



UN NUOVO APPROCCIO TECNOLOGICO PER LA SELEZIONE DI LIEVITI ENOLOGICI BASSO PRODUTTORI DI SO₂, H₂S ED ACETALDEIDE

Un nuovo progetto di ricerca ha permesso di identificare le basi molecolari direttamente collegate alla produzione di SO₂, H₂S ed acetaldeide in *S.cerevisiae*, gettando le basi per un importante miglioramento genetico.



Di
Jessica Berlese-Noble*
Céline Raynal*
Anthony Silvano*
Anne Ortiz-Julien*
 Lallemand SAS - Blagnac (Francia)

Daniel Granes*
Caroline Bonnefond*
 Institut Coopératif du Vin - Lattes (Francia)

Bruno Blondin
 Montpellier SupAgro - Montpellier (Francia)

(*Da sinistra nella foto)

INTRODUZIONE

■ L'anidride solforosa è ampiamente impiegata in enologia per le vantaggiose proprietà tecnologiche (antisettiche, antiossidanti e antiossidasiche) che rendono questa molecola uno strumento quasi indispensabile per il lavoro in cantina. Nonostante ciò, la tendenza attuale è di ridurre l'uso per limitare la

concentrazione finale nel vino, e soddisfare le richieste connesse a problemi salutistici e di intolleranza legati all'assunzione dei solfiti con l'alimentazione. L'obbligo di indicare in etichetta la presenza di solfiti, quando presenti al di sopra dei 10 mg/L, sta inoltre spingendo alcuni produttori a mettere a punto dei protocolli specifici per la produzione di vino con contenuti di SO₂ inferiori a questa soglia,

senza rinunciare ad una shelf-life coerente con le esigenze del consumo.

■ I solfiti sono prodotti dagli stessi lieviti durante la fermentazione alcolica (FA), in quantità variabili da pochi milligrammi a più di 90 mg/L, in funzione delle condizioni di fermentazione e del ceppo di lievito prescelto. La presenza in concentrazioni tossiche per i batteri lattici è spesso correlata con problemi di fer-



mentazione malolattica (FML), specialmente nei vini rossi.

■ L'anidride solforosa è un metabolita intermedio nel ciclo di assimilazione del solfato (via della solfito reductasi), una via metabolica utilizzata dal lievito per la sintesi degli amminoacidi solforati. In certe condizioni, uno squilibrio in alcune tappe di questo metabolismo può portare alla formazione di quantità eccessive di SO_2 , successivamente rilasciate nel mezzo. Concentrazioni elevate di solfiti nel mosto possono essere all'origine della sintesi del solfuro d'idrogeno, un sottoprodotto fortemente indesiderato poiché incide negativamente sul profilo sensoriale del vino. Benché il ciclo di assimilazione dei solfati sia stato ampiamente descritto, i parametri che influenzano la produzione di solfiti e, soprattutto, le basi genetiche responsabili delle differenze fra i ceppi di lievito sono rimaste per anni in parte sconosciute.

■ Il metabolismo del lievito è anche il principale responsabile della liberazione di acetaldeide, molecola che condiziona fortemente la quantità di solfiti necessari a stabilizzare i vini grazie alla sua capacità di legarsi in modo stabile alla SO_2 . Si stima che l'acetaldeide sia responsabile di circa il 75% dell'anidride solforosa legata nei vini bianchi e del 50% nei vini rossi. Controllare la produzione di acetaldeide in fermentazione è dunque un altro criterio fondamentale per ridurre il contenuto di SO_2 nei vini al consumo.

■ Negli ultimi anni è andata aumentando la domanda di nuovi lieviti enologici ottimizzati in relazione a specifiche proprietà tecnologiche. Oltre alla selezione clonale, all'ingegneria genetica e alla selezione naturale, l'ibridazione è la tecnica più comune per conseguire tali miglioramenti. Inoltre, l'ibridazione tra microrganismi della medesima specie non richiede alcuna manipolazione genetica e genera lieviti naturali non geneticamente modificati (non-OGM).

■ La tecnica della mappatura dei loci per i caratteri quantitativi (QTL) è stata recentemente estesa a tali applicazioni. Questo metodo consiste nell'identificare una correlazione fra una variazione fenotipica in un microrganismo (in un carattere di interesse) e una o diverse regioni del suo genoma. Una volta identificata questa regione, è possibile dirigere il suo trasferimento da un ceppo di lievito a un altro allo scopo di combinare diverse proprietà ricercate in un unico organismo.

Fig. 1 - Schema della selezione assistita mediante marcatori molecolari e cicli di rein-crocio (backcrossing)

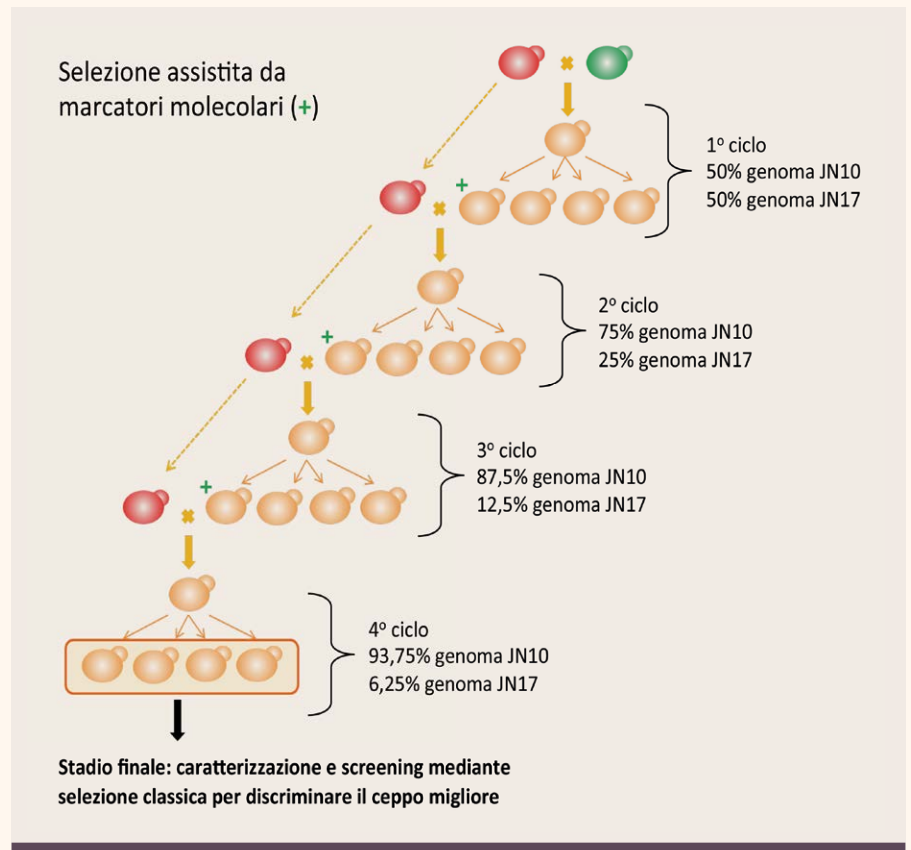
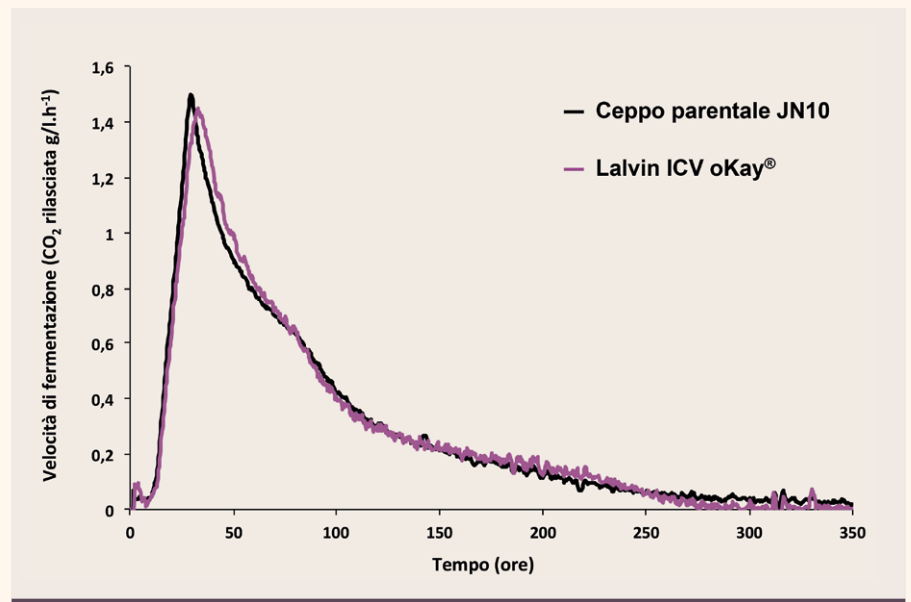


Fig. 2 - Cinetica di fermentazione in laboratorio su mosto Chardonnay fermentato a 20°C in condizioni isoterme





BREEDING ASSISTITO DA MARCATORI MOLECOLARI COME STRATEGIA DI MIGLIORAMENTO GENETICO

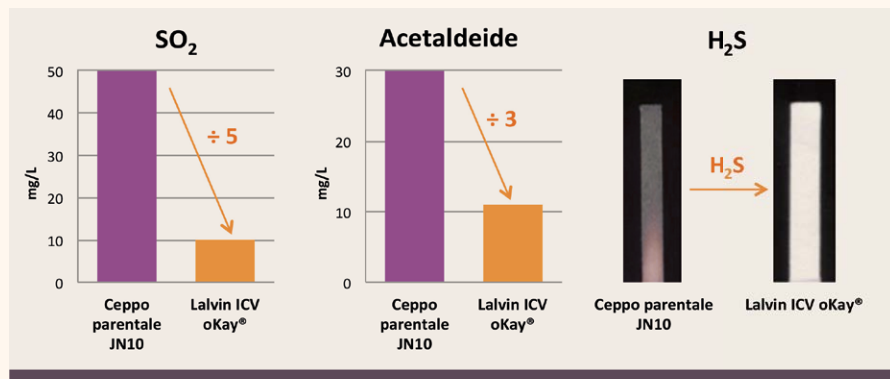
■ Scopo di questo studio è stato sviluppare nuovi ceppi enologici che combinino partico-

lari fenotipi, quali bassa produzione di SO₂, H₂S e acetaldeide, senza rinunciare ad una vigorosa capacità fermentativa. Per questo studio sono stati scelti due lieviti che presentavano in modo complementare le proprietà ricercate. Il ceppo JN10, particolarmente robusto, in grado cioè di completare la fermentazione in condizioni difficili quali temperature estreme (basse o elevate) e mosti altamente chiarificati; ed il ceppo JN17, carat-

terizzato da limitate esigenze in azoto, bassa produzione di SO₂, H₂S ed acetaldeide e da un profilo equilibrato dei composti volatili. La mappatura QTL ha permesso di identificare le regioni del genoma del ceppo JN17 connesse ai fenotipi ricercati, ovvero bassi livelli di SO₂ e H₂S. Grazie alla combinazione dei dati fenotipici e genotipici i ricercatori sono riusciti a identificare una regione del cromosoma XIV connessa alla produzione di solfiti. In questa regione sono stati identificati due geni delle vie metaboliche dello zolfo, *MET2* e *SKP2*.

■ Una volta identificati i marcatori molecolari connessi alle proprietà ricercate, è stato possibile trasferire tramite reincrocio la proprietà della bassa produzione di SO₂/H₂S dal ceppo di lievito JN17 al ceppo JN10 mantenendone intatte tutte le proprietà enologiche. Parallelamente si è riusciti a trasferire altri due fenotipi del ceppo parentale JN17 (scarsa produzione di acetaldeide e limitate esigenze di azoto). Per mantenere intatte le eccellenti proprietà fermentative del ceppo JN10 si è proceduto a dei cicli di reincrocio tra spore (ibridi aploidi) del ceppo ottimizzato e spore del ceppo parentale JN10. La presenza dei marker molecolari associati ai caratteri di interesse garantiva la non-perdita dei tratti genetici acquisiti. Dopo tre cicli di reincrocio è stato restaurato più del 93% del genoma originale del ceppo JN10, ed è stato verificato il trasferimento di tutti i fenotipi ricercati provenienti dal ceppo JN17: scarsa produzione di SO₂, H₂S e acetaldeide e limitate esigenze di azoto (**Fig.1**).

Fig. 3 - Verifica in laboratorio del trasferimento dei fenotipi ricercati nel nuovo ceppo ICV oKay®



Tab. 1 - Parametri enologici classici misurati al termine della fermentazione alcolica. Test su scala di laboratorio

	Alcol (% v/v)	Zuccheri residui (g/L)	Acidità volatile (g/L H ₂ SO ₄)	Acidità totale (g/L H ₂ SO ₄)
Ceppo parentale JN10	12,94	1,8	0,16	4,32
Ceppo migliorato (Lalvin ICV oKay®)	13,01	0,7	0,19	4,40

Tab. 2 - Analisi dei mosti dopo solfitazione nelle tre varietà incluse nella sperimentazione

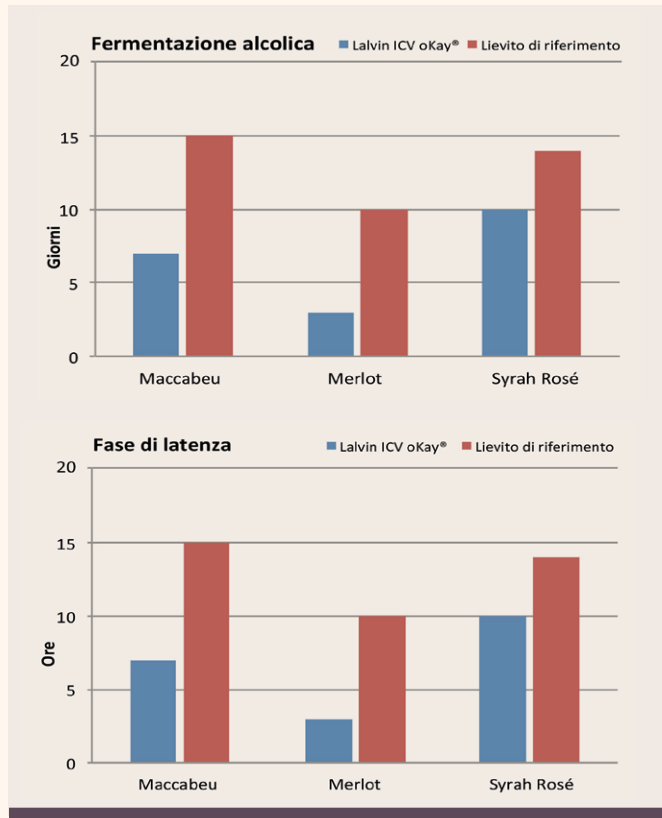
	Merlot	Syrah Rosé	Maccabeu
Zuccheri (g/L)	254	190	211
Acidità totale (g/L H ₂ SO ₄)	2,85	4,15	2,6
Azoto prontamente assimilabile (mg/L)	84	150	200
So ₂ libera iniziale (mg/L)	23	4	28
So ₂ totale iniziale (mg/L)	45	15	55
Torbidità (NTU)	110	60	60

SELEZIONE E CARATTERIZZAZIONE IN LABORATORIO DEL LIEVITO CON LE MIGLIORI CARATTERISTICHE DI ENTRAMBI I CEPPI PARENTALI

■ A partire dagli ibridi di quarta generazione che presentavano i marcatori molecolari di riferimento, si è proceduto ad una nuova fase di caratterizzazione in laboratorio in condizioni enologiche variabili. Scopo del lavoro era individuare il ceppo che combinasse in modo migliore le proprietà ricercate con un



Fig. 4 - Durata della fase di latenza e della fermentazione alcolica nei test su scala pilota. Confronto tra Lalvin ICV oKay® ed il lievito di riferimento



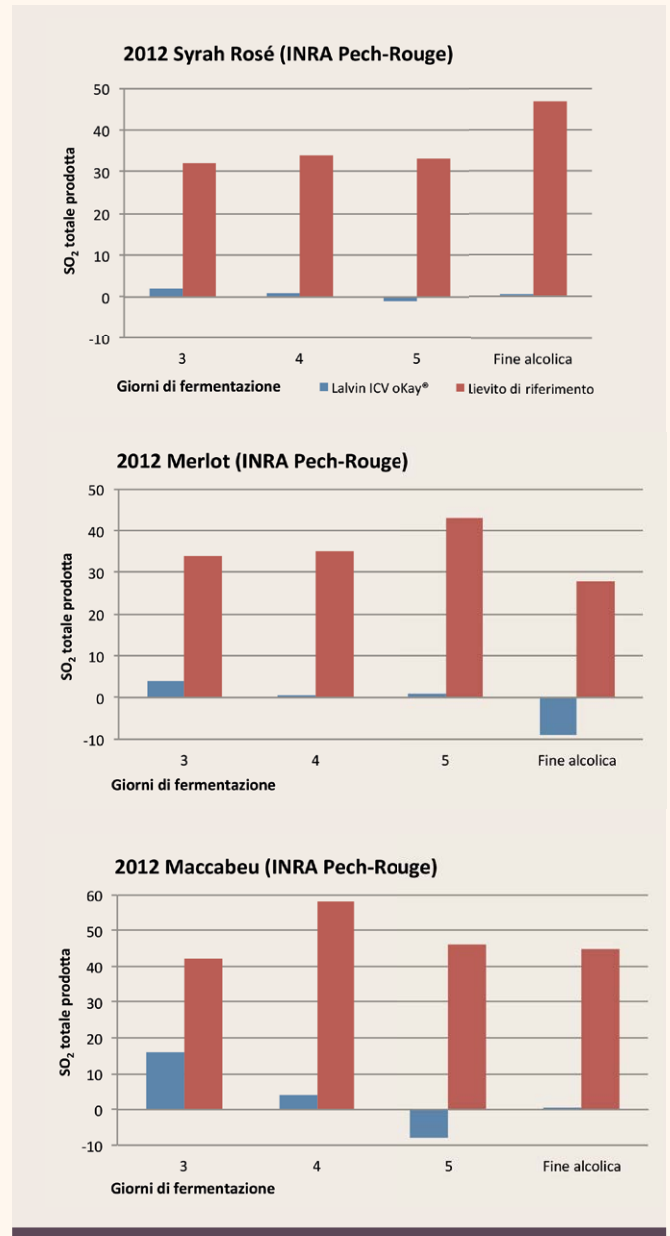
comportamento enologico soddisfacente, denotato da buona capacità fermentativa, resistenza a temperature estreme, profilo sensoriale interessante, etc.

■ Il lievito prescelto (denominato successivamente Lalvin ICV oKay®) nelle prove finali di caratterizzazione ha confermato il mantenimento dei tratti positivi del parentale JN10, sia in termini di cinetica fermentativa che dei parametri analitici, con assenza di aromi estranei o eccessi di acidità volatile (Fig.2, Tab.1). Allo stesso tempo sono stati confermati i bassi livelli di SO₂, H₂S e acetaldeide comprovando l'affidabilità complessiva della strategia di miglioramento genetico (Fig. 3).

TEST SU SCALA PILOTA

■ I test sono stati eseguiti presso l'Unità sperimentale dell'INRA di Pech-Rouge in Francia. Obiettivo della sperimentazione era di confrontare il nuovo lievito oKay® con un ceppo enologico di riferimento. Le fermentazioni sono state condotte su varietà Merlot, Syrah (vinificato in rosato) e Maccabeu (Tab. 2). L'uva Merlot è stata trattata con la tecnica del *flash détente*, pressata ed il succo sottoposto a chiarifica statica a freddo. Il Syrah Rosé e il Maccabeu sono stati anch'essi pressati e chiarificati a freddo. La temperatura di fermentazione è oscillata tra i 22 ed i 25°C per il Merlot mentre per il Syrah ed il Maccabeu ci si è mantenuti intorno ai 18 °C. I ceppi di lievito utilizzati per le fermenta-

Fig. 5 - Produzione totale di SO₂ durante la fermentazione alcolica (differenza tra SO₂ iniziale nel mosto e valore finale a fine alcolica)



zioni sono stati reidratati con Go-Ferm Protect® e inoculati nei mosti alla dose di 25 g/hl. Qualora necessario, sono stati apportati nutrienti in forma organica o complessa ad un terzo della fermentazione alcolica. Nel Merlot la FML è stata condotta con batteri selezionati Lalvin VP41® inoculati ad 1 g/hl. La durata della fase di latenza e della fermentazione, così come la cinetica di produzione e riassorbimento della SO₂ sono stati attentamente monitorati. I dati hanno confermato le ottime performance fermentative e l'assenza di accumulo della SO₂ con il ceppo oKay® rispetto al testimone (Figg. 4 e 5).



CARATTERIZZAZIONE SENSORIALE

■ Presso l'Institut Coopératif du Vin (ICV) in Francia, sono stati eseguiti dei test comparativi allo scopo di raccogliere informazioni sul contributo del nuovo lievito al profilo sensoriale in diverse varietà di uva e differenti strategie di vinificazione. Le varietà coinvolte nella sperimentazione sono state il Merlot (termovinificato), Syrah e Grenache vinificati in rosato ed uno Chardonnay.

■ Tutte le fermentazioni sono state effettuate senza contatto con le bucce, nel caso del Grenache si è provveduto ad una macerazione pellicolare di 4 ore. I mosti sono stati enzimati e chiarificati a freddo per 20 ore, eccetto per il Merlot che è stato filtrato sotto vuoto dopo la pressatura delle uve trattate con flash détente. L'inoculo dei lieviti testati è avvenuto alla dose di 30 g/hl previa reidratazione con Go-Ferm Protect®.

■ Le temperature di fermentazione sono state di 18 °C per i bianchi ed i rosati, tra i 18°C ed i 22°C per il Merlot. Ove prevista, la fermentazione malolattica è stata condotta con batteri selezionati Lalvin ICV Elios 1® inoculati ad 1 g/hl due travasi dopo il termine della fermentazione alcolica.

■ La caratterizzazione organolettica dei vini ottenuti è stata effettuata con il metodo ICV dell'Analisi Sensoriale Descrittiva Quantitativa (ASDQ, Granès et al. 2010). L'analisi chimica dei composti solforati negativi (H₂S e metantiolo) è stata effettuata nei vini due mesi dopo l'imbottigliamento.

RISULTATI

■ Tutti i test comparativi hanno mostrato una tendenza del lievito oKay® verso una maggiore complessità aromatica, con una miscela di aromi fermentativi e sensazioni fruttate meno mascherate da aromi solforati estranei; all'assaggio i vini hanno denotato un buon equilibrio fra la sensazione di volume in bocca e l'acidità, con riduzione della secchezza.

■ Le **Figg. 6 e 7** illustrano i risultati dei test ASDQ sui profili sensoriali di Chardonnay e Grenache Rosé. L'analisi statistica delle variabili ceppo di lievito, varietà di uva e analisi chimiche dei mosti ha evidenziato come

Fig. 6 - Profilo sensoriale su Chardonnay 2012 fermentato con tre lieviti diversi (fonte: R&D ICV)

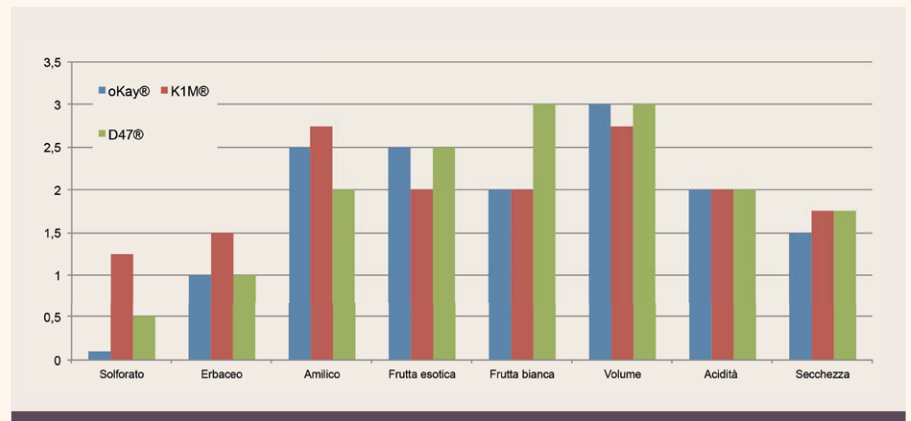


Fig. 7 - Profilo sensoriale su Grenache Rosé 2012 fermentato con tre lieviti diversi (fonte: R&D ICV)

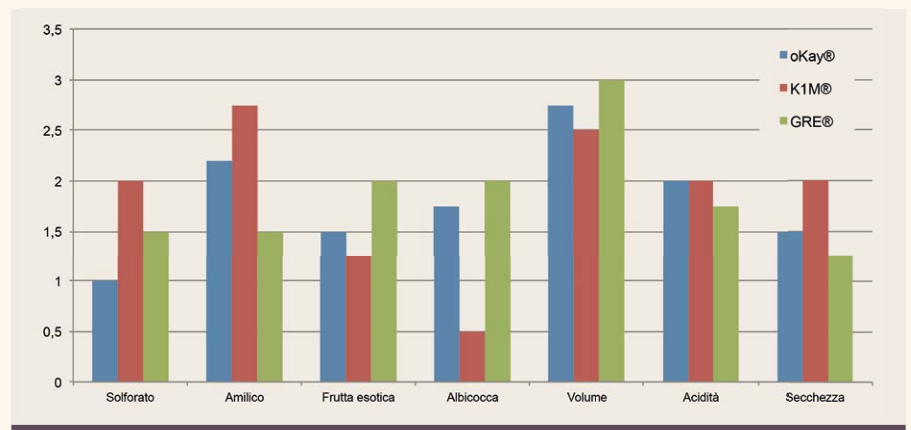
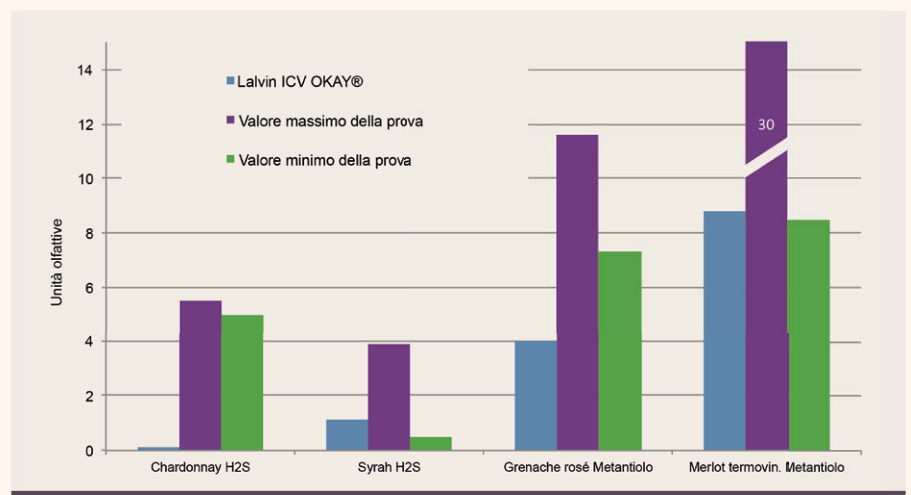


Fig. 8 - Dosaggio dei composti solforati negativi nelle quattro prove di vinificazione svolte all'ICV nella vendemmia 2012 (fonte: R&D ICV)





il principale fattore che influenza i livelli dei composti solforati negativi sia il vitigno. Tuttavia il lievito ICV oKay® si è distinto dagli altri lieviti testati per le ridottissime quantità di H₂S e metantiolo, a conferma del peculiare metabolismo dello zolfo.

■ La Fig. 8 illustra i risultati ottenuti con le concentrazioni delle molecole espresse in «unità olfattive», ovvero il rapporto tra la concentrazione reale misurata nel vino e la soglia di percezione. L'andamento del consumo dell'acido malico su Merlot termovinificato ha evidenziato l'ottima compatibilità tra il lievito ICV oKay® ed i batteri malolattici inoculati (fig. 9). Questo risultato potrebbe essere verosimilmente correlato con la bassissima produzione di SO₂ che caratterizza questo ceppo.

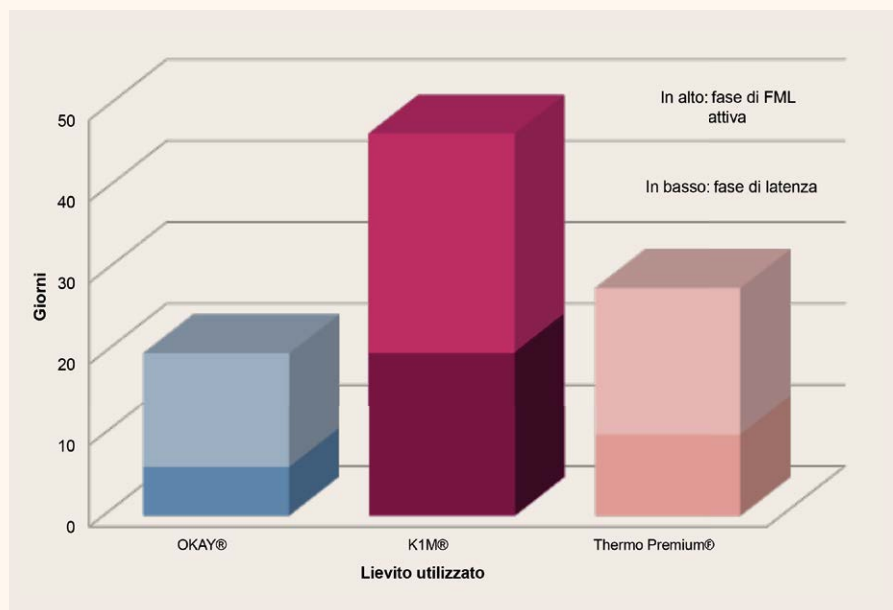
CONCLUSIONI

■ Comprendere le basi genetiche a monte della diversità fenotipica dei lieviti enologici è il primo passo verso l'impiego di strategie per il miglioramento delle proprietà tecnologiche dei ceppi attualmente disponibili. Con questo studio si sono potute identificare le basi molecolari responsabili della variazione fenotipica nella produzione di solfiti nei lieviti enologici grazie ad un approccio globale, che ha integrato uno studio fisiologico, un'analisi trascrittomico e una ricerca dei QTL (regioni del genoma codificanti per caratteri quantitativi).

■ Lo studio ha evidenziato come la combinazione di due alleli dei geni *MET2* e *SKP2* sia responsabile della variazione fenotipica osservata fra due ceppi parentali di riferimento. Inoltre, è stato dimostrato che tali geni sono altresì coinvolti nel cambiamento fenotipico di altri caratteri di interesse quali produzione di H₂S e acetaldeide.

■ Finora gli studi genetici si erano concentrati sul controllo della produzione di H₂S, ma le soluzioni proposte (ad es. ridotta attività solfito riduttasi) presentavano lo svantaggio di far aumentare in modo considerevole la produzione di SO₂ (Cordente et al. 2009, Linderholm et al. 2008). Il metodo dei QTL apre oggi nuove prospettive per quei lieviti attualmente sul mercato che presentano almeno uno dei problemi correlati al presente studio. Tutti i test eseguiti negli ultimi due anni con

Fig. 9 - Durata della fermentazione malolattica nel Merlot termovinificato inoculato con lieviti diversi



il lievito Lalvin ICV oKay® hanno dimostrato una produzione di SO₂, H₂S e acetaldeide quasi nulla. I vini così prodotti possono esprimere pienamente il loro potenziale qualitativo soddisfacendo le richieste di prodotti con basso o ridotto contenuto di SO₂ finale. ■

BIBLIOGRAFIA

■ Ambroset, C., M. Petit, C. Brion, I. Sanchez, P. Delobel, C. Guérin, H. Chiapello, P. Nicolas, F. Bigey, S. Dequin, and B. Blondin. 2011. Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. 1(4):263-281.

■ Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4):319-324.

■ Casalone, E., C. M. Colella, S. Daly, E. Gallori, L. Moriani, and M. Polsinelli. 1992. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 22(6): 435-440.

■ Cordente, A. G., A. Heinrich, I. S. Pretorius, and J. H. Swiegers. 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Research*. 9(3):446-459.

■ Deutschbauer, A. M., and R. W. Davis. 2005. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat Genet*. 37(12):1333-1340.

■ Donalies, U. E., and U. Stahl. 2002. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast*. 19(6):475-484.

■ Eschenbruch, R. 1974. Sulfite and Sulfide Formation during Winemaking – A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(3):157-161.

■ Eschenbruch, R., and P. Bonish. 1976. The influence of pH on sulphite formation by yeasts. *Archives of Microbiology*. 107(2):229-231.

■ Granès, D., L. Pic-Blayteron, J. Negrel, and C. Bonnefond. 2010. Method for a Common Language, Quantitative Descriptive Sensory Analysis. *Practical Winery and Vineyard Journal*. Sept./Oct. 2010.

■ Hansen, J., and M. C. Kielland-Brandt. 1996. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *Journal of Biotechnology*. 50(1):75-87.

■ Linderholm, A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson. 2008. Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(5):1418-1427.

■ Marullo, P., M. Aigle, M. Bely, I. Masneuf-Pomarede, P. Durrrens, D. Dubourdieu, and G. Yvert. 2007. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Research*. 7(6):941-952.

■ Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, and A. Lonvaud. 1998. L'emploi du dioxyde de soufre dans le traitement des moûts et des vins. *Traité d'oenologie*. Dunod/Lavigne.

■ Rössignol, T., L. Dulau, A. Julien, and B. Blondin. 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*. 20(16):1369-1385.

■ Thomas, D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4):503-532.

■ Thornton, R. J. 1985. The Introduction of Flocculation into a Homothallic Wine Yeast. A Practical Example of the Modification of Winemaking Properties by the Use of Genetic Techniques. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1):47-49.

■ Wainwright, T. 1970. Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitamin B6 deficiency. *Journal of General Microbiology*. 61(1):107-119.

■ Yoshida, S., J. Imoto, T. Minato, R. Oouchi, Y. Kamada, M. Tomita, T. Soga, and H. Yoshimoto. 2011. A novel mechanism regulates H₂S and SO₂ production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 28(2):109-121.