV04</b>	1270	1200	1000+1100	1000
Ceppi comm	Starter enol		<b>2056</b>	1150	1200	1000+1100	1000
Ceppi comm	Starter enol		<b>M69</b>	1150	1200	1000	900
Ceppi comm	Starter enol		<b>EC1118</b>	1200	1300	1000	1150
Ceppi comm	Starter enol		<b>ICVK1</b>	1200	1330	1000	1100
Ceppi comm	Lievito comp		<b>CP1</b>	1150	1250	1100	1000
Ceppi comm	Lievito comp		<b>CP2</b>	1150	1250	1100	1000
Ceppi comm	Lievito comp		<b>CP3</b>	1150	1250	1100	1000
Ceppi comm	Lievito comp		<b>CP4</b>	1150	1250	1100	1200
Marmilla	Pasta acida	a	<b>S1</b>	1150	1200+1300	1000	1000
Marmilla	Pasta acida	a	<b>S2</b>	1150	1200+1300	1100	1000
Marmilla	Pasta acida	a	<b>S3</b>	1150	1200+1300	1100	1000
Marmilla	Pasta acida	b	<b>S4</b>	1150	1300	1100	1000
Marmilla	Pasta acida	b	<b>S5</b>	1150	1200+1300	1000	1000
Marmilla	Pasta acida	b	<b>S6</b>	1150	1300	1000	1000+1150
Marmilla	Pasta acida	c	<b>S7</b>	1150	1300	1000	1000+1150
Marmilla	Pasta acida	c	<b>S8</b>	1150	1300	1000	1000+1150
Marmilla	Pasta acida	c	<b>S9</b>	1150	1400	1000	1000+1150
Nurra	Pasta acida	d	<b>S10</b>	1150	1200+1300	1000+1100	1150
Nurra	Pasta acida	d	<b>S11</b>	1150	1200+1300	1000	1150+1400
Nurra	Pasta acida	d	<b>S12</b>	1150	1500	1000	1150+1400
Nurra	Pasta acida	d	<b>S13</b>	1150	1500	1000	1000
Nurra	Pasta acida	e	<b>S14</b>	1150	1500	1000	1230
Nurra	Pasta acida	e	<b>S15</b>	1150	1500	1000	1100
Nurra	Pasta acida	e	<b>S16</b>	1150	1100	1000	1230
Nurra	Pasta acida	e	<b>S17</b>	1150	1400	1100	1200
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S18</b>	1150	1400	1000	1200
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S19</b>	1150	1400	1100	1350
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S20</b>	1150	1400	1000+1100	1000
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S21</b>	1150	1100	1000+1100	1200
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S22</b>	1150	1100	1000+1100	1300
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S23</b>	1150	1200	1000+1100	1100
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S24</b>	1150	1200	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S25</b>	1150	1200	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S26</b>	1150	1350	1000+1100	1200
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S27</b>	1200+1150	1600	1000+1100	1000
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S28</b>	1200+11500	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S29</b>	1200+11500	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S30</b>	1200+11500	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S31</b>	1200+11500	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	f	<b>S32</b>	1150	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S33</b>	1150	1400	1000+1100	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S34</b>	1150	1400	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S35</b>	1150	1400	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S36</b>	1150	1400	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S37</b>	1150	1400	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	<b>S38</b>	1150	1400	1000	1150

Area	Substrato	Produttore	Ceppo	AGA1	DAN4	HSPI50	SED1
Mejlogu	Pasta acida	g	S39	1150	1400	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	S40	1150	1200+1300	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	S41	1150	1200+1300	1000	1150
Mejlogu	Pasta acida	g	S42	1150	1200+1300	1000	1150
Lombardia	Pasta acida		S43	1150	1200	1000	1000
Lombardia	Pasta acida		S44	1150	1200	1100	1000
Lombardia	Pasta acida		S45	1150	1200	1100	1000
Lombardia	Pasta acida		S46	1150	1200	1100	1000
Sicilia	Pasta acida		S47	1150	1400	1100	1000
Sicilia	Pasta acida		S48	1150	1400	1100	1000
Sicilia	Pasta acida		S49	1150	1400	1100	1000
Sicilia	Pasta acida		S50	1150	1400	1100	1000
Sicilia	Pasta acida		S51	1150	1400	1100	1000

La RAPD con il primer 1254 (Torriani *et al.*, 1999) ha rivelato la presenza di 9 bande che combinate tra loro hanno formato 10 profili differenti. Con l'utilizzo del primer M13 (Andrighetto *et al.*, 2000) abbiamo ottenuto una notevole variabilità genomica tra i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* determinata dalla presenza di 18 bande e 23 profili. In particolare possiamo affermare che in tutti ceppi analizzati compreso il ceppo tipo CBS1171 sono sempre presenti le bande di 1650 -1900- 2200- 2600 bp (foto 5).

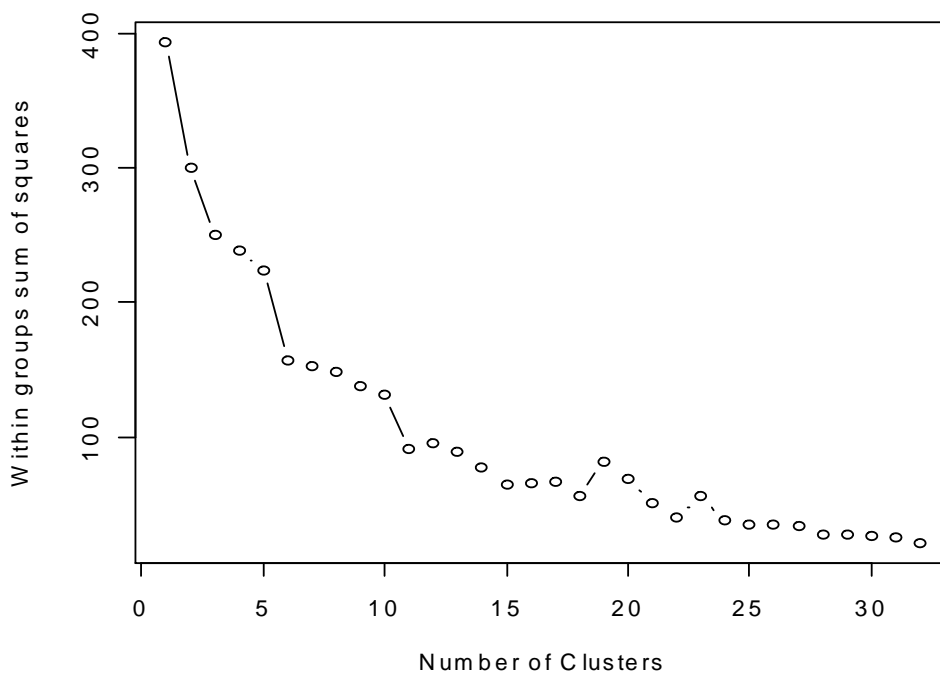


**Foto 5.** Profilo di RAPD ottenuto con il primer M13: (M) marcatore di peso molecolare; corsia 1: CBS1171; corsie da 2 a 13 ceppi: S18-S19-S20-S21-S22-S23-S24-S25-S26-S27- S28-S29.



### L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza

L'analisi statistica è stata effettuata confrontando i profili genotipici di M13 (RAPD) con quelli di *DAN4* e *SED1* (minisatelliti). Lo scopo dell'analisi è quello di raggruppare insieme oggetti (ceppi) con profili di amplificazione simili. È stata costruita una matrice binaria in cui il valore 1 rappresenta la presenza di una banda di PCR, mentre 0 la sua assenza in ciascuno dei 75 ceppi analizzati. Per la costruzione di questi gruppi di somiglianza (cluster) esistono diversi approcci matematici. Nel presente lavoro si è scelto l'algoritmo *k-means* perchè permette di determinare, a priori, il numero *k* di cluster in cui si vogliono suddividere i ceppi da analizzare. L'elemento chiave per l'analisi *k-means* è la scelta del numero "corretto" di cluster in cui suddividere i ceppi. Considerato che il numero "corretto" di cluster non è noto a priori ma deve essere determinato a partire dall'analisi dei dati stessi, è stata definita una misura della "qualità" di suddivisione ottenibile considerando un numero variabile di cluster da 1 a 32. L'indice di qualità utilizzato è la "*within cluster sum of squares*" che valuta la distanza dei singoli oggetti dal centro del cluster di appartenenza (Dudoit and Fridlyand, 2002) (Fig. 10).



**Figura 10.** Relazione tra la somma dei quadrati dei gruppi e il numero di cluster estratti (rappresentati nel grafico dai punti)

Nella figura 10 è possibile osservare come l'aumento del numero di cluster in cui vengono suddivisi i dati comporti una corrispondente diminuzione della distanza dei ceppi dal centro del cluster di appartenenza. Questo indica che tanto maggiore è il numero di cluster, tanto più simili sono i ceppi presenti all'interno di uno stesso cluster. Tuttavia incrementare troppo il numero di cluster oltre un certo limite comporta una variazione minima della distanza dei ceppi dal centro del cluster stesso fino a portare alla definizione di un cluster per ogni ceppo che, ovviamente, rende inutile l'analisi cluster stessa. Si è scelta, quindi, una soluzione (11 cluster per 75 ceppi) che comportasse una diminuzione significativa della variabilità interna al cluster (tabella 10).

**Tabella 10. Suddivisione dei ceppi nei cluster**

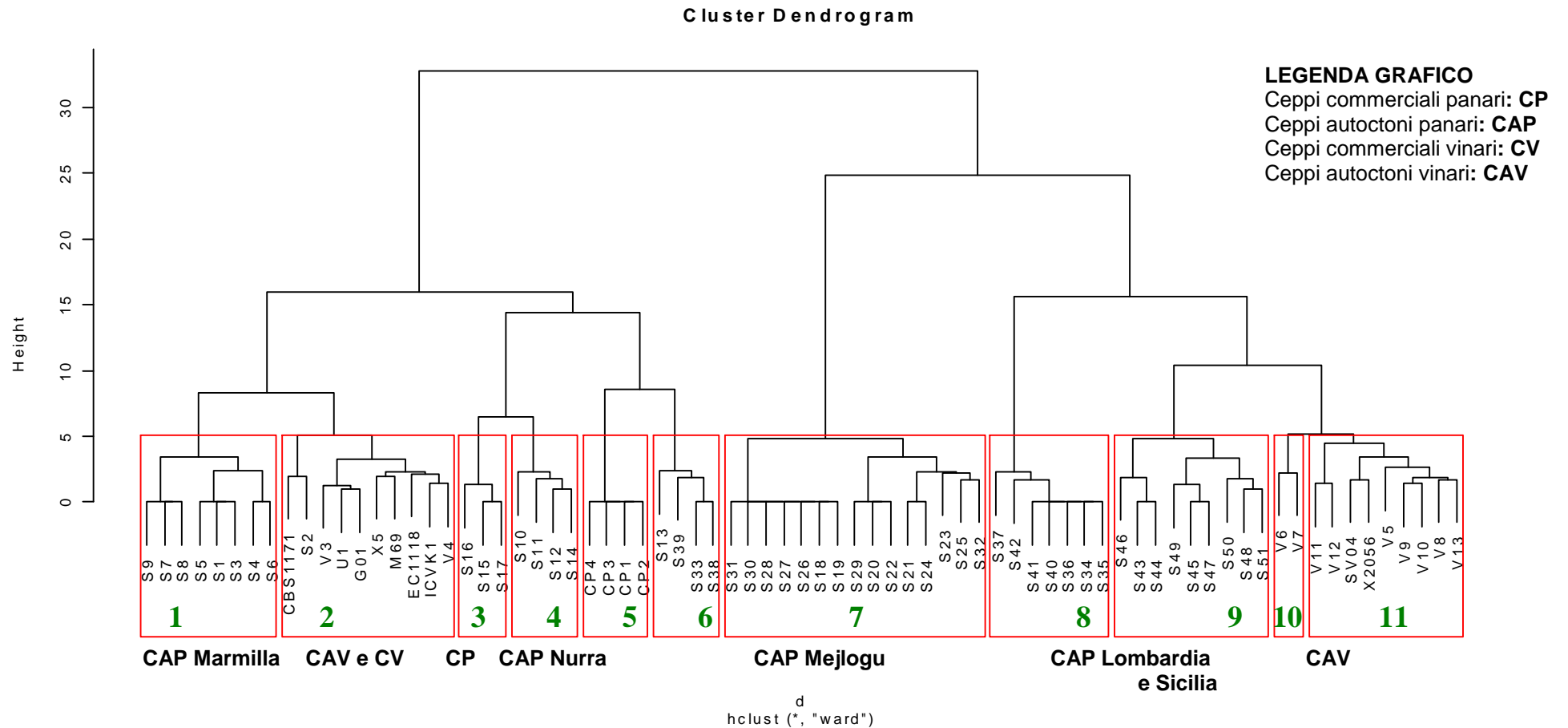
<b>Numero Cluster</b>	<b>Ceppi</b>
<b>1</b>	S43-S44-S45-S46-S47-S48-S49-S50-S51
<b>2</b>	S18-S19-S20-S21-S22-S23-S24-S25-S26-S27-S28-S29 S30-S31-S32
<b>3</b>	V5-V8-V9-V10-V13-SV04-2056
<b>4</b>	S10-S11-S12-S14-S15-S16-S17
<b>5</b>	S34-S35-S36-S37-S40-S41-S42
<b>6</b>	V6
<b>7</b>	S33-S38-S39-S13
<b>8</b>	X5-M69-EC1118-ICVK1-U1-G01-V4-V3 S1-S2-S3-S4-S5-S6-S7-S8-S9
<b>9</b>	V11-V12
<b>10</b>	V7
<b>11</b>	CP1-CP2-CP3-CP4-CBS1171

Nel cluster 1 sono presenti tutti ceppi panari autoctoni, in particolare i ceppi S43-S44-S45-S46 che provengono dal Milanese e i ceppi S47-S48-S49-S50-S51 che provengono dalla Sicilia. Nel cluster 2 sono presenti i ceppi che provengono dalla zona di Mejlugu ed in particolare dal produttore "f". Il cluster 3 comprende tutti i ceppi vinari autoctoni che provengono da Oliena e i due ceppi vinari commerciali SV04 e 2056. Al cluster 4 appartengono i ceppi provenienti da paste acide della Nurra dei produttori "d" ed "e", mentre al cluster 5 i ceppi panari che provengono dal produttore "g" della zona di Mejlugu. Nel cluster 6 e 10 si inseriscono due

diversi ceppi vinari autoctoni entrambi capaci di formare biofilm sulla superficie del vino (flor). Nel cluster 7 sono presenti i ceppi S33-S38-S39- che provengono dal produttore “g” della zona di Mejlogu e il ceppo S13 che invece proviene dal produttore “d” della Nurra. Nel cluster 8 ritroviamo i ceppi commerciali vinari X5-M69-EC1118-ICVK1, i ceppi vinari autoctoni della zona di Jerzu (U1-G01), i ceppi vinari della zona di Sorso (V3 -V4), e i ceppi S1-S2-S3-S4-S5-S6-S7-S8-S9 che provengono dai produttori “a, b, c” della zona di Marmilla. Nel cluster 9 sono presenti due ceppi vinari della zona di Alghero V11-V12. Infine, nel cluster 11 sono presenti i ceppi commerciali panari CP1-CP2-CP3-CP4 e il ceppo tipo CBS1171.

Oltre al metodo del *k-means* è stato utilizzato un algoritmo di agglomerazione estremamente diverso dal metodo sopra analizzato, basato non sulla suddivisione dei ceppi in cluster già predefiniti, ma sulla riunione dei ceppi in cluster via via più numerosi. Il risultato di questo sistema di agglomerazione che si basa su misure di similarità dei ceppi è un albero gerarchico, in cui la distanza fra oggetti diversi è rappresentata dai nodi in cui si riuniscono cluster differenti. Come misura di similarità è stata utilizzata la distanza euclidea, sicuramente il metodo più utilizzato, mentre come regola (o algoritmo) di agglomerazione è stato utilizzato il metodo di Ward. Questo algoritmo tende ad ottimizzare la partizione ottenuta tramite l'aggregazione di due elementi. Una partizione si considera tanto migliore quanto più le classi risultano omogenee al loro interno e differenti l'una dall'altra. Il metodo di Ward (metodo gerarchico) ha permesso di ottenere l'albero gerarchico illustrato in figura 11 in cui è possibile valutare la “distanza” (cioè il grado di dissimilarità) fra due oggetti. Utilizzando l'analisi precedentemente effettuata per la definizione del numero migliore di cluster in cui suddividere i dati, l'albero gerarchico è stato inoltre suddiviso in 11 cluster. Come si può vedere in figura è possibile raggruppare i ceppi commerciali panari CP1, CP2, CP3 e CP4 all'interno del cluster 5. I ceppi vinari V6 e V7, che nell'analisi con il K-means si trovavano su due cluster distinti, risultano ora raggruppati nel

cluster 10. I ceppi panari provenienti dalla zona di Marmilla sono raggruppati nel cluster 1 all'interno del quale possiamo vedere una suddivisione in altri tre sottocluster che differenziano i ceppi in base ai tre distinti produttori "a, b, e c". I ceppi vinari autoctoni fanno parte del cluster 11 e sono chiaramente distinti dagli altri. I ceppi panari provenienti dalla zona del Milanese e della Sicilia sono raggruppati nel cluster 9 all'interno del quale possiamo vedere una suddivisione in altri sei sottocluster. I 4 ceppi vinari commerciali si differenziano tra di loro però fanno parte del cluster 2 così come il ceppo tipo *CBS1171*, 4 ceppi vinari, e un ceppo panario proveniente da Marmilla. I ceppi provenienti dalla zona della Nurra fanno parte di due cluster distinti (cluster 3 -4) che evidenziano i diversi produttori. I ceppi provenienti dalla zona di Mejlogu fanno parte di tre cluster distinti, 6, 7 e 8 che indicano rispettivamente i produttori "a, b, c".



**Figura 11.** Dendrogramma degli 11 cluster (con i 75 ceppi analizzati) ottenuti con il metodo di Ward

### **L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari**

Non sono state registrate differenze di assimilazione degli zuccheri glucosio, maltosio, saccarosio, raffinoso nei 75 ceppi, fatta eccezione per il trealosio. Infatti, su YNB agarizzato aggiunto di trealosio come unica fonte carboniosa, i ceppi panari erano in grado di crescere, mentre i restanti ceppi non crescevano. Sulla base dei valori di similarità riportati nella fig. 11, sono stati scelti 37 ceppi per analizzare l'assimilazione del trealosio in YNB, sia agarizzato che liquido, tamponato a pH 4, 4.8 e 6.7 con aggiunta di trealosio al 2% (W/v) come unica fonte carboniosa in accordo con Jules *et al.*(2004).

Vista l'elevata similarità all'interno dei cluster i ceppi panari sardi sono stati scelti in base ai seguenti criteri: almeno un ceppo per ciascun produttore e zona di provenienza, per i cluster meno numerosi (Marmilla e Nurra), e 4 ceppi per i cluster più numerosi (Mejlogu). I ceppi panari siciliani e lombardi sono stati tutti analizzati.

In terreno agarizzato nessun ceppo assimila il trealosio a pH 6.7, mentre ci sono delle differenze per quanto riguarda le assimilazioni del trealosio a pH 4 e 4.8. I ceppi vinari e i panari della Nurra non assimilano il trealosio a nessun valor di pH; gli altri 26 ceppi panari hanno assimilato il trealosio sia a pH 4 che 4.8.

Poiché non sono state riscontrate differenze tra i ceppi che assimilavano al variare del pH da 4 a 4,8, tutti i ceppi sono stati fatti crescere solo su YNB liquido tamponato a pH 4 (Jules *et al.*, 2004). Come controllo gli stessi ceppi sono stati inoculati sia su YNB liquido senza fonti carboniose sia su YNB con glucosio al 2% (W/v) come unica fonte carboniosa. L'assimilazione del trealosio è stata valutata misurando la densità ottica (OD600) dopo 48 ore di incubazione in agitazione (200 rpm a 30 °C). I risultati ottenuti sono riportati nel Figura 12.

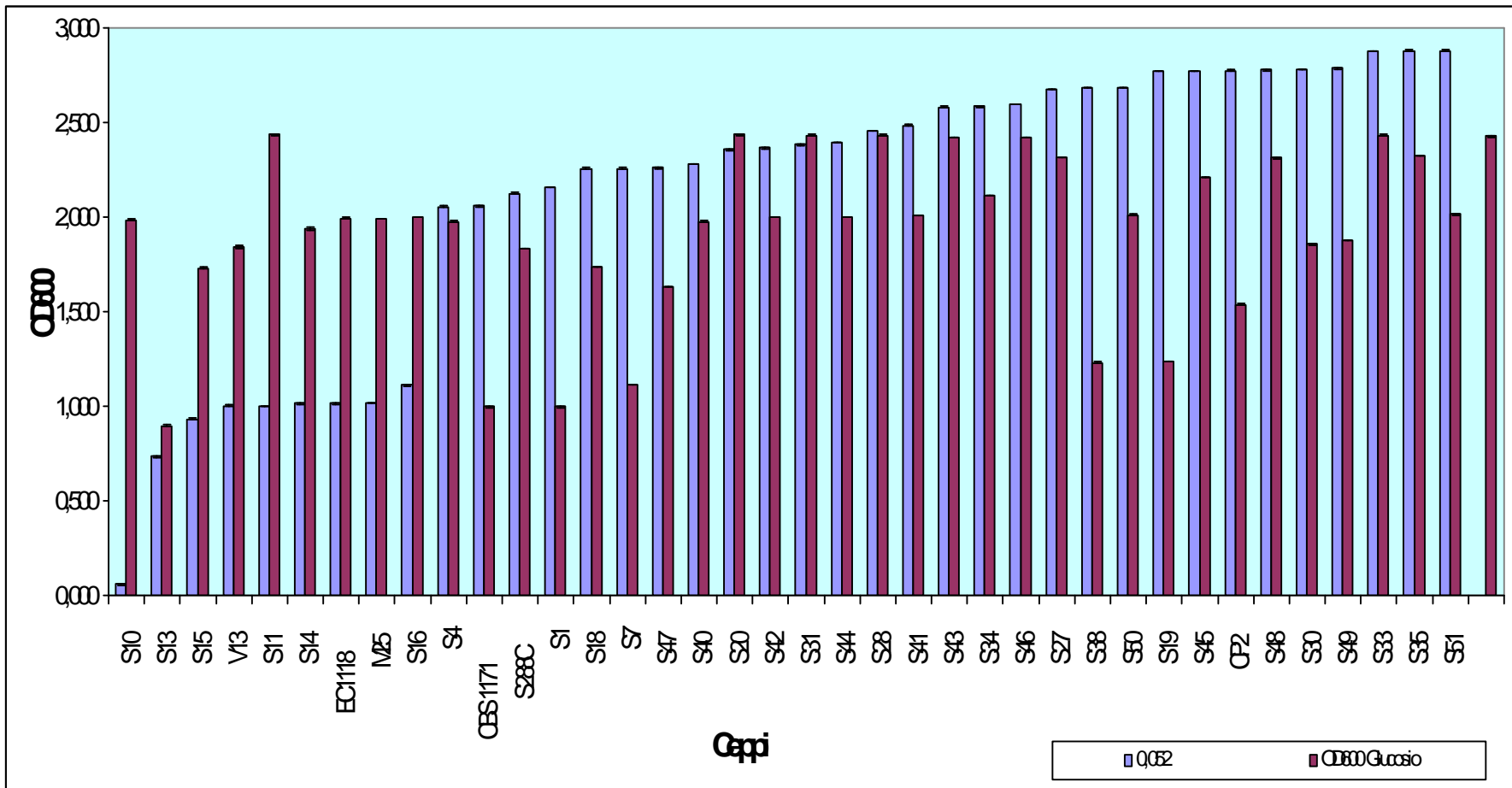
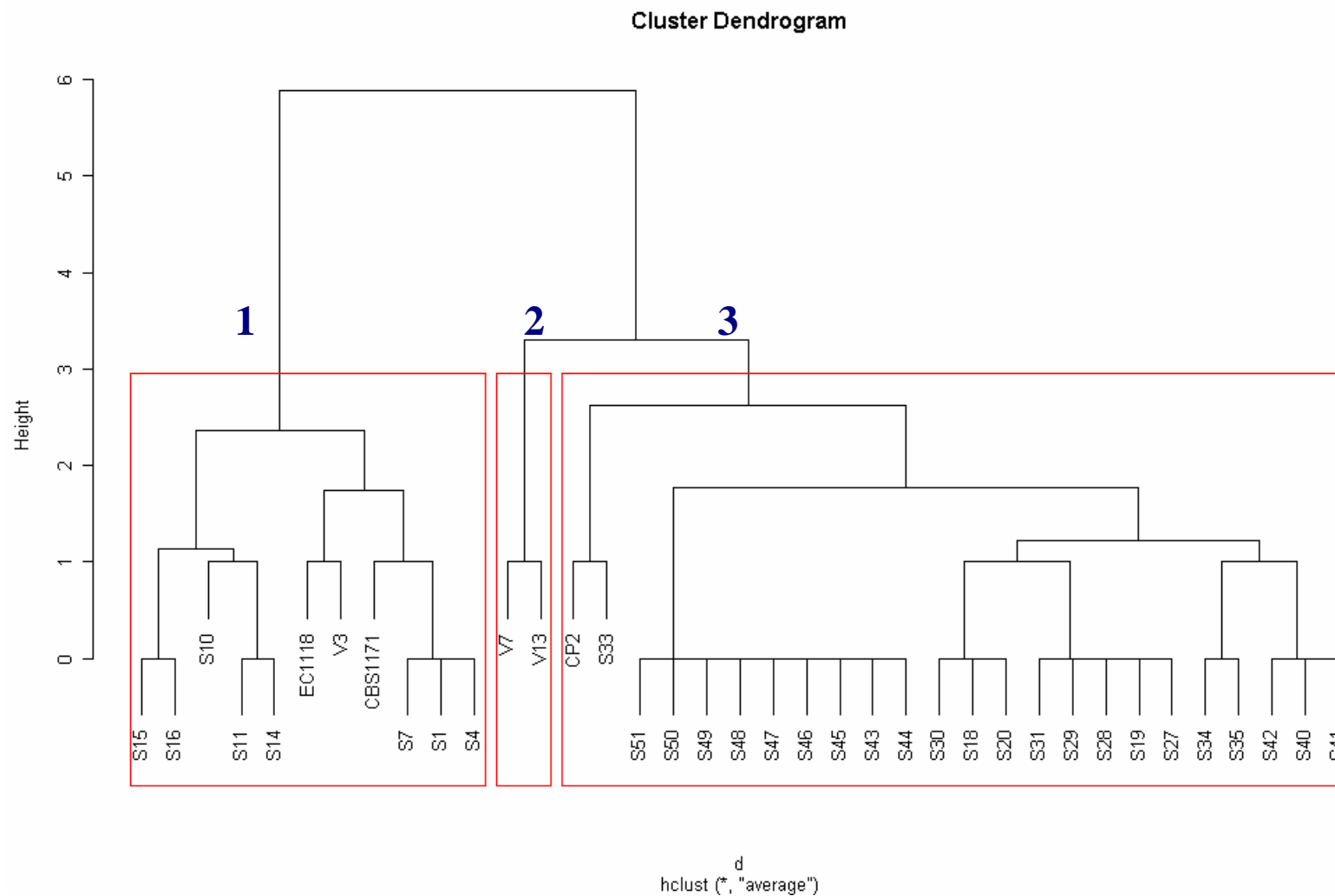


Figura 12. Media dei valori di OD600 dei 37 ceppi con la deviazione standard

Tutti i ceppi che non avevano assimilato il trealosio in terreno agarizzato hanno raggiunto OD600 inferiori a 1 YNB. La maggior parte dei ceppi panari ha raggiunto densità ottiche comprese tra 2,001 e 2,881.

I dati ottenuti per i 37 ceppi analizzati con il metodo UPGMA che ha raggruppato gli 11 profili genotipici ottenuti dall'analisi cluster con il metodo di Ward, con i 4 profili fenotipici dei ceppi ottenuti dall'analisi dell'assimilazione di trealosio in YNB liquido. Quest'analisi ha evidenziato 3 cluster ben distinti. Nel cluster 1 sono presenti i ceppi *EC1118*, V3, *CBS1171*, i 3 ceppi di Marmilla S1, S4, S7 e i ceppi della Nurra S10, S11, S14, S15, S16. In questo cluster solo i ceppi della Marmilla e il CBS1171 assiLombardia il trealosio. Nel cluster 2 sono presenti i ceppi V7 e V13, che non assiLombardia il trealosio. Infine nel cluster 3 sono raggruppati 24 ceppi panari che assiLombardia il trealosio (Mejlogu, Lombardia, Sicilia e il ceppo commerciale panario CP2). (fig. 13).





**Figura 13.** Dendrogramma ottenuto con la combinazione dei profili genotipici e fenotipici con metodo UPGMA  
 Peculiarità di *Saccharomyces cerevisiae* e quantificazione tramite Real-Time PCR delle specie microbiche panarie  
 Università degli Studi di Sassari

### **L'analisi delle sequenze di *AGT1/MAL11* e *ATH1* rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati**

E' stato amplificato il gene della trealasi neutra (*NTH1*) dei 37 ceppi utilizzati nelle assimilazioni del trealosio

In tutti i ceppi si è ottenuto un amplificato identico pari a 2800 bp come riportato in bibliografia (Zahringer *et al.*, 1997; Francois and Parrou, 2001). È stato poi amplificato il gene (*TPS1*) che codifica per la subunità del complesso del trealosio-6-fosfato sintetasi/fosfatasi. In tutti i ceppi è stato ottenuto un amplificato identico pari a 1655 bp come riportato in bibliografia (Vuorio, *et al.*, 1993).

Per meglio capire le differenze riscontrate nella capacità di assimilazione del trealosio nei ceppi è stato amplificato il gene *AGT1/MAL11*, chiamato anche *AGT1* (YGR289C) che codifica per un simporto ad alta affinità tra il disaccaride e gli ioni H<sup>+</sup> e appartiene alla superfamiglia dei trasportatori di zucchero (De Hertogh *et al.*, 2006).

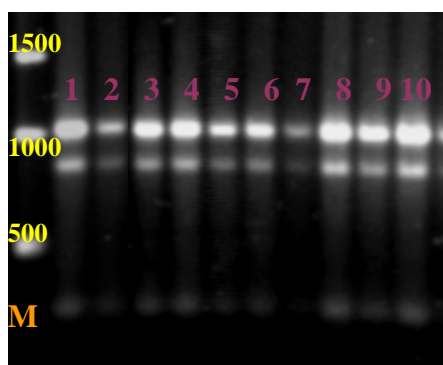
In tutti i ceppi si è ottenuto un amplificato identico pari a 2451 bp come riportato in bibliografia (Han *et al.*, 1995; De Hertogh *et al.*, 2006).

Tuttavia, poiché i dati ottenuti nelle prove di assimilazione erano differenti invece gli ampliconi ottenuti risultavano uguali, è stato necessario ottenere ed analizzare i profili di restrizione degli amplificati. Per l'ottenimento è stata utilizzata l'endonucleasi *MlyI*, presente nella mappa di restrizione ottenuta dall'elenco delle endonucleasi disponibili in banca dati per il gene *AGT1/MAL11*, che taglia due volte la sequenza; i pattern ottenuti sono riportati in tabella 11.

**Tabella 11. Dimensione in bp dei prodotti di PCR e dei frammenti di restrizione del ceppo tipo e dei ceppi analizzati**

<b>Ceppi</b>	<b>Prodotto PCR (bp)</b>	<b>Frammenti di restrizione (bp)</b>
<b>CBS1171<sup>†</sup> S.c</b>	2451	1243-828-380
<b>Ceppi in studio</b>	2451	1243-828-380

Nelle foto 8 è riportato i pattern ottenuti dall'analisi di restrizione del ceppo tipo e di alcuni dei ceppi isolati da alcune paste acide. Dal profilo di restrizione non si sono evidenziate delle differenze tra i ceppi che avevano assimilato il trealosio a pH 4 e quelli che non avevano assimilato.



**Foto 8.** Pattern di restrizione del gene *AGT1/MAL11* ottenuto con *MlyI*: (M) marcatore di peso molecolare 1 Kb; (1) CBS1171; corsie da 2 a 10 alcuni dei ceppi oggetto di studio isolati da paste acide.

La trealasi acida vacuolare è codificata dal gene *ATH1* ed ha un pH ottimale intorno a 4.5- 5.0.

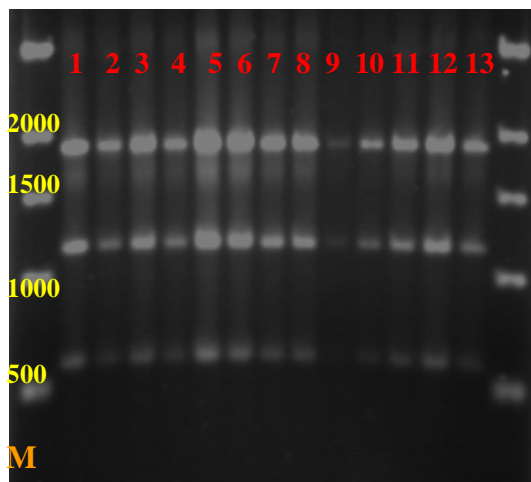
Nei 37 ceppi è stato amplificato il gene *ATH1*. In tutti i ceppi è stato ottenuto un amplificato identico, pari a 3600 bp come riportato in bibliografia (Destruelle *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1988).

Tuttavia, anche per il gene *ATH1* l'ottenimento di ampliconi uguali ha reso necessaria l'analisi del profilo di restrizione. È stata utilizzata l'endonucleasi *StyI*, presente nella mappa di restrizione ottenuta dall'elenco delle endonucleasi indicate in banca dati per il gene *ATH1*, che taglia due volte la sequenza; i pattern ottenuti sono riportati in tabella 12.

**Tabella 12. Dimensione in bp dei prodotti di PCR e dei frammenti di restrizione del ceppo tipo e dei ceppi analizzati**

Ceppi	Prodotto PCR (bp)	Frammenti di restrizione (bp)
CBS1171 <sup>1</sup> <i>S.c</i>	3600	1891-1163-582
Ceppi in studio	36600	1891-1163-582

Nelle foto 9 è riportato il pattern ottenuto dall'analisi di restrizione del ceppo tipo e di alcuni dei ceppi isolati da alcune paste acide. Anche per il gene *ATH1* il profilo di restrizione non mette in evidenza differenze tra i ceppi che avevano assimilato il trealosio a pH 4.8 e quelli che non sono risultati in grado di assimilarlo.



**Foto 9.** Pattern di restrizione del gene *ATH1* ottenuto con *StylI*: (M) marcatore di peso molecolare 1 Kb; (1) CBS1171; corsie da 2 a 13 alcuni dei ceppi oggetto di studio isolati da paste acide.

Sono stati scelti per le analisi delle sequenze i ceppi V3, S33 e CP2, che non assimila il trealosio il primo e che assiLombardia sia a pH 4 che a pH 4.8 gli altri due. Le sequenze dei tre ceppi sono state introdotte nella banca dati di *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces* Genome Database, Stanford CA, U.S.A) e sono state confrontate sia singolarmente con la sequenza del gene *AGT1/MAL11* del ceppo S288c, sia tra di loro inserendo i dati in BLAST. Il dato più interessante fra quelli ottenuti da questa analisi è stata la percentuale di identità, pari all'87%, tra il ceppo V3 e il ceppo S288c, come dimostrato in figura 14.

Score = 2176 bits (1178), Expect = 0.0

Identità= 1720/1968 (87%), Gaps = 92/1968 (4%)

```

Query  48      AGGAATGTCGACTTCTTAatTTTTATATGAAGC-GTTTCGG-GTTGATGGCTGGAAGAA 105
        ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  54      AGGAATGTCGACATCTTAATTTTTATATAAAGCGGTTT-GGTATTGATTGTTTGAAGAA 112

Query  106     TTGTC-GGTAGGGTGTCTT-TTTCTGATGCTAAATACAATTA-ATCaaaaaactaaaaaa 162
        || || | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  113     TTTTCGGGT-TGGTGT-TTCTTTCTGATGCTACATAGAAGAACATCAAACAATAAAAAA 170

Query  163     aTATTGTAA-AGCGAAAAGAATA-C-TGCCTTTGAAAAGGAAGATGAAATCATTCT-GA 218
        ||| | ||| | | ||| ||| | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  171     ATAGTATAATA-TG-AAA-AATATCATTTTCATTGGTAAGCAAGAAGAAGGC-TGCCTCAA 226

Query  219     GAAATGAGGAGAAATTGTTTTCTGAGTCTTCAAGAGA-ATTGTGAA-CATTTTGGAGGTT 276
        ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  227     AAAATGAGGATAAAAACATTTCTGAGTCTTCAAGAGATATTGTAAACCA-ACAGGAGGTT 285
.....

Query  1862    TTTT-ATAGCAAGAGGCTCCTGCGACATTAGTTGCATCAACAGTGGTTGA-CACATTCGG 1919
        ||| | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  1877    TTTTCA-ACCAAGGGGTTCCTGCCAGAAAATTTGCATCTACTGTGGTTGATC-CATTCGG 1934

Query  1920    ACAGGGAAAAACGCATCTTTGGT-CGCTAGCTG-TAGAGAGAATACAG 1965
        | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  1935    AAAGGGAAAAACTCAACAT-GATTCGCTAGCTGAT-GAGAGTAT-CAG 1979

```

**Figura 14.** Allineamento delle sequenze di *MAL11* del ceppo V3 e di S288C tramite BLAST

Dal confronto della sequenza genica dell'ORF di *AGT1/MAL11* di S288c con il ceppo V3, è stata rilevata la sostituzione in quest'ultimo di 197 paia di basi che corrispondono al 8,03% dell'intera sequenza. Di queste 197 differenze, 40 sono costituite da transizioni (sostituzioni all'interno delle purine (A e G) o delle pirimidine (C e T); 89 da trasversioni (purina sostituisce una pirimidina e viceversa) e 68 da delezioni di singole basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo V3 e quella del ceppo S33, dopo allineamento, è risultata pari al 99% con la presenza di 2 trasversioni, 2 transizioni e 4 singole delezioni per un totale di 8 sostituzioni di paia di basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo V3 e quella del ceppo CP2 è risultata pari al 98% con la presenza di 3 trasversioni, 3 transizioni e 14 singole delezioni per un totale di 20 sostituzioni di paia di basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo S33 e quella del ceppo CP2 è risultata pari al 96% con la presenza di 22 trasversioni, 7 transizioni e 29 singole delezioni per un totale di 58 sostituzioni di paia di basi. Lo stesso lavoro è stato svolto per le sequenze dei tre ceppi relativamente al gene *ATH1*. Per questo gene tra il ceppo V3 ed S288c è stata ottenuta una percentuale di identità pari al 97% come dimostrato in figura 14. Rispetto alla sequenza dell'ORF di *ATH1* di S288c sono state trovate nel ceppo V3 un totale di 22 sostituzioni di paia di basi, che corrispondono al 0,6% della sequenza totale. Di queste 22 differenze 2 sono transizioni; 8 trasversioni e 12 delezioni di singole basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo V3 e quella del ceppo S33, dopo allineamento, è risultata pari al 99% con la presenza di 2 trasversioni, 2 transizioni e 2 singole delezioni per un totale di 6 sostituzioni di paia di basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo V3 e quella del ceppo CP2 è risultata pari al 99%, con la rilevazione di 3 trasversioni, 3 transizioni e 2 singole delezioni per un totale di 8 sostituzioni di paia di basi. La percentuale di identità tra la sequenze del ceppo S33 e quella del ceppo CP2 è risultata pari al 98% con la presenza di 12 trasversioni, 3 transizioni e 2 singole delezioni per un totale di 17 sostituzioni di paia di basi.

Score = 2316 bits (1254), Expect = 0.0

Identità= 1315/1342 (97%), Gaps = 15/1342 (1%)

```
Query 168 AAAGAGTTCCAGGCTTACTTACTCACATGCCTCGAGGGCTGCCCTATTTAACCTCTGGG 227
          |||
Sbjct 210 AAAGAGTTCCAGGCTTACATACTCACATGCCTCGAGGGCTGCCCTATTTAACCTCTGGG 269

Query 228 TGTGATATCGCCGTCATTGGGAAATCATACTGTTGAACTACGATCCAGAAGCAAGGGAATC 287
          |||
Sbjct 270 TGTGATATCGCCGTCATTGGGAAATCATACTGTTGAACTACGATCCAGAAGCAAGGGAATC 329

Query 288 TTCTAAAAAACTTTATGAACTCCTTTCTGATTTCAACACGGCATATTATGATGATGAGAA 347
          |||
Sbjct 330 TTCTAAAAAACTTTATGAACTCCTTTCTGATTTCAACACGGCATATTATGATGATGAGAA 389

Query 1359 TTTAGAAATGACAGCAAGATCGTCCCTATTCCATTTACTAGCAAATACAAGAGATTACAA 1418
          |||
Sbjct 1404 TTTAGAAATGACAGCAAGATCGTCCCTATTCCATTTACTAGCAAATACAAGAGATTACAA 1463

Query 1419 TGTCTCGAGCGATAGGGGTCTTCCCGTGGGAGTTTCTGGTTTGTTCATCAGATTCCCTATGG 1478
          |||
Sbjct 1464 TGTCTCGAGCGATAGGGGTCTTCCCGTGGGAGTTTCTGGTTTGTTCATCAGATTCCCTATGG 1523

Query 1479 TGGTATGGNGTTCTGGGACGCA 1500
          |||
Sbjct 1524 TGGTATGGTGTCTGGGACGCA 1545
```

**Figura 15.** Allineamento delle sequenze di *ATH1* del ceppo V3 e di S288C tramite BLAST

Dalla sequenza genica abbiamo predetto la sequenze proteiche putative, tramite Swiss Prot ([www.expasy.org/uniprot](http://www.expasy.org/uniprot)), dei tre ceppi in esame che sono poi state confrontate con la sequenza proteica di S288c presente in banca dati (*Saccharomyces* Genome Database, Stanford CA, U.S.A). L'analisi di allineamento delle sequenze proteiche dei tre ceppi relativamente alla proteina AGT1/MAL11p ha portato all'identificazione per il ceppo V3 della proteina con una percentuale di identità pari al 30%, che è risultata pari all'80% per il ceppo commerciale panario CP2 e pari al 49% per il ceppo panario autoctono S33 rispetto alla proteina in S288c.

Le sequenze proteiche putative dei tre ceppi sono state poi confrontate tra di loro, inserendo i dati in BLAST, ottenendo per la proteina i seguenti risultati: la percentuale di similarità tra il ceppo V3 e S33 è pari al 53% concentrata all'inizio della sequenza; tra V3 e CP2 è pari al 66% ed infine, tra CP2 e S33 è pari al 95%.

L'analisi di allineamento delle sequenze proteiche dei tre ceppi relativamente alla proteina Ath1p ha portato all'identificazione della trealasi acida di *Saccharomyces cerevisiae* con una percentuale di identità pari al 80% per il ceppo V3, pari all'81% per il ceppo commerciale panario CP2 e pari al 80% per S33, ceppo panario autoctono.

Le sequenze proteiche putative di Ath1 dei tre ceppi sono state confrontate tra di loro, inserendo i dati in BLAST, ottenendo per la Ath1p i seguenti risultati: la percentuale di similarità tra il ceppo V3 ed S33 e tra V3 e CP2 è pari al 100% concentrata nei primi 175 aminoacidi della sequenza totale; infine tra CP2 e S33 è pari al 99% diffusa però su 450 aminoacidi.



## DISCUSSIONE

## **L'amplificazione dei minisatelliti *SED1* e *DAN4* rivela la diversa architettura genetica di *Saccharomyces cerevisiae* panario**

L'importanza della biotipizzazione all'interno della specie è fondamentale per studiare la biodiversità dei *S. cerevisiae*. Nel presente lavoro la variabilità genetica dei ceppi di *S. cerevisiae* è stata analizzata attraverso metodi molecolari con l'uso di marcatori minisatelliti e con RAPD-PCR. È stata infatti, rilevata la presenza di minisatelliti in alcuni geni di parete di *S. cerevisiae* che si comportano come siti di ricombinazione genica e causano polimorfismo di lunghezza dei geni stessi (Bishop *et al.*, 2000; Mannazzu *et al.*, 2002; Marinangeli *et al.*, 2004). I minisatelliti possono pertanto essere utilizzati come bersagli molecolari per la caratterizzazione mediante PCR-*fingerprinting* dei lieviti panari. In accordo con Marinangeli *et al.* (2004) è stata confermata la presenza di minisatelliti che creano variazioni di lunghezza negli amplificati ottenuti da ceppi diversi. I minisatelliti che sono risultati più significativi sono quelli di *DAN4* e *SED1*. *DAN4* è localizzato sul cromosoma 10 e appartiene al gruppo di geni *DAN/TIR*, che codificano per mannoproteine di parete e che si esprimono in condizioni di anaerobiosi (Sertil *et al.*, 1997; Abramova *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2001). (<http://www.yeast-genome.org>). Il gene *SED1* è localizzato sul cromosoma 4 e codifica per una glicoproteina di parete sintetizzata da *Saccharomyces cerevisiae* durante la fase stazionaria prevalentemente in risposta a fenomeni di stress (Caro, *et al.*, 1998; Shimoi *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998; Mannazzu *et al.*, 2002). (<http://www.yeast-genome.org>).

In generale, il livello di risoluzione di questa metodica è tale da discriminare ceppi differenti, rappresentando dunque un'alternativa ad altre tecniche di caratterizzazione molecolare o da utilizzare in combinazione con gli altri marker molecolari (Marinangeli *et al.*, 2004). In questo lavoro non è stata registrata un'ampia variabilità dei geni analizzati che, al contrario, sono risultati discriminanti per e tra i ceppi vinari. La tecnica VNTR è stata pertanto integrata con la RAPD-PCR. La RAPD-PCR è una tecnica molecolare che si basa sull'amplificazione di frammenti

casuali del DNA in esame (Randall *et al.*, 1988; Ness *et al.*, 1993; Quesada *et al.*, 1995). I vantaggi della tecnica sono la sua rapidità e la ridotta quantità di DNA necessaria per la reazione. I frammenti ottenuti risultano spesso variabili da ceppo a ceppo, consentendo un'indagine efficace della variabilità intraspecifica. Il primer non è complementare ad alcuna regione genomica nota e la reazione avviene in condizioni di bassa stringenza, cioè a temperature di annealing molto basse, in modo che i primers possano appaiarsi anche a regioni del genoma con sequenza non esattamente complementare. Il profilo di amplificazione che si ottiene per ogni primer è composto da un numero variabile di bande. In genere per ottenere maggiore discriminazione si utilizzano più oligonucleotidi di innesco e si combinano i diversi profili ottenuti. In questo lavoro non è stato necessario combinare diversi primer in quanto il primer M13 ha permesso una differenziazione tra ceppi vinari e panari e, in alcuni casi, anche tra ceppi provenienti dallo stesso substrato, evidenziando un elevato polimorfismo.

### **L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza**

I profili genotipici ottenuti con la RAPD e con i marcatori molecolari minisatelliti sono stati analizzati statisticamente tramite diversi algoritmi della *cluster analysis*. Gli elementi su cui si basa questa tecnica di raggruppamento sono l'oggettività, in quanto deve garantire risultati identici se applicata da persone diverse; la stabilità; la qualità dell'informazione e la semplicità. Per l'osservazione dei profili genotipici nel lavoro è stato utilizzato il metodo *K-means* affiancato al metodo di Ward. A differenza di altre metodologie, l'algoritmo *k-means* permette di determinare, a priori, il numero *k* di cluster in cui si vogliono suddividere i ceppi. L'elemento fondamentale per l'analisi *k-means* è dato dalla scelta del numero "corretto" di cluster di partenza (Dudoit e Fridlyand, 2002). Sono stati perciò assegnati 11 cluster in cui sono stati chiaramente discriminati i ceppi in base alla loro provenienza, vinari e panari, e in base alla loro origine, commerciali e wild-type.

Oltre al metodo del *k-means* è stato utilizzato un algoritmo di agglomerazione estremamente diverso dal metodo sopra analizzato: l'algoritmo di Ward che è basato, non sulla suddivisione degli oggetti in cluster predefiniti, ma sulla riunione di oggetti in cluster via via più numerosi. Il risultato di questo sistema di agglomerazione, che si basa su misure di similarità degli oggetti, è un albero gerarchico in cui la distanza fra oggetti diversi è rappresentata dai nodi in cui vengono riuniti i cluster differenti. L'albero gerarchico ha portato come risultato la suddivisione dei 75 ceppi in 11 cluster, in cui sono stati differenziati i commerciali panari dai commerciali vinari, gli autoctoni vinari da quelli panari. All'interno dei ceppi autoctoni panari si è evidenziata una differenza fra le zone di produzione e ancora, all'interno di queste, fra i produttori.

Per alcuni aspetti i due approcci statistici hanno portato a risultati simili, infatti i ceppi panari sono stati ben distinti dai ceppi vinari sia con il metodo *K-means* che con il metodo di Ward. I ceppi isolati da diverse paste acide presentano un elevato grado di variabilità intraspecifica, il che fa escludere che provengano da contaminazioni da lievito compresso, ma piuttosto possono essere considerate specie autoctone di *Saccharomyces cerevisiae* (Foschino *et al.*, 1999; Pulvirenti *et al.*, 2004; Paramithiotis *et al.*, 2007) in accordo con Corsetti *et al.*, (2001) che indica *Saccharomyces cerevisiae* come la specie prevalente nelle paste acide del Sud Italia.

I risultati ottenuti con l'analisi statistica che ha confrontato i diversi profili metabolici ha permesso di individuare i ceppi rappresentativi all'interno di ciascuno degli 11 cluster formati. Gli 11 profili genotipici sono stati analizzati insieme con i 4 profili fenotipici ottenuti dai dati sull'assimilazione del trealosio, molecola chiave in *Saccharomyces cerevisiae*.

Il pattern di accumulo e utilizzazione del trealosio mostra come la funzione principale di questo carboidrato è quella di costituire una riserva energetica per la cellula (Singer e Lindquist, 1998; Mensonides *et al.*, 2005). In condizioni di sviluppo esponenziale, infatti, le quantità intracellulari di questo disaccaride sono minime, mentre in fase stazionaria

costituisce circa il 20% del peso secco cellulare (Singer e Lindquist, 1998). Le funzioni del trealosio sono molteplici e il suo ruolo diventa di cruciale importanza in condizioni di stress cellulari (Attfield, 1997). Il trealosio in campo industriale è usato come stabilizzatore per diverse molecole e gioca un ruolo chiave nella preservazione dell'integrità strutturale e funzionale di componenti cellulari (Gadd *et al.*, 1987; Gelinis *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1990).

### **L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari**

La combinazione dei profili genotipici e dei profili fenotipici è stata analizzata statisticamente con l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Grouping Matching Average) chiamata anche Best Average e/o "miglior vicino", che fornisce, attraverso il dendrogramma, una semplice lettura e interpretazione dei risultati. Questo approccio ha permesso di ottenere un albero gerarchico di 3 rami in cui sono stati differenziati nettamente i 2 ceppi vinari flor, inseriti nel secondo cluster, dal resto dei ceppi analizzati. Per i ceppi panari autoctoni si è ottenuta una netta separazione fra le zone di provenienza. Infatti, i ceppi siciliani, del milanese e di Mejlogu li ritroviamo nel cluster 3, mentre quelli della Nurra e di Marmilla nel cluster 1. I ceppi di Mejlogu, inoltre, sono stati suddivisi in due sottocluster differenziando in questo modo i due diversi produttori. Anche l'approccio fenotipico, che tiene conto della capacità dei ceppi di crescere in presenza di trealosio, ha confermato la similarità fra i ceppi appartenenti al cluster 2; tutti questi ceppi, infatti, presentano un valore di OD600 superiore a 2, segnale di una elevata capacità di utilizzare il trealosio esogeno. Il cluster 1, al contrario, raggruppa sia i ceppi panari autoctoni, provenienti dalla Nurra e da Marmilla, sia i ceppi vinari, commerciale (*EC1118*) e autoctono (*V3*), che il ceppo tipo *CBS1171*. Questa variabilità è confermata anche dall'analisi fenotipica in quanto, fra i ceppi compresi in questo cluster, solo i panari di Marmilla e il ceppo tipo sono in grado di metabolizzare il trealosio esogeno. È importante sottolineare inoltre che, a differenza dei ceppi del cluster 3 che presentano valori di OD600 molto

simili fra loro (OD600 circa 2), i ceppi inseriti nel cluster 2 li possiamo suddividere in “buoni utilizzatori” e “medi utilizzatori”. Alla prima categoria appartengono i ceppi di Marmilla e il ceppo tipo, con valori di OD600 intorno a 2 e alla seconda i ceppi della Nurra e i due vinari elencati sopra (OD600 circa 1).

### **L'analisi delle sequenze di *AGT1/MAL11* e *ATH1* rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati**

L'analisi delle sequenze proteiche putative di AGT1/MAL11p nei ceppi V3, CP2, ed S33, ha portato dei risultati che mostrano una situazione simile. I ceppi CP2 ed S33, molto vicini nel cluster 3, hanno un grado di similarità con la sequenza di AGT1/MAL11p in S288c maggiore rispetto al ceppo V3, localizzato nel cluster 1. V3, infatti, mostra una percentuale di similarità del 30% rispetto al ceppo di laboratorio, ad indicare che la sequenza putativa del ceppo autoctono potrebbe non corrisponde alla proteina AGT1/MAL11p indicata in database. Non sembra, invece, avere influenza sull'assimilazione del trealosio esogeno la proteina predetta sulla sequenza del gene *ATH1* in quanto il confronto con il database delle proteine ha portato per tutti i ceppi una similarità di circa 80% con la trealasi acida Ath1p di S288c.

Quando le proteine putative, AGT1/MAL11p e Ath1p, dei tre ceppi analizzati, vengono blastate fra loro si evidenzia una alta similarità di sequenza tra i ceppi CP2 e S33, mentre il ceppo V3 dimostra avere una sequenza aminoacidica nettamente diversa. Questo supporta ulteriormente la grande distanza del ceppo V3 dai ceppi CP2 e S33 vicinissimi fra loro nel cluster.

Inoltre, studi di Microarray Karyotyping tramite array-CGH (Dunn et al., 2005) sui ceppi analizzati in questo lavoro confrontati con S288C, mostrano un set di variazioni comuni in diverse regioni cromosomiche, tra le quali degne di nota sono certamente le delezioni osservate nelle regioni sub-telomeriche dei cromosomi 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 14 e 15, La significatività di queste variazioni deve comunque essere confermata

dall'analisi statistica FACS (comunicazione personale Ladu, 2008). Infatti il gene *AGT1/MAL11* è localizzato nella regione sub-telomerica del cromosoma 7. In molti studi effettuati è stato riportato che le differenze osservate tra ceppi di laboratorio e ceppi autoctoni sono legate all'instabilità delle regioni sub-telomeriche e all'attività di retrotrasposizione degli elementi *Ty*, spesso localizzati nelle regioni telomeriche.

Al contrario, il ceppo di laboratorio S288C, è un ceppo che viene propagato in coltura pura da circa 70 anni, non è noto quale sia esattamente il suo background, anche se è stato stimato che circa l'85% del genoma di S288C deriva dal ceppo di Lindegren EM93 (Mortimer e Johnston, 1986). È possibile che si tratti di un ceppo "wild" panario, è certo comunque che non deriva da ceppi vinari comunemente diffusi e impiegati nel settore enologico (Mortimer e Johnston, 1986; Mortimer, 2000).

L'analisi con la tecnica array-CGH ha mostrato un trend comune di variazioni su tutti i ceppi analizzati, nel quale emergono delle possibili aneuploidie, molti dei ceppi sembrano aver acquistato copie in più dei cromosomi 4 e 12.

In particolare, l'acquisizione di copie in più di entrambi sono state osservate, nei carioscopi generati con JavaTreeview (<http://jtreeview.sourceforge.net>), sui ceppi: S1, S3, S4 S25 e S34; l'acquisizione del solo cromosoma 12 sui ceppi: S4 S8 S10 S14 S16 S33 S39 S42 CP2, e S25, l'unico che mostra una parziale acquisizione anche del cromosoma 4 (comunicazione personale Ladu, 2008).

Questi dati parziali sembrano comunque confermare e seguire il trend di quanto riportato finora in bibliografia in studi che hanno previsto l'applicazione di tale tecnica e/o microarray di espressione in popolazioni naturali di *Saccharomyces cerevisiae* rispetto al ceppo di laboratorio S288C (Huges *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2001; Dunham *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2003; Bond *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2005; Carreto *et al.*, 2008; James *et al.*, 2008; Kvitek *et al.*, 2008).

## **CAPITOLO II**

### **Messa a punto di un metodo molecolare mediante RealTime PCR per la quantificazione delle specie microbiche presenti nelle paste acide**



## Il lievito naturale e il lievito compresso

L'impiego del lievito naturale o del lievito compresso determina una durata di lievitazione differente e, quindi, una diversa conduzione del processo. Mentre il lievito naturale dà luogo a fermentazioni lunghe (6-8 ore), il lievito compresso, a seguito dell'elevata concentrazione di cellule per grammo ( $10^9$ ) assicura lievitazioni più veloci e più semplici della durata massima di un'ora. Al fine di produrre una quantità sufficiente di composti volatili, il processo di fermentazione con la pasta acida necessita di passaggi multipli di circa 12-24 ore; quando si usa il lievito compresso la fermentazione è completata in poche ore, insufficienti per la produzione di aromi (Hansen & Schieberle, 2005). La maggiore durata del processo di fermentazione in seguito all'utilizzazione del lievito naturale permette un'azione più prolungata degli enzimi proteolitici che attaccano il glutine rendendo il prodotto più ricco in aminoacidi. Inoltre, la maggior acidità dell'impasto, talvolta accompagnata da una più lunga durata di conservazione del prodotto, provoca un rallentamento nello sviluppo di muffe. Rispetto ai prodotti ottenuti da impasti acidificati o lievitati chimicamente, la fermentazione con la madre acida, assicura lo sviluppo di aromi grazie all'attività proteolitica dei batteri (Hansen *et al.*, 1989b). La fermentazione condotta con l'impiego in associazione di LAB e lieviti determina la formazione di composti aromatici diversi, rispetto ai composti ottenuti dalle fermentazioni condotte con starter costituiti con una sola specie di LAB (es. *L. brevis*) o con solo una specie di lievito (es. *S. cerevisiae*) (Meignen *et al.*, 2001).

La maggior durata del processo fermentativo con l'impiego del lievito naturale determina un'alveolatura più fine e regolare, dovuta ad una produzione di anidride carbonica più lenta e più graduale. Un aspetto molto importante è l'aumento del valore salutistico-nutrizionale dei prodotti da forno ottenuti con lievitazione naturale rispetto a quelli ottenuti con lievito compresso. Un esempio del potenziale delle paste acide è l'abilità di modificare la frazione della crusca del grano (ricca in fibre) in modo che

una sua maggiore quantità può essere utilizzata nel pane. L'importanza nutrizionale delle fibre è stata dimostrata in molti studi; se ne raccomanda il consumo di 25-30 g/die (Cummings & Frolich, 1993), attualmente invece il consumo giornaliero pro capite è di 20 g/die, quindi inferiore al consumo ottimale e ciò contribuisce alla diffusione e incidenza di diverse patologie, quali obesità, malattie coronariche e diabete di tipo 2. L'acidità prodotta durante la fermentazione abbassa il pH dell'impasto, interessando così l'attività enzimatica e le caratteristiche del glutine; il pH ottimale degli enzimi che degradano i carboidrati, come le amilasi, pentosanasi e  $\beta$ -glucanasi varia tra 3.6 e 5.6, a seconda della varietà del frumento e dello stato di germinazione. In aggiunta alle fibre i semi contengono un'ampia varietà di composti bioattivi, che contribuiscono all'esplicarsi di positivi effetti sulla salute, per esempio lignani, acidi fenolici, fitosteroli, tocoferoli e tocotrienoli e altre vitamine, concentrati nel germe e negli strati esterni del chicco. L'utilizzo delle paste acide modifica i livelli di questi composti bioattivi; tuttavia, ci sono pochi dati a disposizione. È stato riportato, per esempio, che le paste acide aumentano il contenuto di folati e diminuiscono invece il contenuto di tocoferoli e tocotrienoli (Liukkonen *et al.*, 2003; Kariluoto *et al.*, 2004). Oggetto di studio è anche la possibilità di impiegare la pasta acida per la produzione di pane con farine contenenti glutine, adatto ai pazienti celiaci; al momento però, è stato solo dimostrato che l'utilizzo della pasta acida è in grado di migliorare le proprietà sensoriali del pane privo di glutine (Arendt *et al.*, 2007).

In Italia per la preparazione di più del 30% dei prodotti da forno, compresi oltre 200 tipi di pane (INSOR, 2000), si ricorre all'uso di madre acida ottenuta da farina di grano. La maggior parte di questi prodotti sono depositari di un'antichissima tradizione e mostrano un'eccezionale variabilità da azienda ad azienda (Ottogalli *et al.*, 1996), sia per le materie prime utilizzate sia per le tecnologie adottate. Nel Nord Italia esiste una forte tradizione di prodotti da forno lievitati, realizzati per le festività religiose, come il panettone milanese, il pandoro di Verona (Ottogalli *et al.*, 1996) ed altri prodotti locali come le focacce dolci del Veneto, il cornetto, il

pandorino brioche e la pizza tradizionale. La quantità di pane prodotto (sia artigianale che industriale) nel 2006 ammontava a 3.5 milioni di tonnellate annue corrispondenti a 6 miliardi di Euro in valore, con un consumo pro-capite di 55 chilogrammi annui (AIBI, 2006). Secondo l'AIBI (Association Internationale de la Boulangerie Industrielle) oggi in Italia ci sono oltre 250 tipi di pane chiamati con 1.500 nomi diversi. Il mercato è diviso tra produzioni artigianali (63%) ed industriali (37%) .

### **La microflora delle paste acide e la loro classificazione**

Le paste acide sono state classificate in tre differenti categorie, in base al tipo di tecnologia utilizzata per il loro ottenimento e l'uso artigianale o industriale che se ne può fare (De Vuyst & Neysen, 2005). Si distinguono tre tipi di pasta acida, ciascuno caratterizzato da una specifica composizione della microflora. Le paste acide di *tipo I* sono prodotte con tecniche tradizionali e caratterizzate da un continuo e giornaliero rinfresco per mantenere i microrganismi in forma attiva. Questo tipo comprende: colture pure, preparazioni di starter in pasta (tipo Ia); colture miste, sviluppate spontaneamente, prodotte da grano, orzo o loro miscele con processi di fermentazione a più stadi (tipo Ib); paste acide prodotte ad alta temperatura in regioni tropicali (tipo Ic). L'industrializzazione del processo di panificazione e, di conseguenza, la necessità di controllare e velocizzare il processo di fermentazione, ha portato allo sviluppo delle madri acide di tipo II, che sono formulati semi-fluidi, utilizzati soprattutto per l'acidificazione dell'impasto. Queste madri acide sono prodotte ad alte temperature, con lunghe fermentazioni (più di 2 giorni) e alto contenuto di acqua; producono un elevato contenuto di acido lattico che porta il pH dell'impasto a valori inferiori a 3.5 in 24 h di fermentazione. Le paste acide di tipo III sono madri essiccate in polvere, avviate con l'impiego di colture starter. Sono utilizzate sia per acidificare che per favorire lo sviluppo di aromi. Contengono lattobacilli resistenti all'essiccamento, come *Lb. brevis* e *Lb. plantarum*. Questo tipo di madre acida risulta di facile impiego e i prodotti finali risultano standardizzati. Le madri acide del tipo II e III

necessitano dell'aggiunta di lievito compresso (*Saccharomyces cerevisiae*) per garantire la lievitazione (De Vuyst *et al.*, 2005).

La grande varietà di specie microbiche presenti inizialmente nelle paste acide naturali viene selezionata da fattori come temperatura e potenziale *redox*, la composizione chimica e microbiologica delle materie prime (De Vuyst & Neysen, 2005). Durante i rinfreschi la variazione del numero e delle specie microbiche dipende dal grado di idratazione dell'impasto *dough yield* ( $DY = \text{peso dell'impasto} / \text{peso della farina} \times 100$ ), dalla temperatura di lievitazione e, in generale, dalle condizioni di conservazione della madre acida (Gobbetti *et al.*, 1994a). L'influenza di questi parametri determina la selezione di una microflora caratteristica, formata da lieviti e batteri lattici, che può essere in grado di inibire la crescita di altri microrganismi derivanti dalla contaminazione delle materie prime e dell'ambiente. I LAB, sia le specie omo che eterofermentanti, contribuiscono notevolmente al processo di acidificazione della pasta; inoltre, anche i LAB eterofermentanti possono contribuire in misura ridotta alla lievitazione (Spicher, 1983; Gobbetti *et al.*, 1995). Nelle paste acide lattobacilli e lieviti vengono spesso ritrovati in associazione ed il loro rapporto numerico, pressoché costante, è di 100:1 (Ottogalli *et al.*, 1996). Durante la lievitazione dell'impasto i batteri lattici effettuano le fermentazioni omo ed eterolattiche. Gli omofermentanti obbligati fermentano gli esosi producendo esclusivamente acido lattico; non sono in grado di fermentare i pentosi e non producono gas. Gli eterofermentanti fermentano gli esosi producendo acido lattico, anidride carbonica, acido acetico ed etanolo. La presenza degli acidi lattico ed acetico in una giusta proporzione, cioè in un rapporto di 3:1, dà all'impasto un'acidità maggiore di quella riscontrabile con l'impiego del lievito compresso costituito esclusivamente dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Il rapporto tra acido lattico e acetico, definito come quoziente di fermentazione (FQ), è un importante fattore in quanto in grado di influenzare il profilo aromatico, e inoltre, di esercitare un certo ruolo sulle caratteristiche strutturali del prodotto. L'acido acetico, prodotto dai LAB eterofermentanti, rende la

maglia glutinica più corta e rigida, mentre l'acido lattico rende la struttura del glutine più elastica (Lorenz, 1983).

La maggiore acidità favorisce una maggiore conservabilità del pane e un'azione inibente verso lo sviluppo di microrganismi alterativi quali muffe (*Penicillium*, *Aspergillus spp.*) ed il *Bacillus mesentericus* agente del pane filante (Vicidomini, 2005). Le specie batteriche che più frequentemente sono state isolate da paste acide sono *Lactobacillus brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* e *Lb. sanfranciscensis* tra gli eterofermentanti, mentre tra gli omofermentanti quelli maggiormente rappresentati sono *Lb. acidophilus* e *Lb. delbrueckii*. Oltre ai lattobacilli si ritrovano i generi *Leuconostoc*, *Weissella* e *Pediococcus*. La dominanza delle specie "eterofermentanti obbligati", nella maggior parte delle paste acide, può essere spiegata tramite la maggiore competitività e capacità di adattamento di queste alle particolari condizioni ecologiche, di pH e di disponibilità di fonti di carbonio, che si stabiliscono nelle paste acide (Corsetti *et al.*, 2003).

Nelle paste acide è stata riscontrata, inoltre, una grande varietà di lieviti. *Saccharomyces cerevisiae* è la specie più frequentemente isolata (Barber *et al.*, 1989), ma sono stati isolati anche ceppi di *S. exiguus* (Foschino *et al.*, 1999) *Issatchenkia orientalis* e in misura minore anche microrganismi appartenenti al genere *Pichia* (Coppola *et al.*, 1996; Succi *et al.*, 2003); senza dimenticare la specie *Candida humilis*, che in alcuni casi si è dimostrata la specie dominante (Gullo *et al.*, 2003).

### **Stabilità delle paste acide e monitoraggio dei microrganismi**

Il primo passo per conoscere la microflora presente in un processo di fermentazione, come ad esempio la panificazione, consiste nell'identificazione dei microrganismi che la costituiscono. I metodi di microbiologia classica per l'identificazione dei microrganismi prevedono la comparazione delle caratteristiche morfologiche, fisiologiche, biochimiche, lo studio delle modalità di riproduzione vegetativa e, nel caso di specie con riproduzione sessuale, la valutazione della presenza e persistenza degli aschi, il numero delle spore e della loro forma (Kurtzman e Feel,

1998; Barnett *et al.*, 2000). Tuttavia, questi metodi non sempre conducono ad un'identificazione certa. Infatti, alcuni dei caratteri considerati sono sotto controllo monogenico e possono quindi venire modificati in seguito a singoli eventi mutazionali (Mannazzu e Budroni, 2005). Altri caratteri variano in funzione dello stato fisiologico degli isolati e delle condizioni colturali. Questi metodi, tutti del tipo "coltura dipendente", risultano essere in piú laboriosi, lunghi e, considerazione non trascurabile, spesso l'interpretazione dei dati ottenuti è resa difficoltosa dal fatto che specie diverse sono in grado di utilizzare le stesse fonti nutritive (Boulton *et al.*, 1996). Nella conduzione di tutti i processi biotecnologici, quali la panificazione, la vinificazione, e qualsiasi processo che implichi la presenza di microrganismi, è molto frequente che intervengano, parallelamente alla/e specie dominanti, anche altri microrganismi che influiscono sull'ottenimento del prodotto, sia qualitativamente che quantitativamente. È quindi importante disporre di strumenti che consentano di analizzare, in tempi brevi e nella maniera piú accurata possibile, la composizione della comunità microbica dell'alimento che si sta producendo ed il suo evolversi nel corso del processo fermentativo. Le paste acide per poter essere utilizzate, soprattutto a livello industriale, devono avere una composizione microbica stabile e riproducibile nel tempo (De Vuyst *et al.*, 2005). Nella pratica le paste acide vengono continuamente rinfrescate mediante l'aggiunta di farina ed acqua ed il loro utilizzo costituisce comunque una coltura di arricchimento dei microrganismi presenti e meglio adattati. I continui rinfreschi costituiscono un'opportunità per l'insediamento di microrganismi indesiderati e quindi per un cambiamento della composizione microbica delle paste, anche se a volte l'entità della modificazione è lieve (De Vuyst *et al.*, 2005). Le interazioni tra lieviti e batteri regolano la composizione e la stabilità del consorzio microbico, in base alle diverse esigenze colturali (fonti carboniose, pH e temperatura) e alla capacità di adattamento. La risposta ai diversi tipi di stress (temperatura, pH, presenza di sostanze antimicrobiche, competizione alimentare per le fonti carboniose e azotate,

ecc.) che regola l'adattabilità delle diverse specie e dei diversi ceppi presenti, può essere esaltata o inibita in seno alla comunità microbica. Da un punto di vista microbiologico monitorare il processo fermentativo significa essere in grado di controllare la presenza del/dei ceppi inoculati nel corso della fermentazione. Per questo scopo sono stati messi a punto metodi molecolari di identificazione e di caratterizzazione che permettono di individuare i lieviti, che agiscono durante il processo fermentativo, sia a livello di specie che di ceppo. Attraverso il monitoraggio è possibile valutare il contributo che i diversi microrganismi apportano alla fermentazione, e verificare l'effettiva presenza e dominanza dei ceppi inoculati nella pasta acida. Questo obiettivo può essere conseguito se i ceppi inoculati possono essere controllati (tracciati) nel corso della fermentazione. È importante pertanto poter rilevare la presenza dei microrganismi (lieviti e batteri) presenti nel complesso ecosistema pasta acida, e per far ciò si possono utilizzare metodi molecolari. Nel caso dei lieviti l'analisi PCR-RFLP, con il pattern di amplificazione del DNA digerito con le endonucleasi di restrizione *CfoI*, *HaeIII*, o *HinfI*, ci permettono di identificare le specie con precisione. Purtroppo, tutte queste tecniche, anche se rapide, non sono utili per determinare il numero di cellule presenti nel campione, un importante fattore da tenere in considerazione per il controllo dei microrganismi presenti nella pasta acida. In questi ultimi anni sono stati sviluppati numerosi sistemi di RealTime-PCR per poter individuare e stabilire l'entità di batteri e lieviti patogeni e non (Bleve *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2003; Casey e Dobson, 2004).

### **Metodiche basate sulla RealTime-PCR**

I sistemi basati sulla tecnica PCR si sono dimostrati idonei per individuare i lieviti, come ad esempio la PCR-RFLP. Le tecniche di PCR tradizionale servono per identificare (dare un nome) e/o tipizzare i microrganismi, per evidenziare la presenza e l'eventuale quantità di un microrganismo in un determinato ambiente naturale (monitoraggio), per studiare una

popolazione microbica naturale, allo scopo di verificarne il grado di polimorfismo genetico.

Il limite, delle metodiche molecolari citate, è dato dalla impossibilità di quantificare il DNA iniziale e quindi il numero di microrganismi presenti nella pasta acida. Indubbiamente questo rappresenta un grosso svantaggio, dato che il monitoraggio può fornire importanti indicazioni solo se affiancato da informazioni anche di tipo quantitativo. Per ovviare a questo problema è stata sviluppata, da diversi anni, una nuova metodologia di PCR, la RealTime PCR. Per la specificità e la sensibilità del metodo, la real-time PCR rappresenta oggi uno dei più promettenti metodi di PCR per il controllo microbiologico degli alimenti (Hein *et al.*, 2001; Bleve *et al.*, 2003; Blackstone *et al.*, 2003; Phister & Mills, 2003; Pinzani *et al.*, 2004; Haarman & Knol, 2005; Gonzales *et al.*, 2006).

La Real time PCR consente, infatti, di quantificare la sequenza target durante l'amplificazione. In questo modo è possibile conoscere la quantità di DNA presente all'inizio della reazione e, attraverso opportuni sistemi di normalizzazione, correlare tale quantità al numero di cellule presenti in un determinato substrato (Bustin, 2000). Inoltre la tecnica è estremamente sensibile e permette di rilevare anche il DNA di una singola cellula microbica.

La possibilità di individuare un basso numero di cellule e, quindi, confermare la presenza o assenza di *S. cerevisiae* o altri microrganismi presenti nel consorzio microbico è importante per valutare eventuali cambiamenti nella microflora e monitorare la stabilità della stessa nel tempo. Come nel caso della PCR classica, anche per la RealTime PCR, è di fondamentale importanza la scelta dei primer per l'amplificazione del DNA target. Martorell *et al.* (2005) hanno utilizzato la Real time-PCR per caratterizzare e quantificare ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* vinari. I primer sono stati progettati sulla base del sequenziamento di bande RAPD caratteristiche del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Questo metodo si è dimostrato utile per stimare direttamente la quantità di *S. cerevisiae* nei vini anche quando il lievito è presente in concentrazioni molto basse (da 3



a 5 CFU/ml). Hierro e collaboratori (2006) hanno utilizzato primer progettati sui domini variabili D1/D2 del gene ribosomiale 26S; questi primer mostrano buona specificità per tutte le specie di lieviti vinari testati. Nello stesso lavoro, gli autori hanno realizzato, per la prima volta, una Reverse Transcription-QPCR utilizzando i primer usati anche per la quantificazione dei lieviti. Rispetto alla real-time quantitativa tale tecnica risulta più informativa, in quanto permette di distinguere le cellule vive da quelle morte. Successivamente, gli stessi autori hanno utilizzato primer progettati sulle regioni fiancheggianti la regione ITS2 del gene ribosomiale 5.8 S per quantificare, mediante RealTime PCR, due delle specie di lievito più presenti durante il processo fermentativo, *Saccharomyces* e *Hanseniaspora* (Hierro *et al.*, 2007).

## SCOPO DEL LAVORO

Per implementare l'utilizzo delle paste acide in panificazione un aspetto di non secondaria importanza è la possibilità di controllare la presenza del/dei ceppi inoculati nell'impasto acido nel corso della produzione dello stesso. Si rende necessario pertanto, mettere a punto un metodo veloce ed affidabile per valutare la stabilità nel tempo della concentrazione cellulare sia dei singoli ceppi che fanno parte del consorzio microbico sia dei rapporti numerici stabilitisi tra le diverse specie microbiche al momento dell'inoculo.

Nel corso dell'ultimo decennio sono state proposte diverse metodiche molecolari basate sulla tecnica della PCR, soprattutto per la caratterizzazione dei lieviti, in particolare quelli vinari. Il grande vantaggio di queste metodiche è dato dall'elevato potere discriminatorio che permette di distinguere ceppi appartenenti alla stessa specie. Sono state inoltre implementate metodiche di RealTime PCR che permettono non solo di rilevare la presenza delle varie specie, ma anche di quantificarle con estrema precisione durante la fermentazione. Tuttavia, attualmente mancano delle metodologie che consentano di quantificare la presenza dei singoli ceppi di lievito durante la fermentazione. Scopo del presente lavoro è stato quello di progettare dei primer specie-specifici che permettano la quantificazione di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, *S. exiguus*, *Issactenkia orientalis*, *Pichia anomala* e di *Lactobacillus pentosus*. Sono state scelte le specie di lievito sopra elencate perché sono quelle maggiormente ritrovate in paste acide sarde.

# MATERIALI E METODI

### Ceppi e condizioni colturali

In questo studio sono stati utilizzati i ceppi riportati in Tabella 13, isolati da paste acide inoculate con diverse specie di lievito e con lattobacilli. I ceppi isolati sono depositati presso la collezione di microrganismi del DiSAABA (Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Università degli studi di Sassari).

**Tabella 13. Ceppi utilizzati**

<b>Substrato di isolamento</b>	<b>Nome identificativo</b>
Pasta acida	<i>PCC114 (S. exiguus); PCC118 (S. cerevisiae); P3 (P. anomala), E9 (I. orientalis); PCC974 (L. pentosus)</i>
Ceppi tipo	<i>CBS1171 (S.cerevisiae)- CBS 110 (P. anomala), CBS573 (I. orientalis) CBS133 (S. exiguus)</i>

Le colture da testare sono state fatte crescere su piastre di YPD (estratto di lievito 20 g/l, peptone 20 g/l, glucosio 20 g/l, bacto-agar 20 g/l) e per verificare lo stato di purezza di ciascuna coltura è stato utilizzato il terreno colturale WL (*Wallerstein Laboratoty Nutrient Agar*, OXOID). Una volta stabilita la purezza dei ceppi questi sono stati identificati e caratterizzati.

### Identificazione

Dagli isolati di *S. cerevisiae* PCC918, *S.exiguus* PCC914, *P.anomala* P3 e *Issactenkia orientalis* E9 è stato estratto il DNA genomico (Adams *et al.*, 1997). Inoltre il DNA totale delle paste acide è stato estratto con il *Nucleospin Food Kit* (Macherey-Nagel, Germany) in accordo con il protocollo indicato dal produttore.

Successivamente gli isolati sono stati identificati mediante PCR-RFLP delle regioni ITS dell'RNA ribosomiale (Guillamòn *et al.*, 1998; Esteve-Zaroso *et al.*, 1999). I prodotti di amplificazione ottenuti con i primer ITS1 e ITS4 sono stati digeriti con l'endonucleasi di restrizione *HaeIII*.

### **Analisi delle sequenze e progettazione di primer specie specifici**

Il sequenziamento degli amplificati della regione ITS è stato realizzato dalla Bmr Genomics (<http://www.bmr-genomics.it/>). Le sequenze relative agli amplificati sono state analizzate inizialmente mediante il software CHROMAS© 1.45 (McCarthy, Griffith University, Southport, Australia). Successivamente si è proceduto all'allineamento multiplo di tali sequenze utilizzando il software ClustalW © (*European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory*). Infine, i primer specie specifici da utilizzare mediante RealTime PCR sono stati progettati manualmente seguendo, quando possibile, le seguenti regole: dimensioni dell'amplicone di 75-150 bp, contenuto in GC del 50-60%, nessuna ripetizione di G o C superiore alle 3 basi, scarsa propensione alla formazione di strutture secondarie mediante il web-tool OPERON (<http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>).

### **Validazione dei primer specie-specifici mediante real-time PCR.**

Cinquanta ng di DNA sono stati utilizzati come template per le reazioni di PCR Real-Time utilizzando il termociclatore "iCycler iQ Real-Time PCR detection system instrument" (Bio-Rad, Lombardia). Inizialmente l'ottimizzazione delle condizioni di reazione ha previsto l'individuazione della migliore temperatura di annealing dei primer precedentemente progettati. Per questa analisi è stata utilizzata la seguente miscela di reazione: 2mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTPs; 1 µl SYBR Green (1:20.000); 0,2 µM di ciascun primer; 0,5 Unità di Platinum® Taq DNA polymerase, in un volume totale di 25 µl. Il protocollo termico ha previsto un primo ciclo a 95° C per 3 minuti in modo da attivare la Taq polimerasi Hot-Start utilizzata. Successivamente sono stati eseguiti 45 cicli a 95° C per 45 sec, 50°-60° C per 30 sec e 72° C per 30 sec. La fluorescenza è stata misurata durante la

fase di estensione. Al termine della reazione di PCR è stata effettuata una curva di Melting misurando il livello di fluorescenza dei campioni durante variazioni di temperatura comprese fra 50° C e 95° C. Successivamente è stata testata la specificità dei primer utilizzando il DNA di tutti i ceppi di *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *P. anomala* e *I. orientalis* utilizzati in questo lavoro. Infine, sono state costruite le curve standard per la quantificazione assoluta dei campioni. Per tale motivo è stato estratto il DNA da  $10^6$  cellule, determinate attraverso conte su piastra. Tale DNA è stato successivamente diluito serialmente (1:10) in H<sub>2</sub>Omq sterile. Per massimizzare l'accuratezza dell'analisi, le diluizioni sono state fatte in modo tale da includere la quantità di DNA attesa, corrispondente ad un range di circa  $10^2$  -  $10^8$  cellule/ml. Infine, è stata ottenuta una curva standard ponendo sulle ordinate i Cicli soglia (Ct) ottenuti e sulle ascisse il logaritmo del numero di cellule per ml. In questo modo, per ciascun campione sperimentale, il numero di cellule/ml viene calcolato per regressione lineare a partire da questa curva standard.

## RISULTATI



### **Metodo rapido di identificazione degli isolati**

Il DNA estratto direttamente dalle paste acide è stato sottoposto a PCR-RFLP della regione ITS (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). L'identificazione si è basata sulla comparazione del numero e della dimensione dei frammenti di restrizione ottenuti con quelli dei ceppi tipo di riferimento e con i singoli isolati. I risultati ottenuti con i due metodi di identificazione, attraverso l'utilizzo del DNA totale e del DNA da coltura pura, ci consentono di affermare che entrambi i metodi identificano le specie presenti nella pasta acida. Tuttavia, il metodo rapido di identificazione, previa estrazione del DNA totale, presenta diversi vantaggi. L'esecuzione è più rapida. Infatti, tenuto conto dei tempi di estrazione del DNA, amplificazione e restrizione, nell'arco di 10 ore è possibile ottenere l'identificazione dei campioni. I tempi di esecuzione del metodo classico sono decisamente più lunghi, più o meno 5-6 giorni; infatti, ai tempi necessari per l'analisi molecolare va aggiunto quello necessario per l'isolamento e l'ottenimento della coltura pura (circa tre giorni). E' un metodo economico, infatti i costi per l'amplificazione e l'analisi di restrizione del DNA sono gli stessi per i due metodi, mentre per il metodo classico a questo costo va aggiunto quello relativo alla fase di isolamento e ottenimento della coltura pura. La soglia di sensibilità è molto alta, il metodo rapido è infatti in grado di rilevare la presenza di specie che con l'isolamento della coltura pura risultano meno rappresentate; inoltre, consente di indagare anche su specie non coltivabili, ma che risultano attive da un punto di vista metabolico.

### **Costruzione di primer specie-specifici**

La costruzione di primer per RealTime PCR in grado di poter monitorare in tempi rapidi la presenza qualitativa e quantitativa dei ceppi di lievito nel corso della fermentazione, richiede l'individuazione di sequenze di DNA dotate di sufficiente variabilità interspecifica. In questo modo è possibile costruire dei primer capaci di appaiarsi solo alla specie target, e quindi originare un prodotto di amplificazione unico per ogni specie. Inizialmente

la ricerca di domini ipervariabili nel genoma del lievito ha riguardato le regioni ITS1 e ITS2 comprese fra i geni codificanti per l'RNA ribosomiale. Infatti, tali regioni sono state utilizzate in precedenza per discriminare ed identificare diverse specie di lievito (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Sono state quindi amplificate, sequenziate e allineate le regioni ITS1-2 in diversi lieviti ritrovati nelle paste acide per verificare l'effettiva possibilità di progettare primer specie-specifici. L'analisi di sequenza delle ITS1-2, amplificate nelle diverse specie di lievito, indicano come tali regioni siano adatte per l'identificazione e la progettazione di primers per PCR specie specifici. Sulla base dei risultati ottenuti sono state progettate coppie di primer specifici da utilizzare in Real Time PCR. In questo modo è possibile monitorare qualitativamente e quantitativamente i ceppi analizzati nel corso della fermentazione. Una volta validata su alcune specie la metodica proposta, sarà possibile estendere tale approccio anche a tutti i ceppi starter oggetto di futura selezione.

## CLUSTAL multiple sequence alignment

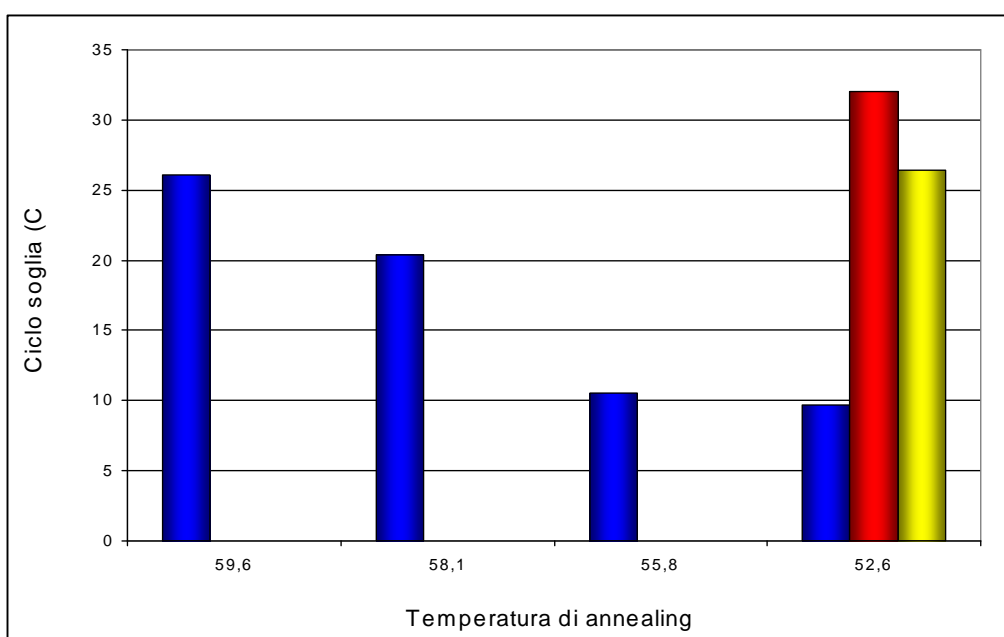
```

Issactenckia      TCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTG----TTT--GTTTTT-C-
Pichia            TCATCGTTGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAAAGATTTTAATTTTTGTT
Saccharomyces     TCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAA--T----ATTTT----
Saccharomyces_1   TCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAA--T----ATTTT----
*****  *****  *****  *****  *****  *****  *****
Issactenckia      -GTAGATTTCTCTTGTGCGACTATAT-GCT--ATA--TTCCA-CATTTTAGG-TGTGTTG
Pichia            AA-AAATTTT-C--AT-GACTAT-TGG-TTAA-AGGTTTTAACATTAATAAATGT-CTT-
Saccharomyces     -A-AAATTTT-C--A--G-TTAC---G---A-A-----A--ATTC-----T-T-GTT-
Saccharomyces_1   -G-G--TT-----A---CTGC---G-T--A-AG---CAG-AT-----T-T-G---
          **          *          *          * *          * **          * * *
Issactenckia      T-----TTTCGTTCCGCTCACGC-AG--TG-T-----AG--T--ACT--AAATCACAGT
Pichia            TAGACCTTT-GGGC-ACGCA-GCTAGGCTGATGCACCCAAAGCAAAGTTCAAA--A-A--
Saccharomyces     T-----TT-G---AC--A-A--AAATT--T-----AA--TGAA-T--AGAT-A-A--
Saccharomyces_1   -----AT-G---AC--A-----CTG-T-----A--T-AA-T--AGA--A-A--
          * *          * *          * *          *          * * * * * *
Issactenckia      A-A--T-GA---TCCT-TCCGCA-GGT-----AC-AC-C--T-A--CGGAAGGATCA-T-
Pichia            A-A-CTAGACAATG-TGT--GTAAGGTTTATCGCCGCGCAATTAAGCGCT-GG--CAATA
Saccharomyces     A-A-TT-G---T--T-T--GT---GTTT---GTTAC-C--TC---TG---GG--C--C-
Saccharomyces_1   ATAGTT-G---T--T-T--GT---GTTT---GCGAG-C--T-----G---GA--C--T-
          * * * *          * * * *          **          * *          * * *
Issactenckia      ATCGCAA-CC--CTGGGAA--TTTAACCTGGGGAAACCTC-G-ATT----T-TT-TA---
Pichia            TTTA-AATCTT-C----AAAATTTAA--AAGGA--TCTCTG-GTTTCCCCACCATAGAG
Saccharomyces     AG-A-AA-CTTAC---AAG-CCTAGC--AAG-A--C-C-GCG-----CACT-TA---
Saccharomyces_1   -----C--C---A---CC--GC---G-----C-A-G-----C---TA---
          *          *          *          *          *          *          **
Issactenckia      GGC-CTTT--GGC-CCC--CGGAATCCGGGGGCACCTTTTGT--TTC-TCT-TTAAAGGC
Pichia            AGCGCGAAAAGGCACCTTTTGA-T--GGG---AT-TTTTGGAAACCAACT-TTGAA--C
Saccharomyces     AGCGC----AGGC-CC--GGC-T--GG---AC-TCT-----CCATCTCTTGT---C
Saccharomyces_1   AGCGC----AGGC-----G-----GG-----CT-----CC-----
          ** *          ***          *          **          *          *

```

## Validazione su RealTime PCR dei primer specie specifici

La prima fase nella validazione dei primer è consistita nella determinazione della corretta temperatura di appaiamento; parametro essenziale nella reazione di PCR. Per tale motivo è stata valutata l'efficienza di amplificazione, dei primer specifici, per tutti i lieviti in PCR Real Time. In tali reazioni sono stati amplificati anche i DNA di altri ceppi di lievito per verificare l'effettiva specificità di reazione a tutte le temperature di appaiamento testate (fig.16).



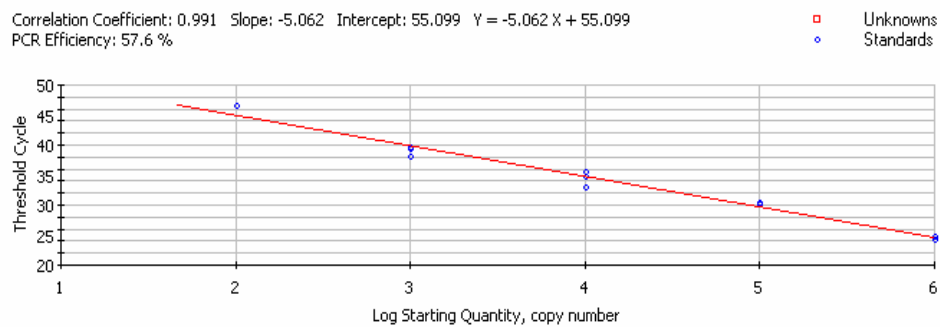
**Figura 16.** Cicli soglia a diverse temperature di appaiamento dei primer specifici per *S. cerevisiae* PCC918 (blu). In rosso e giallo sono rappresentati i risultati di amplificazione del DNA dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* rispettivamente il ceppo tipo CBS1171 e S2.

Come è possibile osservare in Figura 15 la temperatura di appaiamento che permette la maggiore efficienza di amplificazione del ceppo PCC918 è 52,6° C. Tuttavia a tale temperatura è possibile osservare l'amplificazione anche dei ceppi CBS1171 e S2. Questo risultato è compatibile con la minore specificità che si verifica diminuendo la temperatura di appaiamento dei primer. Si è quindi scelto di utilizzare, per le successive

analisi in Real Time PCR, la temperatura di appaiamento di 56° C in quanto consente di ottenere un'elevata efficienza e specificità di reazione.

### Curve standard

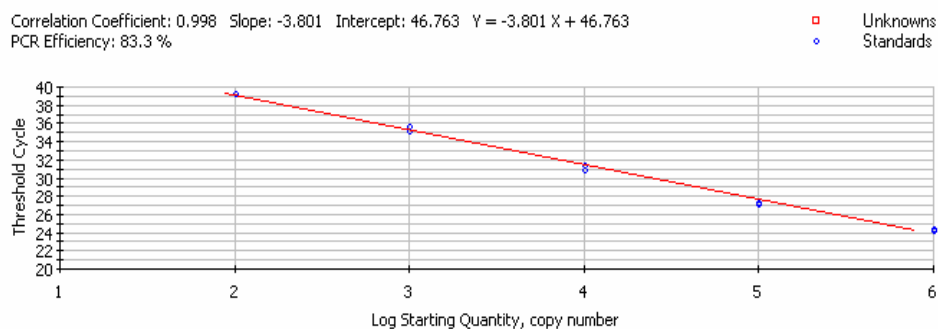
La quantificazione del DNA attraverso la metodica della Real Time PCR può essere sia relativa che assoluta. In quest'ultimo caso, attraverso la preparazione di una curva standard, è possibile determinare in maniera estremamente precisa il numero di ampliconi specifici presenti in un dato DNA totale (Bustin, 2000). Per questo motivo è stata realizzata una curva standard diluendo il DNA estratto da *S. cerevisiae* (Fig. 17).



**Figura 17.** Curva standard ottenuta con diluizioni seriali del DNA di *S.cerev.*

Dall'analisi della figura è possibile confermare l'efficacia dei primer progettati per *S. cerevisiae*. In particolare è evidente l'elevato valore (0,991) del coefficiente di correlazione  $r^2$ . Questo indice misura il grado di adattamento della regressione lineare ( $Y = - 5.062 X + 55.099$ ) con i dati misurati sperimentalmente. Considerato che il valore di  $r^2$  varia fra 0 (nessuna correlazione) e 1 (perfetta correlazione), i risultati ottenuti mostrano come l'applicazione della formula precedentemente descritta permetta di calcolare con elevata precisione la quantità di DNA di un campione non noto a partire dai Cicli soglia (Ct) ottenuti mediante

RealTime PCR. Per quanto riguarda la pendenza della curva (-5,062) i risultati indicano un basso livello nell'efficienza della reazione di PCR (55,6%). Teoricamente se ad ogni ciclo di PCR si avesse un raddoppio del quantitativo di DNA templato, la pendenza della curva sarebbe -3,32 ed un'efficienza del 100%. Generalmente un'ottima efficienza di reazione dà luogo ad una pendenza della curva compresa fra -3,58 e -3,10. I risultati ottenuti, quindi, mostrano come sia possibile sottostimare l'effettiva quantità di DNA presente in un campione non noto. Infine, è possibile osservare l'elevata sensibilità (o range dinamico) della reazione, che ci ha consentito di misurare quantità di DNA estremamente ridotte, variabili da circa 100 ng fino a 0,1 picogrammi. Per quanto riguarda *S. exiguus* (Fig. 18a) e *L. pentosus* (Fig. 18b), i risultati ottenuti, analogamente a quanto osservato con *S. cerevisiae*, mostrano un elevato coefficiente di correlazione (0,998) ed una elevata efficienza di reazione (83,3-95,7%).



**Figure -18a.** Curva standard ottenuta con diluizioni seriali del DNA di *S. exiguus*. **-18b.** Curva standard ottenuta con diluizioni seriali del DNA di *L. pentosus*.

## DISCUSSIONE

Le analisi RealTime PCR svolte sui primer progettati specificatamente su queste specie mostrano come l'approccio sperimentale seguito sia vincente. Infatti, i primer non danno origine ad amplificati se testati su tutti gli altri ceppi delle specie di lievito considerate nel lavoro. Fino ad ora, la Real-time-PCR è stata applicata per individuare rapidamente e sensibilmente, e spesso anche per quantificare, il gran numero di batteri e lieviti con gli alimenti. Al contrario, vi sono pochi lavori relativi a tali studi con lieviti, probabilmente perché per decenni i lieviti sono stati considerati innocui per la salute umana. Questo è il caso di *S. cerevisiae*, il lievito specie più comunemente usato nell'industria alimentare per la produzione di alimenti e bevande. Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei sistemi di Real time PCR per individuare e discriminare a livello di ceppo i *S. cerevisiae* inoculati e naturali presenti in fermentazioni vinarie (Ness et al., 1993; de Barros-Lopes, et al., 2006.; Lopez et al., 2002).

L'obiettivo del lavoro di Martorell et al.(2005) è stato quello di ottimizzare la tecnica molecolare per consentire una efficiente quantificazione del DNA iniziale dei microrganismi.

Nel nostro lavoro possiamo evidenziare che i coefficienti di correlazione indicano una buona correlazione tra la quantità di template (log input cell) e la quantità di prodotto (rappresentato dal ciclo soglia) nella curva standard effettuata con DNA dei singoli isolati in YPD. Le curve standard, realizzate, necessarie per la quantificazione assoluta dei campioni, indicano, infatti, un coefficiente di correlazione molto elevato in tutti i casi (>0,99) e che quindi le equazioni di regressione lineare descritte permettono di calcolare con elevata precisione la quantità di DNA di un campione non noto a partire dai Cicli soglia (Ct) ottenuti mediante RealTime PCR. Il principale difetto riscontrabile dalle analisi svolte può essere costituito dalla bassa efficienza di amplificazione dei primer testati. Questo indica che l'utilizzo di questi primer potrebbe portare a sottostimare l'effettiva concentrazione del DNA presente nei campioni iniziali. Per ovviare a questo limite è, quindi, necessario costruire delle curve standard a partire da campioni in pasta acida, quindi in condizioni



più aderenti alla realtà applicativa a cui questo lavoro è rivolto. Inoltre, per validare definitivamente la metodica proposta è necessario completare le analisi con il confronto dei risultati ottenuti mediante RealTime PCR e mediante metodiche classiche (conte su piastra).

## BIBLIOGRAFIA

- Abadias M, Teixidó N, Usall J, Vinas I & Magan N. 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. J Appl Microbiol. 89:1009–1017.
- Adams A, Gottschling D.E, Kaiser C.A, Stearns T. 1997. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA. 2007. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. FEMS Microbiol Rev. 31(3):327-41.
- Alexandre H, Plourde L, Charpentier C. and Francois J. 1998. Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 144:1103–1111.
- Alizadeh P, and Klionsky D.J. 1996. Purification and biochemical characterization of the *ATH1* gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 391:273–278.
- Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G and Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology. 30:5–9.
- Angioni G. 1994. “Il pane nella Trexenta”, da Pani tradizionali- Arte effimera in sardegna. EDES, Sassari.
- Arendt E.K, Ryan L.A.M. & Dal Bello F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology. 24:165–174.

- Attfield P.V. 1997 Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 15:1351-1357.
- Bakalinsky A.T, Snow R. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 6:367–382.
- Barber S, & Baguena R. 1989. Microflora de la masa madre panaria. XI. Evolucion de la microflora de masas madre durante el proceso de elaboracion por el sistema de 'refrescos' sucesivos y de sus correspondientes masa panarias. *Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos* 29:478–491.
- Barnett J.A, Payne R.W, and Yarrow D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, Boller T, Herweijer M, Schoppink P, Van der Zee P. and Wiemken, A. 1992. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* 209:951–959.
- Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A and Thevelein J.M. 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 273: 33311-33319.
- Benaroudj N, Lee D.H, and Goldberg A.L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.* 276:24261–24267.
- Berg J.M, Tymoczko J L. e Stryer L. 2003. *Biochimica*, Bologna, Zanichelli.

- Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F. and Torrioni S. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4116–4122.
- Blomberg A & Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol.* 33: 145–212.
- Bond U, Neal C, Donnelly D, James TC. 2004. Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. *Curr Genet.* 45(6):360-70.
- Bonini B.M, Van Dijck P, Thevelein J.M. 2003. Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta.* 1606(1-3):83-93.
- Bonjean B & Guillaume LD. 2003. Yeasts in bread and baking products. *Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects* (Boekhout T & Robert V, eds), 289–307. Behr's Verlag, Hamburg.
- Budroni M, Zara S, Zara G, Pirino G, Mannazzu I. 2005. Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Research.* 5:951-958.
- Capece A, Fiore C, Maraz A and Romano P. 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology.* 98:136–144.

- Capello R. 1998. Il manuale del panificatore. Editrice San Marco. Trescore Balneare Bergamo.
- Carrai B. 2001. Arte bianca, materie prime processi, processi e controlli. Calderini Ed agricole, Bologna.
- Carreto L, Eiriz MF, Gomes AC, Pereira PM, Schuller D, Santos MA. 2008. Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics*. 4;9:524.
- Chen HL, Su HP & Lin CW. 1998. Characterization of yeast cultures for a flavoring agent in a yoghurt-type product. *J Food Sci*. 63: 897–900.
- Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, Clementi F, Martini A. 2004. Contribution of winery-restent *Saccharomyces cerevisiae* to spontaneous grape must fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 85:159–164.
- Codon AC, Benitez T, Korhola M. 1998. Chromosomal polyphormism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49:154–163.
- Constanti M, Poblet M, Arola L, Mas A, Guillamon JM. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winches. *American Journal for Enology and Viticulture*. 48:339–344.
- Contoli L. 2001. Il fantasma della Biodiversità. *Società Italiana di Ecologia* 1: 12-13.
- Coppola S, Pepe O, Masi P, & Sepe M. 1996. Characterization of leavened doughs for pizza in Naples. *Advances in Food Science*. 18:160–162.

- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 64:95–104.
- Corsetti A, De Angelis M, Dellaglio F, Paparella A, Fox P.F, Settanni L, & Gobbetti, M. 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *Journal of Applied Microbiology*. 94:641–654.
- Cummings J.H. & Frolich W. 1993. Dietary fibre intakes in Europe: a survey conducted by members of the Management Committee of COST 92. *Metabolism and Physiological Aspects of Dietary Fibre in Food*.1–89. ECSP-EEC-EAEC, Brussels, Belgium.
- de Barros Lopes M, Soden A, Henschke P.A, Langridge P. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4514–4520.
- De Virgilio C, Burckert N, Bell W, Jenö P, Boller T. and Wiemken A. 1993. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* 212:315-323.
- De Vuyst L, & Neysen P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*. 16:43–56.

- De Vuyst L, & Ganzle M. 2005. Second international symposium on sourdough: from fundamentals to applications. Trends in Food Science and Technology. 16: 2–3.
- de Winde J.H. (ed.). 2003. Functional genetics of industrial yeasts. Springer Berlin, Germany.
- Deak T, and Beuchat L.R. 1996. Yeasts in specific types of foods. In T. Deak and L. R. Beuchat (ed.), Handbook of food spoilage yeast. CRC, Boca Raton, Fla 61–95.
- Dequin S. 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:577–588.
- Dequin S, Salmon J-M, Nguyen H-V & Blondin B. 2003. Wine yeasts. Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects (Boekhout T & Robert V, eds). 389–412. Behr's Verlag, Hamburg.
- Destruelle M, Holzer H, and Klionsky D.J. 1995. Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. Yeast. 11:1015–1025.
- Diamond J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature. 418:700–707.
- Donalies U.E.B, Nguyen H.T.T, Stahl U, Nevoigt E. 2008. Improvement of *Saccharomyces* Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 111: 67–98.
- Dudoit S, Fridlyand J. 2002. A prediction based resampling method for estimating the number of clusters in a data set. Genome Biology.



- Dufour JP, Verstrepen K & Derdelinckx G. 2003. Brewing yeasts. Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects (Boekhout T & Robert V, eds). 389–412. Behr's Verlag, Hamburg.
- Dunham MJ, Badrane H, Ferea T, Adams J, Brown PO, Rosenzweig F, Botstein D. 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(25):16144-9.
- Dunn B, Levine RP, Sherlock G. 2005. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. BMC Genomics. 6(1):53.
- Eleutherio E.C.A, de Araujo P.S, and Panek A.D. 1993. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 1156:263–266.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C. Uruburu F. & Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology. 49:329–337.
- Esteve-Zarzoso B, Gostincar A, Bobet R, Uruburu F, Querol A. 2000. Selection and molecular characterisation of wine yeasts isolated from the “El Penedes” area (Spain). Food Microbiol. 17: 553–562.
- Esteve-Zarzoso B, Fernandez-Espinar M.T, 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, Sanna M, Dore MC, Dettori M. 2005. Il pane a lievitazione naturale: un alimento da riscoprire. PANI. Tradizione e prospettive della panificazione in Sardegna. Ilisso Editore, Nuoro.
- Fay JC, Benavides JA. 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. Plos Genetics. 1:66–71.
- Fernandes P.M, Domitrovic T, Kao C.M, Kurtenbach E. 2004. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. FEBS Lett. 556(1-3):153-60.
- Fernandez-Espinar MT, Esteve-Zarzoso B, Querol A, 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 differentiation of flora yeasts. Antoine van Leeuwenhoek. 78:87–97.
- Fiechter A, Fuhrmann G.F, and Kappeli O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. Adv. Microb. Physiol. 22:123–183.
- Foschino R, Terraneo R, Mora D, & Galli A. 1999. Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. Italian Journal of Food Science. 11:19–28.
- François J.M, Blazquez M.A, Ariño J, Gancedo C. 1997. Yeast sugar metabolism. In: Zimmermann FK, Entian K-D (eds) Storage carbohydrates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Technomic, Lancaster Basel. 285–311.

- Frohlich-Wyder MT. 2003. Yeasts in dairy products. *Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects* (Boekhout T. & Robert V, eds). 209–237. Behr's Verlag, Hamburg.
- Gadd G.M, Chalmers K, and Reed R.H. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 48:249-254.
- Gancedo C, Flores C.L. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 4(4-5):351-9.
- Gasch AP, Huang M, Metzner S, Botstein D, Elledge SJ, et al. 2001. Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell.* 12: 2987–3003.
- Gelinas P, Fiset G, LeDuy A, and Goulet J. 1989. Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of baker's yeast in frozen dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:453-2459.
- Gobbetti M, Corsetti A, & Rossi J. 1994a. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 10:275–279.
- Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J, La Rosa F, & De Vincenzi S. 1994. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. *Italian Journal of Food Science.* 6:85–94.
- Gobbetti M, Corsetti A & Rossi J. 1995. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in sourdough using a rheofermentometer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 11:625–630.

- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler J.M, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano M.B, Labarre J. 1998. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 273(35):22480-22489.
- Goffeau A, Barrell B. G, Bussey H, Davis R. W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J.D, Jacq C, Johnston M, Louis E.J, Mewes H. W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, and Oliver S.G. 1996. Life with 6000 genes. Science. 274:546, 563–567.
- Gonzalez A, Hierro N, Poblet M, Mas A & Guillamón J.M. 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested-PCR. FEMS Microbiol. Lett. 254: 123–128.
- Granchi L, Bosco M, Vicentini M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol. 87: 949–956.
- Gross C, Watson K. 1996. Heat shock protein synthesis and trehalose accumulation are not required for induced thermotolerance in depressed *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun. 220(3):766-72.
- Guijo S, Mauricio J.C, Salmon J.M, Ortega J.M. 1997. Determination of the ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and flor film ageing of dry sherry-type wine. Yeast. 13:101–117.
- Guillamon J.M, Sabate J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol. 169:387-392.

- Gullo M, Romano A.D, Pulvirenti A, & Giudici P. 2003. *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *International Journal of Food Microbiology*. 80:55–59.
- Gutiérrez AR, Santamaria P, Epifano S, Garijo P, Lopez R. 1999. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during consecutive years. *Letters in Applied Microbiology*. 29:411–415.
- Haarman M, & Knol J. 2005. Quantitative Real-Time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2318–2324.
- Hammes W.P, & Ganzle M.G. 1998. Sourdough breads and related products. In B. J. B. Woods, *Microbiology of Fermented Foods*. London: Blackie Academic/Professional 1:199-216.
- Han E.K, Cotty F, Sottas C, Jiang H, and Michels,C.A. 1995. Characterization of *AGT1* encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* 17:1093–1107.
- Hansen EC. 1904. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VIII. Sur la germination des spores chez les *Saccharomyces*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*. 3: 44–66.
- Hansen A, Schieberle 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 20:1-10.
- Harris S.D, and Cotter D.A. 1988. Transport of yeast vacuolar trehalase to the vacuole. *Can. J. Microbiol.* 34:835-838.

- Hazell B.W, Nevalainen H, Attfield PV. 1995. Evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* CIF1 (GGS1/TPS1) gene modulates heat shock response positively. FEBS Lett. 377(3):457-60.
- Hein I, Lehner A, Rieck P, Klein K, Brandl E, & Wagner M. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3122–3126
- Herdeiro R.S, Pereira M.D, Panek A.D, Eleutherio E.C. 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. Biochim Biophys Acta. 1760(3):340-6.
- Hierro N, González A, Mas A, and Guillamón J.M. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. Journal of Applied Microbiology. 97:792-801.
- Hino A, Mihara K, Nakashima K, and Takano H. 1990. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 56:1386-1391.
- Hughes TR, Roberts CJ, Dai H, Jones AR, Meyer MR, et al. 2000. Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. Nat Genet. 25: 333–337.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM, Young ET. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. Genetics.165(4):1745-59.

- James TC, Usher J, Campbell S, Bond U. 2008. Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr Genet.* 53(3):139-52.
- Jenson I. 1998. Bread and baker's yeast. In : *Microbiology of Fermented Foods*". Wood, B. J. B. (ed.) 172. Blackie Academic and professional, London.
- Jiang H, Medintz I, Zhang B, and Michels C.A. 2000. Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* 182:647–654.
- Jules M. Guillou V, François J, Parrou J.L. 2004. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5):2771–2778.
- Jules M, Beltran G, François J, and Parrou J.L. 2008. New Insights into Trehalose Metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* Encodes a Functional Cytosolic Trehalase, and Deletion of *TPS1* Reveals Ath1p-Dependent Trehalose Mobilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 605–614.
- Kandror O, Bretschneider N, Kreydin E, Cavalieri D, Goldberg A.L. 2004. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell.* 13(6):771-81.
- Kao K.C and Sherlock G. 2008. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet.*

- Kariluoto S, Vahteristo L, Salovaara H, Katina K, Liukkonen K.-H, & Piironen V. 2004. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chem.* 81: 134–139.
- Keller F, Schellenberg M, and Wiemken A.. 1982. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* 131:298–301.
- Kim J, Alizadeh P, Harding T, Hefner-Gravink A, Klionsky D.J. 1996. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl Environ Microbiol.* 62(5):1563-9.
- Kono I and Himeno K. 1997. A novel killer yeast effective on *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 563–564.
- Kopp M, Muller H, and Holzer H. 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268:4766–4774.
- Kurtzman and Fell. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds). 273–352. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman C.P and Robnett C.J. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3:417-432.
- Kvitek DJ, Will JL, Gasch AP. 2008. Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. *PLoS Genet.* 4(10):e1000223.



- Landry C.R, Townsend J.P, Hartl D.L, Cavalieri D. 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology*. 15:575–591.
- Le Jeune C, Erny C, Demuyter C, Lollier M. 2006. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*. 23:709–716.
- Lee D.H, Goldberg A.L. 1998. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 18(1):30-8.
- Legras J, Merdinoglu D, Cornuet J.M, and Karst F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversità reflects human history. *Molecular Ecology*. 16:2091–2102.
- Liukkonen K.H, Katina K, Wilhelmson A, Myllymaki O, Lampi A.M, Kariluoto S, Piironen V, Heinonen S.M, Nurmi T, Adlercreutz H, Peltoketo A, Pihlava J.M, Hietaniemi V, Poutanen K. 2003. "Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye." *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 117–122.
- Londesborough J and Varimo K. 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J*. 219:511-518.
- López V, Querol A, Ramón D, Fernández-Espinar M.T. 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeast. *Int. J. Food Microbiol*. 68: 75-81.

- Lopez V, Fernandez-Espinar M.T, Barrio E, Ramon D and Querol A. 2002. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 81:63–71.
- Loureiro V and Malfeito-Ferreira M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol. Rev.* 86:23–50.
- Loureiro V, and Querol A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Technol.* 10:356–365.
- Lucero P, Penalver E, Moreno E, Lagunas R. 2000. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 66(10):4456-61.
- MacArthur R.H, MacArthur J.W. 1961. On bird species diversity. *Ecology* 42:594-598.
- MacKenzie DA, Defernez M, Dunn WB, Brown M, Fuller LJ, de Herrera SR, Günther A, James SA, Eagles J, Philo M, Goodacre R, Roberts IN. 2008. Relatedness of medically important strains of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by phylogenetics and metabolomics. *Yeast.* 25(7):501-12.
- Mannazzu I, Budroni M. 2005. Identificazione e caratterizzazione molecolare dei lieviti vinari in *Microbiologia del vino*. 393-412. Casa Ambrosiana Editore, Lombardia.
- Mansure J J, Panek A.D, Crowe L.M, Crowe J.H. 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1191(2):309-16.

- Marinangeli P, Angelozzi D, Ciani M, Clementi F, Mannazzu I. 2004. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strains characterisation. *FEMS Yeast Res.* 4:427-435.
- Martini A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research.* 4:165–176.
- Martorell P, Querol A and Fernandez-Espinar M.T. 2005. Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. *Applied and environmental microbiology.* 71(11):6823–6830.
- Masneuf I, Aigle M and Duboirdeu D. 1996. Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiology Letters.* 138:239-244.
- Masoud W, Cesar LB, Jespersen L & Jakobsen M. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast.* 21: 549–556.
- Mensonides F.I, Brul S, Klis F.M, Hellingwerf K.J, Teixeira de Mattos MJ. 2005. Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol.* 71(8):4531-8.
- Mittenbuhler K and Holzer H. 1988. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J. Biol. Chem.* 263: 8537-8543.

- Mortimer R, Polsinelli M. 1999. On the origin of wine yeast. *Research in Microbiology*. 150:199–204.
- Motshwene P, Karreman R, Kgari G, Brandt W, Lindsey G. 2004. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 377(Pt 3):769-74.
- Ness F, Lavallee F, Dubourdieu D, Aigle M and Dulau L. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric*. 62:89-94.
- Neves M.J, and Francois J. 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J*. 288:859–864.
- Nwaka S, Kopp M, Burgert M, Deuchler I, Kienle I, Holzer H. 1994. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Lett*. 349(1):161-2.
- Nwaka S, Mechler B and Holzer H. 1995. Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett*. 386:235–238.
- Nwaka S, Kopp M and Holzer H. 1995a. Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 270:10193–10198.
- Nwaka S, Mechler B, Destruelle M and Holzer H. 1995b. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 360: 286–290.

- Nwaka S and Holzer H. 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 58:197–237.
- Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, Komori M, Inoue Y, Sakurai M. 2003. NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose, J. Am. Chem. Soc. 125:12739–12748.
- Ostergaard S L, Olsson and Nielsen J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:34–50.
- Ottogalli G, Galli A, & Foschino R. 1996. Italian bakery products obtained with sourdough: characterization of the typical microflora. Advances in Food Science. 18:131–144.
- Paramithiotis S, Gioulatos S, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G. 2007. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. Proc Biochem. 41:2429–2433.
- Parrou J.L, Teste M.A and François J. 1997. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. Microbiology. 143:1891–1900.
- Petit T, François J. 1994. Accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* growing on maltose is dependent on the TPS1 gene encoding the UDPglucose-linked trehalose synthase. FEBS Lett. 355(3):309-13.

- Phister T.G & Mills D.A. 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Environ Microbiol*. 69:7430–7434.
- Pinzani P, Bonciani L, Pazzagli M, Orlando C, Guerrini S. & Granchi L. 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett Appl Microbiol* 38:18–124.
- Piper P.W, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M. 1997. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones*. 2:12–24.
- Plourde-Owobi L, Durner S, Parrou J.L, Wieczorke R, Goma G and François J. 1999. *AGT1*, encoding an alpha-glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 181:3830–3832.
- Pope GA, MacKenzie DA, Defernez M, Aroso MA, Fuller LJ, Mellon FA, Dunn WB, Brown M, Goodacre R, Kell DB, Marvin ME, Louis EJ, Roberts IN. 2007. Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts. *Yeast*. 24(8):667-79.
- Pretorius I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16:675–729.
- Prieto. 2003. Baker's yeast: challenges and future prospects, p. 58–97. *In* J. H. de Winde (ed.), *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer, Germany.
- Pryce T.M, Kay I.D, Palladino S and Heath C.H. 2003. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida*

*albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47:487–496.

Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, De Vero L, Giudici P. 2004. Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett Appl Microbiol.* 38(2):113-7.

Quain D.E. 1988. Studies on yeast physiology impact on fermentation performance and product quality. *J. Inst. Brew.* 95:315-323.

Querol A, Barrio E, Ramón D. 1992b. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.

Quesada, M. P. and Cenis, J. L. 1995. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the Characterization of Wine Yeasts *Am. J. Enol. Vitic.* 46:204-208.

Randall K.S, Gyllensten U.B, Erlich H.A. 1998. The polymerase chain reaction. In: *Genome Analysis: A practical Approach.* K. E. Davies. 141-152 IRL Press, Oxford.

Rojas V, Gil JV, Pinaga F & Manzanares P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microbiol.* 86: 181–188.

Ruis H, and Schuller C. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessay* 17:959–965.

Scannell DR, Butler G, Wolfe KH. 2007. Yeast genome evolution--the origin of the species. *Yeast.* 24(11):929-42. Review.

- Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian K.D, Thomas D.Y. 2004. Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell*.15(12):5492-502.
- Sharma S.C. 1997. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*.152(1):11-5.
- Shima J, Hino A, Yamada-Iyo C, Suzuki Y, Nakajima R, Watanabe H, Mori K and Takano H. 1999. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol*. 65, 2841-2846.
- Simola M, Hanninen A.L, Stranius S.M. and Makarow M. 2000. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Mol. Microbiol*. 37:42–53.
- Singer M.A. and Lindquist S. 1998a. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol. Cell*. 1:639–648.
- Singer M.A, Lindquist S. 1998b. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose, *Trends Biotechnol*. 16:460–468.
- Spicher G. 1983. 'Baked Goods' in *Biotechnology*, Vol. 5 (Rehm, H.J. and Reed, G. eds). 1–80, Weinheim, Verlag.
- Stambuk B.U, de Araujo P.S, Panek A.D and Serrano R. 1996. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 237:876–881.



- Stambuk B.U, Panek A.D, Crowe J.H, Crowe L.M and de Araujo P.S. 1998. Expression of high-affinity trehalose-H  $\alpha$  symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 379:118–128.
- Stambuk B.U, da Silva M.A, Panek A. D. and de Araujo P.S. 1999. Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:105–110.
- Stambuk B.U. and de Araujo P.S. 2001. Kinetics of active  $\alpha$  -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 1:73–78.
- Stolz P, & Bocker G. 1999. Technology, properties and applications of sourdough products. *Advances in Food Science.* 18:234–236.
- Succi M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E. & Coppola, R. 2003. Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiology Letters* 225:143–148.
- Sujaya I.N, Antara N.S, Sone T, Tamura Y, Aryanta W.R, Yokota A, Asano K & Tomita F. 2004. Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. *World J. Microb. Biotechnol.* 20: 143–150.
- Thevelein JM & Hohmann S. 1995. Trehalose synthase – guard to the gate of glycolysis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 20: 3–10.
- Thevelein J.M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev.* 48:42–59.
- Tokuoka K, Ishitani T & Chung WC. 1992. Accumulation of polyols and sugars in some sugar-tolerant yeasts. *J Gen Appl Microbiol.* 38: 35–46.

- Torriani S, Zapparoli G and Dellaglio F. 1999. Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 65(10):4351-6.
- Van Dijck P, Colavizza D, Smet P and Thevelein J.M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:109-115.
- Van Eck J.H, Prior B.A & Brandt E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J Gen Microbiol.* 139:1047–1054.
- Verduyn C, Zomerdijk T.P.L, Van Dijken J.P and Scheffers W.A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspension with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:181–185.
- Vicidomini N. 2005. A new procedure to avoid “stringy bread”. *MOLINI d’Italia.*
- Villa-Carvajal M, Querol A, Belloch C. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90:171–181.
- Viner R.I and Clegg J.S. 2001. Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein. *Cell Stress Chaperones.* 6:126–135.

- Vogel R.F, Knorr R, Muller M.R.A, Steudel U, Ganzle M.G & Ehrmann M.A. 1999. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76:403–411.
- Voit E. 2003. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *J Theor Biol*. 223(1):55-78.
- Von Stokar W. 1956. Der Ursprung unseres hausbrotes. *Brot und Gebäck*. 10:11–16.
- Vuorio O.E, Kalkkinen N and Londesborough J. 1993. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 216:849–861.
- Währen M. 1985. Die entwicklungsstationen vom korn zum brot in 5. und 4. jahrtausend. Neueste untersuchungsergebnisse von ausgrabungsfunden. *Getreide Mehl und Brot*. 39:373–379.
- Walker G.M, Mcleod A.H & Hodgson V.J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 127:213–222.
- Wickerham L.J & Burton K.A 1954. A simple technique for obtaining mating types in heterothallic diploid yeasts, with special references to their uses in the genus *Hansenula*. *J. Bacteriol*. 67: 303–308.
- Wiemken A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*. 58:209-217.

- Williams J.G.K, Kubelik A.R, Livak K.J, Rafalski J.A and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531–6535.
- Wilson W. A, Wang Z and Roach P.J. 2002. Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Mol. Cell. Proteomics*. 1:232–242.
- Winzeler EA, Castillo-Davis CI, Oshiro G, Liang D, Richards DR, Zhou Y, Hartl DL. 2003. Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics*. 163(1):79-89.
- Yap N.A, deBarros Lopes M, Langridge P & Henschke P.A. 2000. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J Appl Microbiol*. 89: 381–389.
- Zähringer H, Thevelein J.M, Nwaka S. 2000. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Mol Microbiol*. 35:397–406.
- Zambonelli C, Tini V, Giudici P, Grazia L. 2001. "Microbiologia degli alimenti fermentati." Calderini edagricole, Bologna.
- Zeyl C. 2006. Experimental evolution with yeast. *FEMS Yeast Res*. 6 (5): 685–691.

<b>PREMESSA</b> .....	5
<b>CAPITOLO I</b> .....	7
<b>Peculiarità genetiche e metaboliche di <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
<b>isolato da paste acide artigianali</b> .....	7
<b>Il pane in Sardegna</b> .....	8
<b>Ruolo dei lieviti</b> .....	10
<b>Biodiversità e lieviti panari</b> .....	11
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	12
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	29
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	31
<b>Ceppi e condizioni colturali</b> .....	32
<b>Identificazione</b> .....	33
<i>Estrazione DNA</i> .....	33
<i>Amplificazione delle ITS</i> .....	34
<i>Analisi di restrizione</i> .....	34
<b>Caratterizzazione molecolare</b> .....	35
<b>Analisi statistica</b> .....	38
<b>Assimilazione fonti carboniose (Kurtzman and Feel, 1998)</b> .....	38
<b>Amplificazione dei geni coinvolti nelle pathway del trealosio</b> .....	39
<b>Analisi di restrizione</b> .....	40
<b>Sequenziamento dei geni <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i></b> .....	41
<b>RISULTATI</b> .....	42
<b>L'amplificazione dei minisatelliti <i>SED1</i> e <i>DAN4</i> rivela la diversa</b>	
<b>architettura genetica di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> panario</b> .....	43

L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza .	49
L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari ....	54
L'analisi delle sequenze di <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i> rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati.....	58
<b>DISCUSSIONE</b> .....	65
L'analisi cluster raggruppa i ceppi in funzione della provenienza .	67
L'assimilazione del trealosio è una peculiarità dei ceppi panari ....	69
L'analisi delle sequenze di <i>AGT1/MAL11</i> e <i>ATH1</i> rivela mutazioni puntiformi nei ceppi analizzati.....	70
<b>CAPITOLO II</b> .....	72
<b>Messa a punto di un metodo molecolare mediante RealTime PCR per la quantificazione delle specie microbiche presenti nelle paste acide</b> .....	72
<b>Il lievito naturale e il lievito compresso</b> .....	73
<b>La microflora delle paste acide e la loro classificazione</b> .....	75
<b>Stabilità delle paste acide e monitoraggio dei microrganismi</b> ....	77
Metodiche basate sulla RealTime-PCR .....	79
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	82
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	84
<b>Ceppi e condizioni colturali</b> .....	85
<b>Identificazione</b> .....	85
<b>Analisi delle sequenze e progettazione di primer specie specifici</b>	86
<b>Validazione dei primer specie-specifici mediante real-time PCR. ...</b>	86
<b>RISULTATI</b> .....	88

<b>Metodo rapido di identificazione degli isolati .....</b>	<b>89</b>
<b>Costruzione di primer specie-specifici .....</b>	<b>89</b>
<b>Validazione su RealTime PCR dei primer specie specifici .....</b>	<b>92</b>
<b>Curve standard .....</b>	<b>93</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>98</b>