Dai precursori agli aromi: il ruolo dei lieviti

ALEXANDRA BISOTTO, ANNE JULIEN-ORTIZ Lallemand Sas (Blagnac, France)
PEGGY RIGOU, JEAN-MICHEL SALMON Sciences pur l'Oenologie, Institut National de la Recherche Agronomique (Montpellier - Gruissan, France)
REMY SCHNEIDER Institut Français de la Vigne et du Vin (Gruissan, France)

Come noto, durante la fermentazione alcolica i lieviti trasformano alcuni precursori di aromi in composti aromatici. Risulta ormai acquisito il fatto che alcuni terpeni delle uve, come linalolo, geraniolo, nerolo, citronellolo, α-terpineolo e ossido di linalolo, legati a diglucosidi, contribuiscano in modo significativo al bouquet del vino.

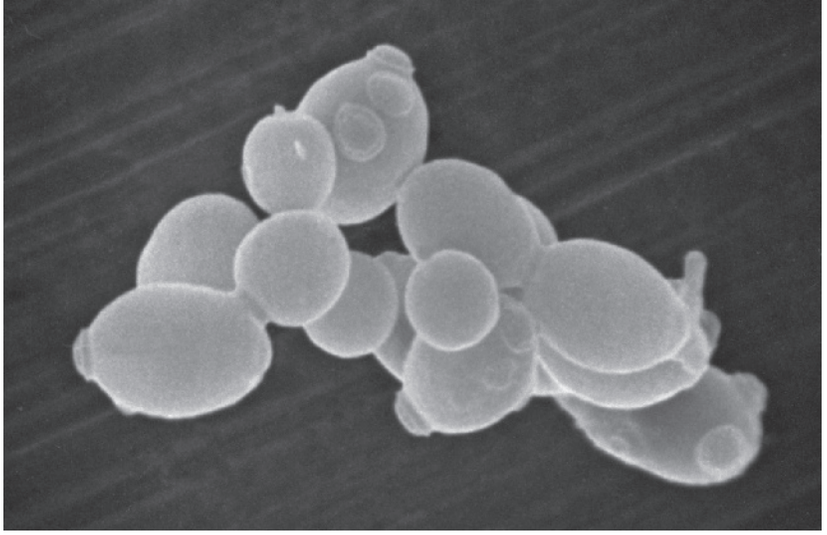
L'idrolisi enzimatica di questi composti richiede una reazione sequenziale: dapprima una α-L-ramnosidasi o una β-D-apiofuranosidasi taglia il legame glicosidico in posizione 1-6; poi i composti aromatici vengono liberati dai monoglucosidi dall'azione di una β-glucosidasi. La rottura dei legami può avvenire anche durante l'invecchiamento, in condizioni blandamente acide.
Diversamente dalla scissione acida, la scissione enzimatica è efficiente e non dà luogo ad alcuna modificazione della componente aromatica della frazione legata. Le glucosidasi dei lieviti, tuttavia, mostrano una limitata attività sui monoterpenil glicosidi durante la vinificazione, per cui buona parte dei precursori aromatici rimane legata. Inoltre, alcuni Autori hanno dimostrato che la iperproduzione indotta di una esoglucanasi endogena in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* portava a un incremento di rilascio nel vino di composti volatili originariamente glisosilati, suggerendo il coinvolgimento di altre attività enzimatiche nell'idrolisi dei glicosidi da parte dei lieviti. Altri Autori hanno invece dimostrato che in tre ceppi di *Saccharomyces* testati la produzione e/o l'attività di enzimi specifici come la β-D-apiofuranosidasi potrebbero essere limitate durante la fermentazione.

Il contesto

Nel 2011 Gamero *et al.* hanno indagato il profilo terpenico di vini Moscato ottenuti con lieviti *Saccharomyces* o

ibridi, non evidenziando alcuna relazione tra tale profilo e l'attività β-D-glucosidasica. Il rilascio o la formazione di composti aromatici dai precursori è risultato essere fortemente legato all'ibrido utilizzato. Per esempio, l'ibrido triplo *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii,* in particolare, e secondariamente l'ibrido *S. cerevisiae* x *S. bayanus,* si sono dimostrati molto efficienti nella produzione della maggior parte dei terpenoli varietali.
Nel loro insieme, questi risultati indicano che ci sono due principali fattori limitanti al completo rilascio di monoterpenoli da composti glicosidici da parte dei lieviti.
Il primo collo di bottiglia ha a che fare con il trasporto dei precursori all'interno della cellula di lievito. I precursori glicosidici sono molecole di grandi dimensioni che non possono passare attraverso la membrana plasmatica per semplice diffusione in cellule vitali intatte. Inoltre alcuni Autori indicano come l'attività β-D-glucosidasica si trovi nello spazio periplasmatico della cellula di lievito e che presumibilmente essa venga liberata durante l'autolisi dei lieviti. In aggiunta, è stato anche trovato che fecce da diversi ceppi di lievito possono presentare capacità leggermente differenti di rilasciare composti volatili derivati da precursori glicosidici. Per quanto in nostra conoscenza, tuttavia, non esistono evidenze scientifiche sullo specifico trasporto di queste molecole nei lieviti.
Il secondo punto verte sull'attività degli enzimi stessi. Lavori già pubblicati hanno stabilito, testando cellule intere, che solo le specie non-*Saccharomyces* mostrano attività β-glucosidasica. All'opposto, altre ricerche hanno evidenziato che cellule intere di *Saccharomyces cerevisiae* possono mostrare una debole attività β-glucosidasica. Perciò è ipotizzabile che alcuni ceppi che mostrano un'efficiente attività β-glucosidasica siano incapaci di assorbire il substrato rappresentato dai precursori di aromi.
Lo scopo del presente lavoro è stabilire un metodo generale per valutare la capacità intrinseca dei lieviti di rilasciare aromi da precursori glicosilati. A questo scopo è stata utilizzata la tecnica della permeabilizzazione delle cellule, per indurre nelle membrane la formazione di pori tali da permettere ai precursori di entrare liberamente nelle cellule, dove la liberazione enzimatica dei terpeni dai precursori glicosidici può aver luogo. In tal modo, la capacità enzimatica delle cellule di lievito può essere facilmente determinata.

SE LA PERMEABILIZZAZIONE NON FUNZIONA
La refrattarietà alla permeabilizzazione, mostrata in questa sperimentazione dai ceppi DV10 e Biodiva, è già stata osservata in precedenti lavori e attribuita principalmente a una particolare conformazione della membrana cellulare.



Le tecniche utilizzate

Per una descrizione completa dei *Materiali e Metodi* si rimanda all'articolo scientifico originale, *Evaluation of the inherent capacity of commercial yeast strains to release glycosidic aroma precursors from Muscat grape must*, pubblicato nell'*Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21/2015, pagg. 194-199.
Qui di seguito si riportano solo alcune informazioni indicative. Le prove sono state eseguite su uve di Moscato di Frontignan raccolte a 17°Brix nel vigneto sperimentale dell'Inra Pech-Rouge (Gruissan, France), ammostate e trattate dapprima per la rimozione della frazione libera dei terpeni presenti, con successivo recupero della frazione legata a molecole glicosidiche. Tale frazione è stata successivamente sottoposta, in parte, a trattamento enzimatico di idrolisi *(vedere dati negli approfondimenti sul web)* e in parte messa a contatto con cellule di lievito precedentemente permeabilizzate (con il metodo proposto da Salmon, 1984). La prova testimone è stata eseguita sostituendo le cellule permeabilizzate con un ugual volume di buffer imidazolo. Il risultato dell'idrolisi enzimatica e della reazione a contatto con cellule permeabilizzate è stato sottoposto ad analisi tramite gascromatografia GC/MS. Tutti i ceppi di lievito testati erano LSA forniti dall'azienda Lallemand Inc. (Montreal, Canada): cinque ceppi di *S. cerevisiae* (LSA1, Lalvin ICV K1M, Uvaferm DV10, Uvaferm CEG, Lalvin EC-1118), un ibrido di *S. cerevisiae* x *S. uvarum* (LSA2) e due non-*Saccharomyces,* Biodiva (*Torulaspora delbrueckii*) e Flavia (*Metscnikowia pulcherrima*).

I risultati

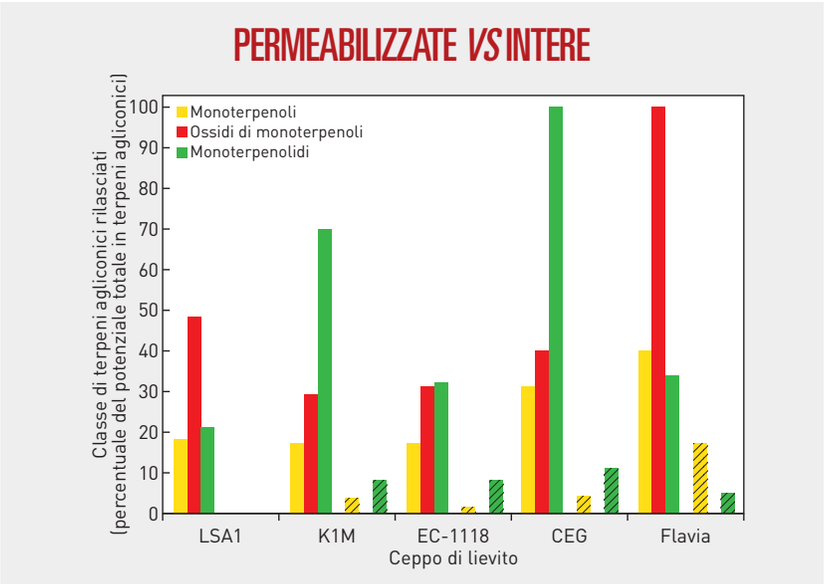
Efficacia del processo di permeabilizzazione

L'efficacia della permeabilizzazione è stata misurata in base all'attività alcoldeidrogenasica di tutti i ceppi di lieviti esaminati, dopo permeabiliz-

I COMPOSTI LIBERATI

Composti rilevati	Ceppo di lievito											
	LSA1		K1M		EC-1118		CEG		LSA2		Flavia	
	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV
linalolo	4,71	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	49,7	NR
o-trienolo	25,0	NR	87,5	23,0	61,3	3,5	36,5	16,7	NR	NR	9,1	0,7
α-terpineolo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	82,9	NR
nerolo	26,3	NR	NR	NR	8,2	NR	26,6	NR	NR	NR	40,1	NR
geraniolo	20,4	NR	NR	NR	8,9	NR	35,0	NR	NR	NR	39,9	NR
linalolo idrato	28,0	NR	69,2	NR	48,2	NR	100,0	NR	NR	NR	25,5	NR
z-8-idrossilinalolo	72,3	NR	41,0	NR	48,2	NR	59,0	NR	NR	NR	94,5	NR
Ossido di *trans*-pirano linalolo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	100,0	NR
3,6 terpendiolo	NR	NR	100,0	NR	52,6	NR	100,0	NR	NR	NR	100,0	NR
3,7 terpendiolo	26,4	NR	53,0	8,7	35,2	7,7	100,0	11,2	NR	NR	11,6	1,0
3,8 terpendiolo	NR	NR	100,0	NR	NR	NR	93,1	NR	NR	NR	99,5	NR

Terpeni liberati da cellule permeabilizzate (dopo 16 ore di incubazione a 40°C) e da cellule intere vitali (dopo 36 ore di fermentazione a 28°C) dalla frazione glicosidica di un mosto di uve Moscato. CIV, cellule intere vitali; CP, cellule permeabilizzate; NR, non rilevabile. I risultati sono espressi come percentuale del potenziale totale in terpeni agliconici determinato dopo idrolisi con il preparato enzimatico ad attività β-D-glucosidasica.



Monoterpenoli, ossidi di monoterpenoli e monoterpendioli rilasciati dalle cellule permeabilizzate (incubazione di 16 ore a 40°C, (barre piene) e cellule intere (fermentazione alcolica di 36 ore a 28°C, (barre rigate) a partire dalla frazione glicosidica del mosto da uve Moscato, espressi come percentuale del potenziale totale in terpeni agliconici determinato con idrolisi enzimatica.

zazione. Tutte le cellule permeabilizzate, fatta eccezione per i ceppi DV10 e Biodiva, hanno mostrato un'attività alcoldeidrogenasica misurabile nelle condizioni sperimentali *(vedere dati negli approfondimenti sul web)*, il che sta ad indicare la bontà della tecnica, tranne che per i due ceppi citati.

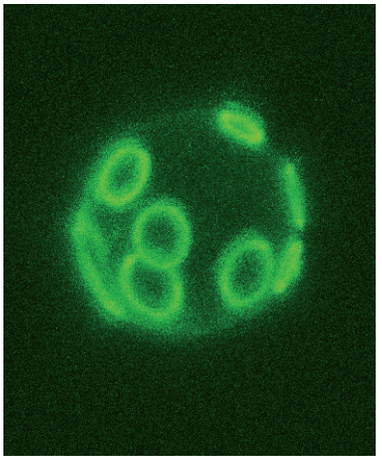
Attività β-glucosidasica nelle cellule permeabilizzate

L'attività β-glucosidasica è stata misurata con il substrato artificiale p-nitrofenil-β-D-glucopiranoside *(vedere dati negli approfondimenti sul web)*. I risultati ottenuti sono coerenti con i livelli di bassa permeabilizzazione precedentemente osservati in DV10 e Biodiva. Gli altri ceppi di *Saccharomyces* testati hanno mostrato una certa attività β-glucosidasica, seppur bassa. Il ceppo Flavia ha invece mostrato una maggiore attività β-glucosidasica. Nonostante lavori precedenti, con cellule intere, avessero dimostrato che solo i non-*Saccharomyces* avrebbero attività β-glucosidasica, è stato evidenziato, utilizzando la permeabilizzazione cellulare, che anche i *Saccharomyces* possiedono questa attività.

Efficienza delle cellule permeabilizzate nel rilascio di terpeni da precursori glicosilati

Poiché una certa attività β-glucosidasica è stata individuata nelle cellule permeabilizzate testate, è stata valutata anche l'efficienza di tali cellule nel rilasciare terpeni agliconi dalla frazione glicosidica degli aromi presente nel mosto da uve Moscato. Il potenziale aromatico totale della frazione glicosidica è stato prima valutato analizzando la frazione volatile ottenuta per idrolisi enzimatica. In seguito, le cellule permeabilizzate sono state incubate per 20 ore in presenza della medesima frazione glicosidica, sia a temperatura ambiente sia a 40°C. L'innalzamento della temperatura di incubazione non ha influenzato né il profilo né la quantità di terpeni rilasciati, bensì solo la velocità di rilascio. Solo cinque dei sei ceppi testati hanno idrolizzato la frazione glicosidica e liberato terpeni (tabella in alto). Le cellule permeabilizzate del ceppo LSA2, ibrido di *S. cerevisiae e S. uvarum*, non sono state in grado di liberare alcun terpene nelle condizioni sperimentali. Si è osservata una

grande variabilità nella capacità di ceppi differenti permeabilizzati di rilasciare specifiche classi di terpeni legati durante l'esperimento (grafico di pagina precedente). In termini di quantità e tipologia di terpeni rilasciati, le cellule permeabilizzate di Flavia sono apparse come quelle con la maggior attività di idrolisi dei glucosidi tra i ceppi testati (tabella e grafico grafico di pagina precedente). Globalmente, i monoterpendioli, come 3,6 e 3,7 monoterpendiolo, sono stati i terpeni maggiormente rilasciati dalle cellule permeabilizzate dei ceppi testati. È interessante notare come la maggior parte di queste molecole inodore possano essere trasformate in molecole aromatiche durante l'invecchiamento grazie a numerose reazioni che avvengono in mezzo acido, come l'isomerizzazione, la chiusura ad anello, l'idratazione, la disidratazione e l'ossidazione. Gli altri terpeni maggiormente rilasciati sono stati monoterpenoli e ossidi di monoterpeni, con un'elevata efficienza osservata per il ceppo Flavia.



Confronto tra cellule permeabilizzate e cellule intere vitali

Allo scopo di determinare se la permeabilizzazione cellulare abbia influenzato il rilascio di terpeni dalla frazione glicosidica del mosto di uve Moscato, lieviti non permeabilizzati sono stati testati per la loro capacità di rilasciare terpeni agliconici dallo stesso estratto, nel corso di una fermentazione alcolica della durata di 36 ore. In tali condizioni, le cellule intere non sono state in grado rilasciare aromi liberi come quelle permeabilizzate. Solo l'o-trienolo e il 3,7 monoterpendiolo sono stati rilevati al termine della fermentazione da parte di alcuni ceppi (K1M, EC 1118, CEG e Flavia) e comunque in concentrazioni inferiori a quelle rilevate con le cellule permeabilizzate. Questa evidenza avvalora i risultati ottenuti da Ugliano *et al.* nel 2006, secondo i quali l'o-trienolo si formerebbe in parte per idrolisi acida sia del precursore glicosidico sia degli agliconi rilasciati dalle glicosidasi dei lieviti. Il confronto tra il quantitativo di terpeni agliconi rilasciati da cellule intere e permeabilizzate (grafico) mostra chiaramente il beneficio derivante dalla permeabilizzazione. Tali risultati suggeriscono che il trasporto dei precursori aromatici all'interno della cellula sia un importante fattore limitante per i ceppi di lievito commerciali nel liberare gli aromi dai precursori glicosidici dei mosti.

IL CASO DEGLI OSSIDI DI MONOTERPENOLI

Il rilascio di ossidi di monoterpenoli è decisamente interessante. Ci sono due pathway che possono spiegare la loro origine. Alcuni di essi sono già presenti sottoforma dei loro precursori glicosilati nell'estratto originario da mosto di uve Moscato; tuttavia in un secondo momento il metabolismo dei lieviti potrebbe ossidare un terpene prodotto. Allo stato attuale delle conoscenza tuttavia esistono pochi casi descritti di bio-ossidazione lievito-mediata di terpeni, ed essi sono principalmente ad opera di *Candida tropicalis*, *Trichosporum cutaneum* e altri lieviti specifici utilizzati per la produzione della birra. La presente ricerca non consente di stabilire quale sia il pathway dominante nella loro produzione in vini da uve Moscato.

Applicazioni pratiche

Lo scopo di questo lavoro era valutare la capacità nativa dei ceppi di lievito commerciali per uso enologico di rilasciare aromi da precursori glicosidici in mosti di uve Moscato. Nonostante alcuni ceppi abbiano mostrato di resistere al trattamento di permeabilizzazione, i risultati mettono in evidenza le potenzialità di questa tecnica per migliorare le attività enzimatiche dei lieviti. Sorprendentemente, alcuni ceppi si sono dimostrati in grado di liberare monoterpenoli odorosi, mentre altri hanno rilasciato monoterpendioli inodore. I risultati ottenuti confermano che nel rilascio dei glucosidi non avviene alcuna concomitante idrolisi di glucosidi disaccaridi associata con attività enzimatiche diverse dalla β-glucosidasica.

I risultati indicano anche l'ingresso dei precursori aromatici all'interno della cellula del lievito come fattore limitante importante, fatto di particolare interesse fisiologico che potrebbe orientare i programmi di breeding per la selezione di lieviti enologici ibridi interspecifici. L'ottenimento di un ibrido tra *S. cerevisiae* e *S. mikatae*, una specie mai associata alla fermentazione alcolica, è stato recentemente descritto con lo scopo di selezionare un nuovo ceppo di lievito in grado di apportare al vino una complessità maggiore di quella ottenibile coi ceppi già presenti sul mercato.

Un approccio simile potrebbe essere applicato per migliorare geneticamente i ceppi commerciali di *S. cerevisiae* affiancando alla loro nativa attività enzimatica idrolitica glicosidasica la capacità di trasportare attivamente i precursori aromatici dal mosto all'interno della cellula. Si tratterebbe di un'arma in più nelle mani del winemaker per sviluppare nuovi stili enologici. ■

www.vitevinoqualita.it/14592

© RIPRODUZIONE RISERVATA