



Le caratteristiche principali richieste a un ceppo di lievito da impiegare in vinificazione sono sensibilmente cambiate nel tempo. I primi ceppi di lievito selezionati negli anni '50-'60 dovevano possedere caratteristiche fondamentali quali una buona tolleranza alla SO_2 , una buona energia fermentativa, tempi brevi di fermentazione ed assenza di aromi sgradevoli. Queste caratteristiche erano certamente in sintonia con le tecnologie e le esigenze dell'enologia del passato. Più attuali sono invece le richieste di ceppi criotolleranti, da impiegare su larga scala nelle fermentazioni a bassa temperatura, di ceppi basso produttori di etanolo, per la diffusione sul mercato internazionale dei *low-alcohol wine* o di ceppi che non producono solfiti, i cui effetti negativi sulla salute sono noti ai ben informati consumatori.

Perché il glutatione è interessante

Recentemente è anche aumentato l'interesse per i lieviti in grado di

produrre elevate quantità di glutatione (GSH), poiché i ceppi con queste caratteristiche possono potenzialmente rappresentare un'alternativa all'impiego dell'anidride solforosa, limitatamente al suo ruolo antiossidante. Dal punto di vista chimico, il glutatione è un tripeptide sintetizzato a partire dagli amminoacidi cisteina, glicina e acido glutammico ed è presente in tutte le cellule viventi, principalmente nella sua forma ridotta.

Il ruolo cruciale che il GSH svolge nei lieviti, nei mammiferi e in molti organismi procarioti è dato principalmente dal suo gruppo sulfidrilico libero (-SH) che gli conferisce proprietà nucleofile e ossidoriduttive uniche. Grazie a queste particolari proprietà, il GSH ha trovato largo impiego in molte applicazioni biotecnologiche che vanno dalla produzione di alimenti salutistici ai preparati farmaceutici, fino ad arrivare alle bevande fermentate. In particolare, nei mosti e nei vini bianchi, la notorietà del GSH deriva dalla sua capacità di controllare i danni ossidativi e di limitare l'imbrunimento tramite la riduzione competitiva degli *o*-chinoni prodotti dall'azio-

La selezione di lieviti migliorati per la produzione di glutatione

Negli ultimi anni le tendenze del mercato enologico sono state fortemente influenzate dalle esigenze dei consumatori sempre più attenti alla qualità dei vini e, sulla scia di queste tendenze, oltre che delle innovazioni tecnologiche di produzione, sono stati improntati i nuovi criteri di selezione dei lieviti enologici da utilizzare come coltura starter per i processi fermentativi.

La selezione di una coltura starter, come di qualsiasi altro *biocatalizzatore*, è un processo multi-disciplinare che non include solo l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione della performance metabolica e fermentativa dei ceppi, ma anche lo studio dei determinanti genetici di ogni carattere e l'implementazione di tecniche di miglioramento genetico.

FRANCESCO

MEZZETTI,

LUCIANA DE VERO

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

ne della polifenolo ossidasi sugli acidi idrossi-cinnamil tartarici. Queste azioni si traducono, fondamentalmente, in un rallentamento della formazione del sotolone e degli altri caratteri di invecchiamento atipico, e in una effettiva protezione nei confronti dei diversi composti aromatici del vino.

I fattori che influenzano la concentrazione di GSH nel vino

Il raggiungimento di efficaci concentrazioni di GSH nel vino non è però di facile ottenimento. L'apporto iniziale dato dalle uve, i processi tecnici usati in cantina e il ceppo di lievito impiegato nella fermentazione sono tutti fattori capaci di introdurre una forte variabilità nella concentrazione finale.

In primo luogo, il contenuto di GSH evidenziato nelle diverse varietà di *Vitis vinifera* è estremamente variabile in funzione della componente genetica, del livello di maturazione dell'uva, della nutrizione o degli stress ambientali, tanto per citare alcuni dei fattori determinanti. Nel mosto, i fattori che possono alterare la concentrazione del GSH sono l'esposizione all'ossigeno, l'attività tirosinasi dell'uva, le operazioni di pigiatura e la macerazione delle bucce durante il periodo pre-fermentativo. Anche durante la fase fermentativa è possibile osservare una variazione del contenuto di GSH legata all'attività del lievito: evidenze sperimentali riportano un diverso comportamento dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* relativamente alla capacità di assimilare o rilasciare GSH nel mezzo, sostenendo l'importanza della scelta del lie-

vito giusto da utilizzare. Ciò nonostante, allo stato attuale sono ancora pochi i lavori scientifici relativi all'ottenimento di lieviti per uso enologico alto produttori di glutazione, in grado di combinare questa prerogativa, oltre che alle immancabili performance fermentative, alla non produzione di composti olfattivi indesiderati. Tra questi, quelli chiamati maggiormente in causa sono i solfuri, direttamente coinvolti, insieme ai solfiti e al GSH, nella *pathway* metabolica dei solfati.

Saccharomyces cerevisiae e glutazione

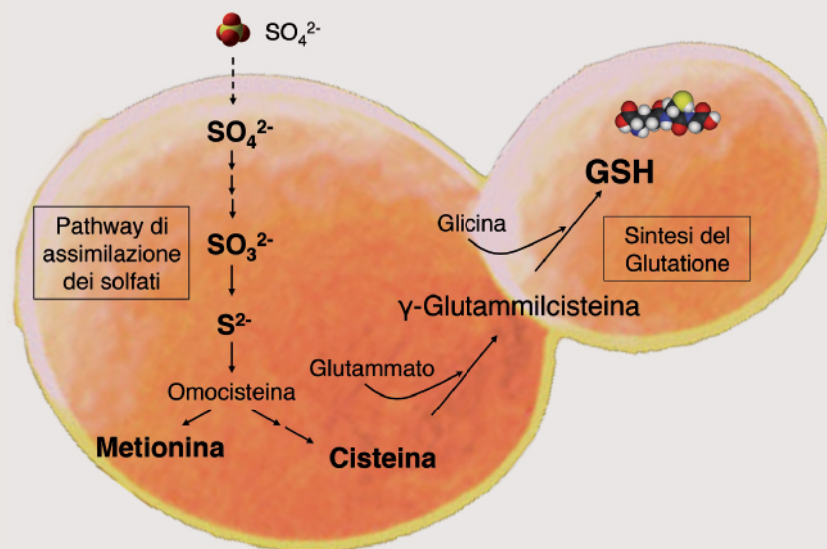
In *S. cerevisiae* il GSH è naturalmente presente in concentrazioni elevate, che vanno dallo 0,1% all'1% del peso secco cellulare, rappresentando più del 90% dei tioli a basso peso molecolare.

Il GSH ha un ruolo fondamentale per i lieviti stessi, in quanto coinvolto in molte funzioni cellulari essenziali come il controllo del potenziale ossidoriduttivo, l'azione antiossidante e la capacità detossificante di xenobiotici e metalli pesanti. Proprio in virtù delle sue molteplici implicazioni, modifiche nel metabolismo del GSH non sono semplici da ottenere, e gli effetti indiretti non sempre prevedibili in tutti i loro aspetti. Ad esempio, i lieviti capaci di apportare significativi aumenti nelle quantità finali di GSH durante la fermentazione di un determinato mosto spesso non confermano questa attitudine al variare del mezzo fermentativo. Le ragioni di questa variabilità, ancora oggi non del tutto chiare, sono legate con buona probabilità alla complessità metabolica del mosto e alle articolate interazioni che intercorrono tra

IL METABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI SOLFORATI E DEL GLUTATIONE

La biosintesi del GSH nei lieviti coinvolge il metabolismo dello zolfo e degli amminoacidi solforati metionina e cisteina. La *pathway* di assimilazione dei solfati prevede il loro ingresso nella cellula attraverso due specifiche permeasi di membrana (*SUL1* e *SUL2*) e l'attivazione attraverso due reazioni enzimatiche sequenziali: la prima consiste nella fosforilazione dei solfati con formazione di adenosina-5'-fosfosolfato (APS), la seconda in una ulteriore fosforilazione con formazione di

3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato (PAPS). I solfati attivati vengono ridotti a solfiti dall'enzima solfito reductasi e successivamente a solfuri. Infine, lo zolfo ridotto è inserito nella molecola omocisteina, coinvolta nella biosintesi della metionina e della cisteina. Quest'ultima forma insieme al glutammato, la γ -Glutamilmcisteina, ad opera dall'enzima Glutamato-Cisteina Ligasi (GSH1). La formazione finale del GSH avviene con l'aggiunta della glicina per mezzo della Glutazione Sintetasi (GSH2).



L'USO DEI LIEVITI SECCHI INATTIVI

Un discorso a parte merita l'uso di specifiche formulazioni di lieviti secchi inattivi (LSI), pratica largamente diffusa nell'industria enologica. Partendo dal presupposto che la regolamentazione vigente non permette di aggiungere direttamente glutazione prima dell'imbottigliamento, si è cercato di sfruttare al

meglio le matrici estratte dai lieviti secchi inattivi per arricchire i mosti in glutazione. Tuttavia, se da un lato l'uso di queste formulazioni si è dimostrato efficace in determinate condizioni, in altre non garantisce i risultati desiderati; ad esempio, posticipando l'applicazione dopo l'inizio della fermentazione i

risultati non sembrano apprezzabili. Inoltre, la quantità di GSH rilasciato e biodisponibile nel vino, così come la dose ottimale di LSI da usare e l'effetto di altri parametri - come la temperatura, SO₂ e pH - non sono ancora ben definiti, per cui il rischio di ottenere risultati scarsi ed inefficaci risulta ancora fondato.

composizione iniziale del mosto, componente genetica del ceppo di lievito e parametri ambientali quali pH, temperatura e pressione osmotica, che influenzano la crescita dei microrganismi.

Selezione di lieviti alto produttori di glutazione

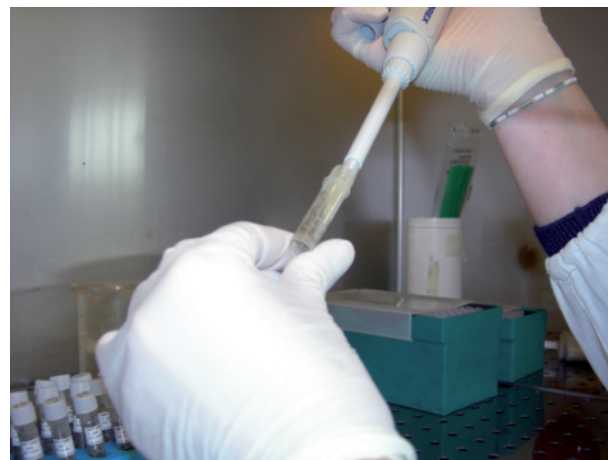
I primi approcci per una produzione di GSH su grande scala prevedevano la via chimica o enzimatica, tecniche successivamente abbandonate in favore della produzione per via fermentativa, decisamente più economica, che vede il coinvolgimento dei lieviti. Le metodiche oggi impiegate per la produzione massiva di cellule di lievito con aumentata produzione di GSH si basano sostanzialmente sull'ottimizzazione e sul controllo del processo fermentativo. Punto centrale è la scelta dei nutrienti e la loro concentrazione. Ad esempio, implementando la cisteina nel mezzo di crescita, la concentrazione di GSH aumenta ma un suo eccessivo incremento porta all'inibizione della crescita cellulare.

Diverse strategie di miglioramento genetico dei lieviti, che implicano le tecniche di mutagenesi e di ingegneria genetica, sono state ampiamente descritte per l'ottenimento di lieviti alto produttori di glutazione.

In particolare, le tecniche di mutagenesi puntano ad inserire mutazioni casuali nel genoma per poi selezionare i ceppi migliori mediante screening successivi.

Un approccio opposto è quello dell'ingegneria genetica, con cui grazie alle tecniche del DNA ricombinante si *over-esprimono* i geni chiave delle vie metaboliche di interesse. Nel caso del GSH, i risultati migliori sono stati ottenuti *over-esprimendo*, oltre ai due enzimi direttamente implicati nella biosintesi, anche gli enzimi chiave della *pathway* di assimilazione dei solfati, in virtù della stretta relazione tra queste due vie metaboliche.

La maggior parte delle strategie impiegate per le pro-



duzioni industriali non sono però applicabili all'industria enologica a causa di limitazioni giuridiche, culturali, scientifiche o di processo.

Le strategie di evoluzione adattativa, invece, sono ampiamente utilizzate per il miglioramento dei lieviti enologici, riscuotendo anche il consenso dei consumatori, dato che non portano alla produzione di organismi geneticamente modificati. Alcuni esempi delle caratteristiche di interesse enologico ottenute con queste strategie riguardano la produzione di ceppi di *S. cerevisiae* alto produttori di glicerolo o di ceppi con un accresciuta *pathway* dei pentosi fosfati, a vantaggio della riduzione dei livelli di acetato, delle prestazioni fermentative e della sintesi di prodotti aromatici.

I vantaggi delle strategie di evoluzione adattativa sono quelli di non introdurre geni ricombinanti estranei nel genoma dei microrganismi e di non richiedere una preventiva conoscenza dei geni coinvolti nell'espressione dei fenotipi desiderati. Infatti, sottoponendo i microrganismi a colture seriali o continue per diverse generazioni, in presenza di una specifica pressione selettiva, si selezionano i ceppi evoluti esprimenti il carattere d'interesse. Tuttavia, poiché lo screening dei microrganismi evoluti richiede necessariamente l'espressione di fenotipi selezionabili, ossia facilmente riconoscibili, tali strategie non sono applicabili per l'ottenimento di caratteristiche enologiche legate a variazioni e ricombinazioni genetiche non direttamente selezionabili. Esempi specifici di tali limiti riguardano l'ottenimento di ceppi alto produttori di GSH, ceppi con attività β -glicosidasi o con alta capacità di produrre composti sensorialmente attivi, per i quali ogni singola variante ottenuta mediante randomizzazione deve essere testata individualmente per il fenotipo di interesse, con un dispendio di tempo consistente.

Ciò nonostante questo limite è superabile individuando, nella *pathway* 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. Questa strategia *evolution-based* è stata recentemente messa a punto e applicata per la selezione di ceppi di lievito basso produttori di solfiti e solfuri. La strategia descritta si basa sulla formazione di ricombinanti attraverso la riproduzione sessuale e sulla successiva individuazione dei ricombinanti di interesse attraverso uno screening rapido e altamente selettivo. In particolare, i metalli come il cromato e il molibdato, tossici per le cellule nella forma ionica esavalente, applicati come pressione selettiva, consentono di selezionare i ceppi evoluti con un metabolismo alterato relativamente alla *pathway* di assimilazione dei solfati e della biosintesi del GSH. Questi metalli, infatti, essendo strutturalmente analoghi del solfato, possono attraversare la cellula utilizzando le stesse specifiche permeasi di membrana e stimolare la produzione di GSH che, ricordiamolo, tra i suoi vari ruoli ha anche quello di intervenire attivamente nei processi di detossificazione della cellula. Il GSH prodotto viene principalmente concentrato nei mitocondri, dove svolge importanti azioni antiossidanti, ma è presente in quasi tutti i compartimenti cellulari, in particolar modo nel vacuolo, dove viene immagazzinato, se in eccesso, o inglobato in forma complessata a metalli pesanti o xenobiotici.

Nuovi ceppi con la strategia *evolution-based*

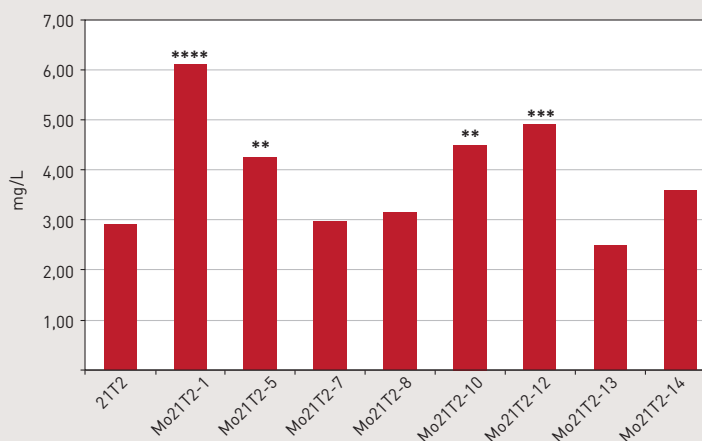
La strategia *evolution-based*, applicata recentemente nel nostro laboratorio con la finalità di ottenere ceppi alto produttori di GSH, ha dato risultati molto promettenti. Infatti, la sperimentazione effettuata, in via preliminare su campioni di mosto sintetico, ha permesso di

LE PERFORMANCE DEI NUOVI CEPPI

I 4 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* Mo21T2-1, Mo21T2-5, Mo21T2-10, Mo21T2-12 danno valori di GSH totale (sia ossidato che ridotto) significativamente

più elevati rispetto al ceppo parentale 21T2. Nel grafico sono riportati i valori di glutazione totale intra- ed extracellulare ottenuto su mosto sintetico con i ceppi

di lievito evoluti. Il ceppo Mo21T2-1, in particolare, ha mostrato una concentrazione di GSH circa doppia rispetto al ceppo 21T2.



**** Livello di significatività dello 0,01%, *** 0,1%, ** 1%.

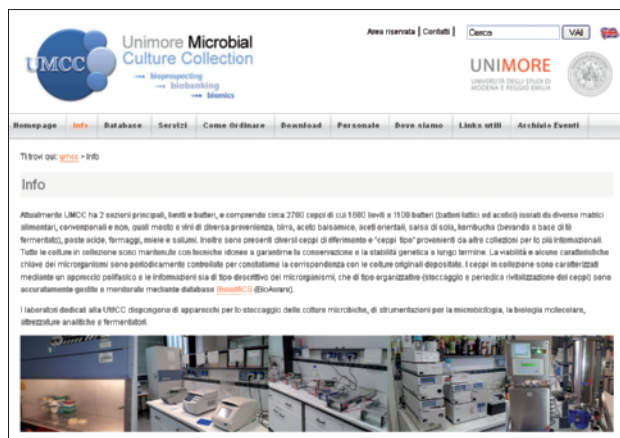
individuare, tra i ceppi evoluti resistenti a elevate concentrazioni di molibdato (Mo^{6+}), quelli migliorati per la formazione di GSH.

In particolare, 4 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* (Mo21T2-1, Mo21T2-5, Mo21T2-10, Mo21T2-12) hanno mostrato valori di GSH totale (sia ossidato che ridotto) significativamente più elevati rispetto al ceppo parentale 21T2. Questi ceppi selezionati sono stati depositati nella collezione microbica UNIMORE del Dipartimento di Scienze della Vita (Unimore Microbial Culture Collection –UMCC - website: www.umcc.unimore.it) e saranno oggetto di sperimentazione in cantina per verificare su larga scala gli effetti benefici dell'aumentato rilascio di GSH, sia relativamente alla prevenzione dell'imbrunimento dei vini bianchi, sia relativamente alla protezione dei composti aromatici. La valutazione degli andamenti fermentativi su mosti diversi, i risultati analitici del vino ottenuto e un'accurata analisi sensoriale consentiranno di completare e validare la procedura di selezione dei ceppi alto produttori di GSH.

www.vitevinoqualita.it/VGhPN

Ringraziamenti:

La ricerca qui presentata è stata svolta, in parte, con il contributo di AEB (Brescia).



© RIPRODUZIONE RISERVATA

