



# VERSO LA “PROGETTAZIONE PERSONALIZZATA” DEI LIEVITI STARTER PER I PROCESSI FERMENTATIVI IN ENOLOGIA

Le innovazioni biotecnologiche permettono oggi una modellazione degli starters sulla base delle esigenze dettate dall'impiego di specifiche tipologie di mosti. Le strategie di evoluzione adattativa applicate a *Saccharomyces cerevisiae*, sono risultate valide per l'ottenimento di lieviti con performance ottimizzate anche in condizioni fortemente stressanti.



Di  
**Francesco Mezzetti**  
**Luciana De Vero**  
**Lisa Solieri**  
**Paolo Giudici**  
**Tommaso Bonciani**

Dipartimento di Scienze della Vita,  
 Università degli Studi di Modena e Reggio  
 Emilia - Reggio Emilia

(Da sinistra nella foto)

## INTRODUZIONE

■ La selezione di starter enologici progettati per la realizzazione di specifiche tipologie di vino è una conseguenza delle disponibilità di nuove tecnologie ed è, allo stesso tempo, prerequisito per incrementare la complessità e la qualità sensoriale dei vini. Tre fattori

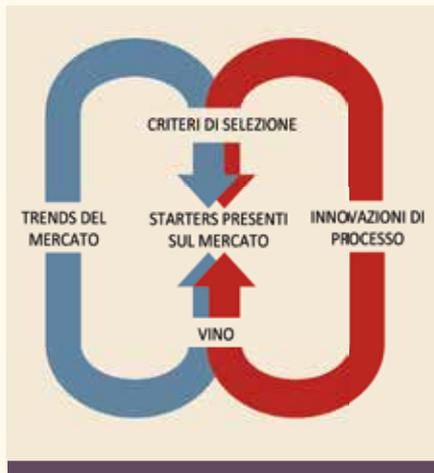
concorrono reciprocamente in questo processo di innovazione: i trends del mercato, l'innovazione di processo e la diffusione di strumenti biotecnologici atti alla selezione di nuovi starter enologici. I consumatori orientano il mercato spostando le loro preferenze verso vini di alta qualità e sensorialmente differenziati; l'innovazione tecnologica consente il controllo e la "modulazione"

dei parametri di processo, abbassando i costi di produzione e rendendo disponibili vini differenziati in termini di qualità e complessità sensoriale per ogni fascia di prezzo; nuovi strumenti biotecnologici ad alto rendimento consentono di accelerare il processo di costituzione e selezione genetica di starter con definite caratteristiche tecnologiche e sensoriali (**Fig. 1**).



DOCUMENTO TECNICO

**Fig. 1 -** Rappresentazione grafica dei fattori che concorrono alla realizzazione di nuovi starter enologici



**IL MIGLIORAMENTO GENETICO E I FENOTIPI DESIDERATI**

■ *Saccharomyces cerevisiae* è il principale biocatalizzatore del processo fermentativo in enologia e rappresenta il fattore che maggiormente ne influenza il successo e la riproducibilità. Oltre alla funzione di catalizzare un'efficiente, completa e rapida conversione degli zuccheri in alcool senza lo sviluppo di aromi sgradevoli, gli starter enologici devono possedere un set complesso di caratteri di qualità che contribuiscono ad aumentare il valore aggiunto del prodotto finale e a definirne un suo profilo sensoriale caratteristico e facilmente riconoscibile sul mercato. Questo complesso set di criteri di selezione è stato inizialmente definito da Giudici e Zambonelli nel 1992, poi ripreso e aggiornato da numerosi autori (Head, 1999; Rainieri & Pretorius, 2000; Giudici *et al.*, 2006). La maggior parte dei caratteri, fra i quali anche quelli prettamente tecnologici come il vigore fermentativo, la resa e la tolleranza all'etanolo o la temperatura di crescita, variano in maniera quantitativa nella popolazione e dipendono da più loci (Quantitative Trait Loci o QTL) distribuiti nel genoma e ciascuno dei quali responsabile di un piccolo contributo al fenotipo finale (Pretorius, 2000). Per caratteri regolati da QTL, le variabili genetiche e le loro interazioni sono così complesse e numerose che la costituzione di ceppi

geneticamente migliorati è praticabile solo attraverso approcci stocastico-combinatoriali, capaci di agire a livello dell'intero genoma (Giudici *et al.*, 2005). Tali steps di randomizzazione del genotipo sono seguiti da screening fenotipici atti alla selezione dei microrganismi più performanti a livello tecnologico.

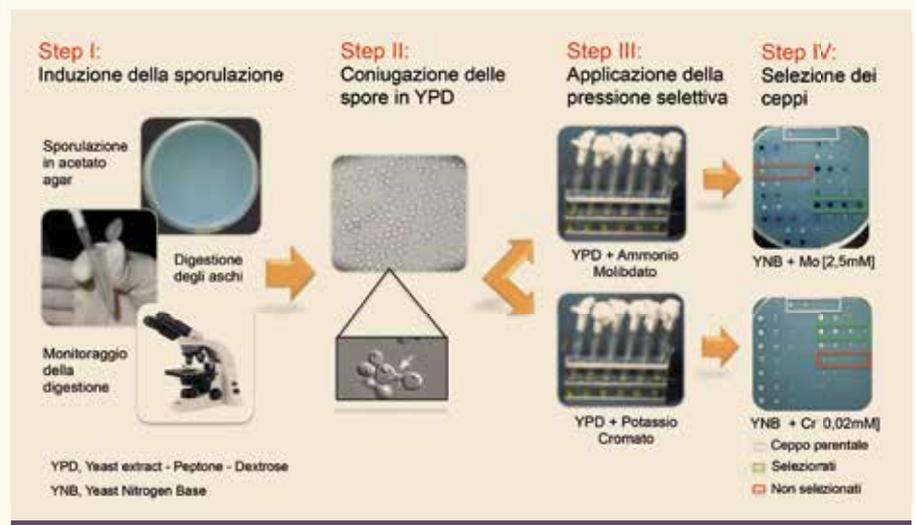
■ Fra gli approcci stocastico-combinatoriali, le strategie di evoluzione adattativa si prestano al miglioramento di fenotipi quantitativi sensibili alla pressione selettiva esercitata dal mezzo e dalle condizioni di crescita. Mentre la resistenza alla SO<sub>2</sub>, l'alcol tolleranza o l'osmotolleranza sono tratti quantitativi direttamente selezionabili, altre caratteristiche, come la produzione di composti sensorialmente attivi, non rappresentano fenotipi direttamente selezionabili su cui sia possibile operare approcci diretti di evoluzione adattativa. Tuttavia, il problema può essere aggirato individuando nella via biosintetica del metabolita di interesse, uno o più step in cui applicare la pressione selettiva in modo da selezionare i ceppi evoluti potenzialmente in grado di esprimere il fenotipo desiderato (De Vero *et al.*, 2013). Recentemente ceppi di lievito basso produttori di solfiti e solfuri e ceppi alto produttori di glutazione (GSH) sono stati selezionati mediante evoluzione adattativa applicando come pressione selettiva alte concentrazioni di cromato e molibdato, tossici per le cellule nella forma ionica esavalente (De Vero *et al.* 2011; Mezzetti *et al.*, 2014). Tale strategia si basa sulla formazione casuale di ricombinanti attraverso

l'induzione della meiosi e dell'accoppiamento e sulla successiva individuazione dei ricombinanti resistenti a cromato e molibdato. Questi metalli, strutturalmente analoghi del solfato, possono attraversare la cellula utilizzandone le stesse permeasi di membrana e stimolando la produzione di GSH che, tra i suoi molteplici ruoli, ha anche quello di intervenire nei processi di detossificazione della cellula. Ne deriva che la resistenza al cromato e al molibdato consente di selezionare ricombinanti con un metabolismo alterato relativamente alla via di assimilazione dei solfati e della biosintesi del GSH (Fig. 2).

**L'INTERAZIONE LIEVITO-AMBIENTE GUIDA LA SELEZIONE**

■ La "personalizzazione" del ceppo di lievito va intesa come la progettazione di ceppi in grado di valorizzare le specifiche potenzialità dei singoli mosti di partenza, superando eventuali deficit nutrizionali che gli stessi possono presentare. L'interazione tra ceppo di lievito e mosto è un processo complesso e di difficile predizione a causa dell'estrema variabilità compositiva dei mosti che dipende sia dalle condizioni climatico-ambientali che dalle operazioni tecnologiche effettuate in cantina (Manea, 2013). Conseguentemente, un ceppo di lievito idoneo a fermentare un mosto fresco può essere completamente inadeguato

**Fig. 2 -** Rappresentazione schematica della strategia di evoluzione adattativa





## DOCUMENTO TECNICO

per la fermentazione dello stesso mosto, prima mutizzato e poi desolforato. Bassi livelli di azoto prontamente assimilabile sono il principale fattore responsabile degli arresti fermentativi (Bisson, 1999). A partire dai primi lavori di Agenbach del 1977, sono stati progressivamente messe in rilievo le ripercussioni delle carenze delle fonti azotate sugli aspetti fisiologici dello sviluppo di *S. cerevisiae* (Sablayrolles *et al.*, 1996; Bezenger & Navarro, 1987; Bell & Henschke, 2005), sulle proprietà sensoriali dei prodotti finali (Ough & Lee, 1981; Rapp & Versini, 1991) e sulla produzione di idrogeno solforato (Giudici & Kunke, 1994; Jiranek *et al.*, 1995; Spiropoulos *et al.*, 2000).

■ A fronte della consistente letteratura sull'influenza della quantità e del tipo di fonte azotata nei processi fermentativi, non corrisponde un pari ed approfondito studio su altre esigenze nutrizionali dei lieviti. In condizioni di aerobiosi e in mezzi non selettivi questi microorganismi presentano limitate esigenze nutrizionali, circoscritte ad una fonte di carbonio e di azoto assimilabile, alcune vitamine e fattori di crescita (biotina, acido pantotenico, acido folico, niacina, inositolo, p-Amino benzoico, piridossina, riboflavina, tiamina) e microelementi (boro, iodio, ferro, rame, manganese, molibdeno, zinco, fosforo, magnesio, calcio). Lo stato di ossidazione di quest'ultimi ne determina la biodisponibilità e conseguentemente la funzionalità nell'ottica del metabolismo microbico.

■ Nelle fermentazioni vinarie, caratterizzate da condizioni anaerobiche e fortemente limitanti, *S. cerevisiae* presenta maggiori esigenze nutrizionali. I trattamenti tecnologici dei mosti possono alterare significativamente lo stato di ossidoriduzione dei microelementi e dei fattori di crescita, riducendone la biodisponibilità e determinando possibili blocchi della fermentazione. Un altro parametro importante è il rapporto tra steroli e acidi grassi (alternativamente di loro precursori), in quanto l'assenza di ossigeno molecolare non consente la ciclizzazione dello squalene. Nei mezzi di laboratorio l'aggiunta di Tween 80 o altre fonti di acidi grassi, di preparati a composizione nota di vitamine e fattori di crescita, o più genericamente di estratto di lievito, consente di sopperire a queste esigenze nutrizionali. In campo enologico, il problema nutrizionale è stato affrontato empiricamente attraverso l'adozione di prodotti a composizione inde-

finita commercializzati come "attivanti della fermentazione" che forniscono una base di azoto prontamente assimilabile (APA), una componente di derivazione organica (lisati cellulari, scorze di lievito od altro), più o meno addizionati indirettamente di vitamine, steroli, sali minerali, e materiale inerte con funzione dispersiva ed antiflocculante.

## LE PRATICHE TECNOLOGICHE ACUISCONO LE ESIGENZE NUTRIZIONALI

■ La meccanizzazione della raccolta delle uve ha ampliato significativamente l'impiego della solfitazione (1800-2000 ppm) come tecnica per la conservazione dei mosti, consentendo la dilazione nel tempo dei processi di vinificazione (Giudici *et al.*, 2014). La tecnica della mutizzazione trova impiego in numerosi processi produttivi, ed al momento è esclusa solo per i vini a denominazione protetta che ne fanno esplicito divieto nei rispettivi disciplinari di produzione. Il vantaggio più consistente è legato ad una complessiva riduzione dei costi di produzione derivata da un minor

investimento in autoclavi termo-condizionate e dalla distribuzione del lavoro in un arco temporale maggiore. A tali vantaggi prettamente tecnologici fanno da contraltare gli effetti dell'anidride solforosa sui composti biologicamente attivi del mosto e, di conseguenza, sull'interazione lievito/mosto. La conservazione dei mosti per lunghi periodi mediante aggiunta di solfiti non è solo responsabile della degradazione di composti biologicamente attivi e di alcune vitamine come la tiamina (Leichter & Joslyn, 1969), ma anche dell'aumento consistente dei solfati nei mosti desolforati corrispondenti, a causa della ossidazione a solfati dei solfiti in presenza di ossigeno molecolare o di altri accettori di elettroni come i chinoni e le catechine (Makhotkina & Kilmartin, 2009).

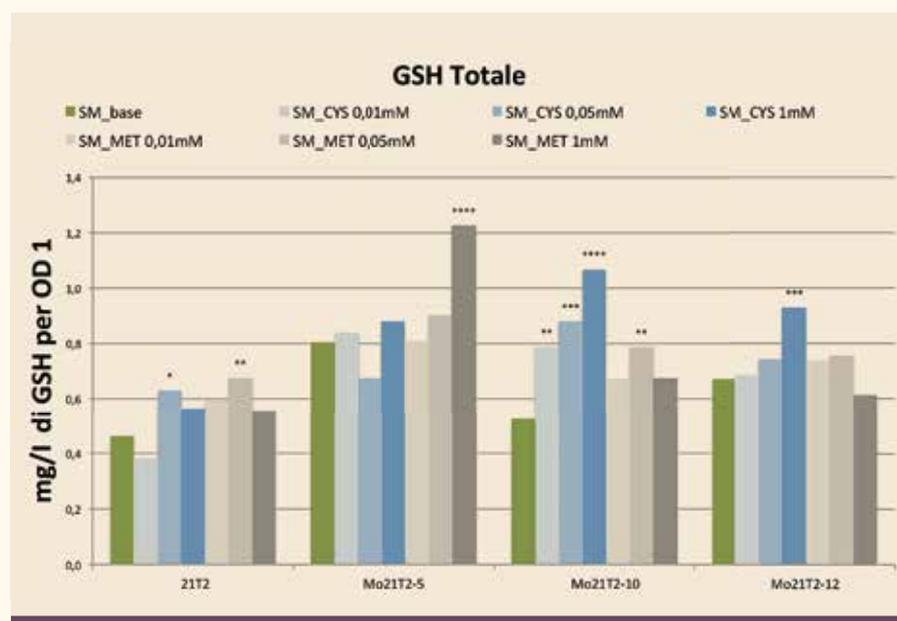
## COME FERMENTARE IL MOSTO DESOLFORATO

■ Gli alti livelli di solfati e la generale povertà in molecole biologicamente attive e fattori di crescita rendono i mosti desolforati un ambiente estremamente sfavorevole per la crescita dei lieviti. La costituzione di ceppi idonei

**Fig. 3 -** Glutazione totale prodotto dopo 7 giorni di fermentazione in simil-mosto (SM) base e SM arricchito con diverse concentrazioni di cisteina e metionina.

\* Livello di significatività determinato con il Dunnett test < del 5%, \*\* < 1%, \*\*\* < 0,1%, \*\*\*\* < 0,01%.

Per ogni ceppo il terreno di riferimento è il rispettivo SM\_base





DOCUMENTO TECNICO

alla fermentazione di tali mosti rappresenta pertanto una nuova sfida per l'industria biotecnologica. Il primo carattere necessario, per dei potenziali ceppi personalizzati per questo tipo di mosti, è quello di non avere esigenze nutrizionali marcate anche in condizioni stressanti, mantenendo allo stesso tempo elevate performance fermentative. Il secondo carattere è legato al metabolismo degli aminoacidi solforati, perché l'alto valore dei solfati e le deficienze nutrizionali aumentano la produzione di composti solforati indesiderati (Eschenbruch, 1974).

■ Sulla base di questi due tratti desiderati sono stati condotti test con l'obiettivo di individuare i ceppi più efficienti in possesso di potenziali tratti tecnologici esprimibili in condizioni limitanti. In primo luogo, ceppi evoluti

ottenuti con la strategia di evoluzione adattativa sono stati testati per la produzione di solfuri e di glutazione, rispettivamente utilizzati come indicatore negativo e positivo dei prodotti legati al metabolismo degli aminoacidi solforati. Successivamente, i ceppi evoluti sono stati ulteriormente ottimizzati tramite la creazione di derivati meiotici o ibridandoli con ceppi commerciali ed è stato valutato se la buona performance fermentativa e la produzione di GSH venivano mantenuti in condizioni di forte stress.

■ A partire dal ceppo parentale 21T2, che possedeva un buon vigore fermentativo nella fermentazione dei mosti, sono stati ottenuti per evoluzione adattativa tre ceppi (rispettivamente Mo21T2-5, -10, -12) che sono stati testati per la produzione di solfuri e di

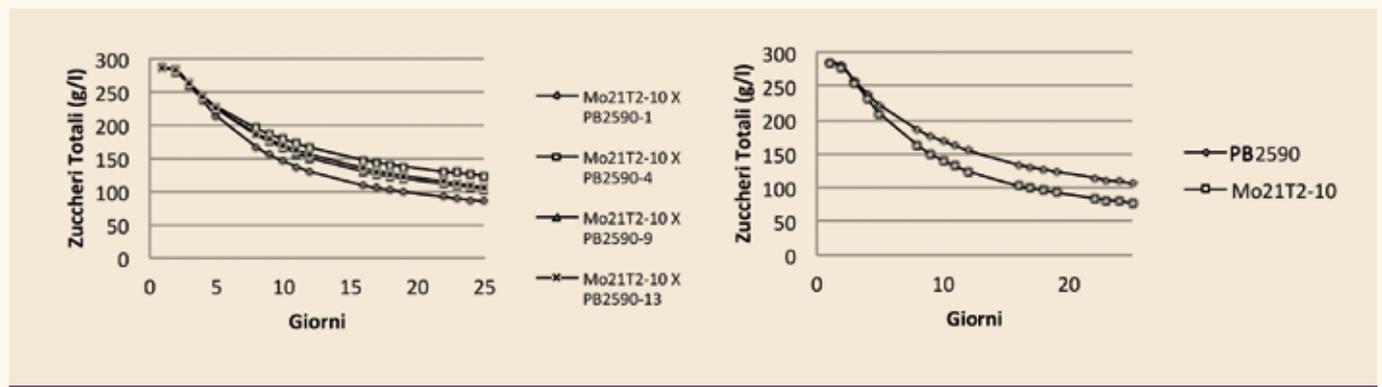
glutazione. Infatti, alte produzioni di solfuri sono indice di un'assimilazione e riduzione dei solfati eccedente il fabbisogno in aminoacidi solforati, mentre un'elevata quantità di glutazione è una sorta di stoccaggio di aminoacidi solforati da parte delle cellule, ed è un carattere desiderato per la sua funzione regolatoria del potenziale di ossidoriduzione dei vini. Allo scopo sono state considerate 7 condizioni colturali diverse: simil-mosto come condizione mimanti scarsità di nutrienti e simil-mosto arricchito con tre diverse concentrazioni (0.01, 0.05 e 1 mM) di cisteina e metionina. I ceppi testati nelle diverse tipologie di terreno hanno mostrato una produzione di GSH diversificata in relazione alla specifica tipologia di terreno. In particolare, i ceppi Mo21T2-5 e Mo21T2-12 mostrano una produzione di GSH sostanzialmente elevata e costante mentre il ceppo Mo21T2-10, che ha prodotto GSH in concentrazione doppia rispetto al controllo in simil-mosto arricchito con cisteina, ha mostrato una maggiore variazione in risposta al mezzo utilizzato (Fig. 3). Relativamente alla produzione di solfuro, sono state ottenute per tutti i ceppi produzioni nulle di solfuri con la sola eccezione del ceppo evoluto Mo21T2-10 che ha mostrato una minima produzione di H<sub>2</sub>S nei terreni arricchiti di metionina.

■ Per testare la performance fermentativa e la produzione di GSH in condizioni molto stressanti, il ceppo Mo21T2-10, tre derivati meiotici (Mo21T2-10\_4, Mo21T2-10\_9 e Mo21T2-10\_13) e un ibrido intraspecifico (PB2590 x Mo21T2-10\_1) sono stati testati in

Tab. 1 - Produzione di Glutazione, Solfiti e H<sub>2</sub>S al termine delle prove di microvinificazione

Ceppo	Descrizione	Glutazione (mg/l)	Solfiti Totali (mg/l)	H <sub>2</sub> S
PB2590	Parentale commerciale	0.6	62.3	-
Mo21T2-10	Ceppo evoluto di 21T2	1.9	39.6	+
PB2590 x Mo21T2-10_1	Ibrido	1.2	61.7	+
Mo21T2-10_4	Derivati meiotici di Mo21T2-10	0.8	32.6	-
Mo21T2-10_9		1.2	39.5	-
Mo21T2-10_13		1.0	48.9	-

Fig. 4 - Cinetica del consumo di zuccheri totali (glucosio e fruttosio) in esperimenti di microvinificazione effettuati con i ceppi PB2590, Mo21T2-10 e i suoi derivati meiotici. La concentrazione residua degli zuccheri è stata calcolata indirettamente dal calo in peso in CO<sub>2</sub>. I migliori risultati sono stati ottenuti con l'ibrido intraspecifico Mo21T2-10xPB2590\_1





## DOCUMENTO TECNICO

mosto con un contenuto zuccherino complessivo del 40% (w/v). Una delle principali cause di arresti fermentativi è infatti uno sbilanciamento del rapporto tra fonti carboniose e fonti azotate nei mosti a favore delle prime. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1. Il ceppo ibrido PB2590 x Mo21T2-10\_1 ha prodotto GSH in quantità intermedie rispetto ai ceppi parentali, mentre il contenuto finale dei solfiti totali è stato simile a quello del ceppo parentale PB2590. La cinetica di consumo degli zuccheri da parte del ceppo ibrido ha mostrato un andamento simile a quella del ceppo commerciale PB2590 tecnologicamente più performante rispetto a Mo21T2-10\_1. A differenza del ceppo Mo21T2-10, i derivati meiotici Mo21T2-10\_4, Mo21T2-10\_9 e Mo21T2-10\_13 erano incapaci di produrre H<sub>2</sub>S, ma hanno prodotto quantità inferiori di GSH, mentre le quantità di solfiti totali sono rimaste invariate. Tuttavia nessun ceppo testato è riuscito a portare a termine la fermentazione a causa della carenza di fonti azotate rispetto all'eccesso di fonti carboniose. Pertanto questo studio ha riconfermato l'importanza della disponibilità di una fonte di azoto assimilabile ai fini di una corretta fermentazione. Di fatti le microvinificazioni effettuate con un mosto addizionato di zuccheri (non compensata da alcuna aggiunta di fonte azotata), caratterizzato da circa 28° Brix finali, non hanno portato il vino a secco dopo un periodo di 25 giorni.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ L'innovazione tecnologica nei processi fermentativi e nel campo delle biotecnologie offre oggi la possibilità di una sempre più concreta "personalizzazione" degli starter enologici andando incontro alle esigenze dei produttori e alle richieste dei consumatori. Ceppi di lievito ottimizzati possono rappresentare una valida risposta a pratiche ampiamente diffuse in enologia quali la mutizzazione dei mosti che alterano e accentuano le esigenze nutrizionali dei lieviti durante la fermentazione.

Nel presente lavoro sono stati selezionati ceppi migliorati caratterizzati da alte produzioni di GSH e dalla contemporanea bassa o nulla produzione di H<sub>2</sub>S che hanno dimostrato di esprimere questi caratteri anche in condizioni di forte stress. I risultati dello stu-

dio mettono poi in luce come i ceppi evoluti Mo21T2-5 e Mo21T2-12 siano i più costanti nell'esprimere i fenotipi desiderati (non produzione di H<sub>2</sub>S ed alta produzione di GSH) indipendentemente dalle condizioni di fermentazione testate, rendendoli dei buoni candidati per la fermentazione di mosti desolforati.

## RIASSUNTO

■ Le innovazioni apportate dalle biotecnologie nel campo dei processi fermentativi permettono oggi una modellazione degli starters sulla base delle esigenze dettate dall'impiego di specifiche tipologie di mosti, quali quelli mutizzati e desolforati. Se queste pratiche permettono la soppressione dei microrganismi competitori nel mosto e la conservazione a lungo termine con conseguente uso dilazionato nel tempo, d'altra parte inaspriscono le già limitanti condizioni di fermentazione nelle quali i lieviti operano: l'utilizzo di mosti desolforati in seguito a mutizzazione con SO<sub>2</sub> porta spesso a una alta concentrazione di solfati, causata dall'ossidazione dei solfiti, e a una diminuita presenza di composti biologicamente attivi, che vengono degradati durante il processo. Più in particolare queste condizioni tendono sia a favorire la produzione di composti solforati indesiderati, sia a ostacolare più in generale la performance fermentativa: per ovviare a tale problematica si è qui tentato una strategia di evoluzione adattativa su *Saccharomyces cerevisiae*, atta a incrementare la produzione di glutatone a scapito di quella di solfuri. Si è inoltre valutata la performance fermentativa e la produzione di composti solforati dei ceppi ottenuti da tale strategia e dei loro derivati, operando fermentazioni in condizioni fortemente stressanti e caratterizzate da marcati squilibri in termini di rapporto tra fonti carboniose e azotate. ■

## BIBLIOGRAFIA

- Agenbach W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Proc. South African Soc. Enol. Vitic., Cape Town, Afrique du Sud. Stellenbosh SA 66-87.
- Bell S.J., Henschke P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11: 242-295.
- Bezenger M., Navarro J.M., 1987. Influence de l'azote

sur la fermentation alcoolique en milieu modèle simulant les conditions de l'oenologie. Sciences des aliments 7: 41-60.

- Bisson L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50:107-119.
- De Vero L., Solieri L., Giudici P., 2011. Evolution-based strategy to generate non-genetically modified organisms *Saccharomyces cerevisiae* strains impaired in sulfate assimilation pathway. Lett. in Appl. Microbiol. 53: 572-575.
- De Vero L., Mezzetti F., Solieri L., Giudici P., 2013. La mimica della selezione naturale nel miglioramento dei lieviti. VQ 4: 40-43.
- Eschenbruch R., 1974. Sulphite and sulphide formation during wine making. A review. Am. J. Enol. Vitic. 25: 157-161.
- Giudici P., Zambonelli C., 1992. Criteri di selezione dei lieviti per enologia. VigneVini 9: 9-34.
- Giudici P., Kunkee R.E., 1994. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 45: 107-112.
- Giudici P., Solieri L., Pulvirenti A., Cassanelli S., 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. Appl. Microbiol. Biot. 66: 622-628.
- Giudici P., Rainieri S., Pulvirenti A., Zambonelli C., 2006. Strategie di selezione e miglioramento di lieviti di interesse enologico. Industrie delle bevande XXXV: 22-30.
- Giudici P., De Vero L., Solieri L., Catena M., 2014. La fermentazione del lambrusco: modello di evoluzione biotecnologica. VigneVini 7/8: 38-43.
- Head G.M., 1999. Novel yeasts in winemaking-looking to the future. Food Aust. 51: 347-352.
- Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A., 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. Appl. Environ. Microbiol. 61: 461-467.
- Leichter J., Joslyn M.A., 1969. Kinetics of thiamin cleavage by sulphite. Biochem. J. 113(4): 611-615.
- Makhotkina, O., Kilmartin, P. A., 2009. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. J. Electroanal. Chem. 633: 165-174.
- Manea I., 2013. Evolution of bioactive compounds in fruit juices during preservation by refrigeration. Rev. Roum. Chim. 58(7-8): 619-622.
- Mezzetti F., De Vero L., Giudici P., 2014. Evolved *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with enhanced glutathione production obtained by an evolution-based strategy. FEMS Yeasts Res. 14: 977-987.
- Ough C.S., Lee T.H., 1981. Effects of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. Am. J. Enol. Vitic. 32: 125-127.
- Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16: 675-729.
- Rainieri S., Pretorius I., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. Annals of microbiology 50: 15-31.
- Rapp A., Versini G., 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: J. M. RANTZ (Ed.): Proc. Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wine, 18-19 June 1991, 156-164, Seattle, Washington, USA. ASEV publ, Davis, CA.
- Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. J. Ferm. Bioeng. 82: 377-381.
- Spiropoulos A, Tanaka J, Flerianos I & Bisson LF, 2000. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. Am. J. Enol. Vitic. 51: 233-248.