



Lieviti per vini spumanti:

strategie di evoluzione adattativa e di breeding per la selezione di starter ottimizzati

I vini spumanti occupano una posizione di tutto riguardo nel comparto vitivinicolo e la loro crescente popolarità tra i consumatori, sempre più attenti alla qualità dei prodotti, incentiva anche la ricerca verso la selezione di starter ottimizzati per il processo di spumantizzazione. La produzione di vino spumante in bottiglia o in autoclave è una pratica oramai consolidata anche a livello di piccole cantine. Tuttavia, questa pratica, se non eseguita in modo corretto, è causa di vari insuccessi. Tra gli effetti indesiderati più comuni si possono considerare: 1) esplosione delle bottiglie dovuta a eccessiva pressione, 2) vino con retrogusto amaro e con troppo sedimento, 3) vino che rimane velato in bottiglia, 4) vino che non rifermenta, 5) odori di ridotto. Per ovviare a questi problemi e produrre un buon vino spumante, è necessario conoscere bene i meccanismi della fermentazione e prestare molta attenzione a tutte le fasi di produzione, dalla vinificazione delle uve alla scelta del metodo di spumantizzazione, ma soprattutto occorre scegliere un'ideale coltura starter. Impiegare lieviti non idonei può compromettere il prodotto finale, rallentando o bloccando in modo anormale il processo. La rifermentazione, in bottiglia o autoclave è, infatti, un processo piuttosto limitante per i lieviti, dato che sono sottoposti a condizioni stressanti quali: un pH compreso tra 2.8 e 3.5, una concentrazione di etanolo dell'11% - 12%, un'elevata pressione parziale di CO₂ (fino a 7-8 atm), un'alta concentrazione di acidi organici, un'alta concentrazione di anidride solforosa pari a circa 50-80 mg/L e basse temperature di fermenta-

zione, comprese tra i 10 e 15 °C. Inoltre, la mancanza di ossigeno impedisce la sintesi di steroli e acidi grassi insaturi, alterando la funzionalità della membrana cellulare dei lieviti. Evidenze scientifiche confermano gli effetti indesiderati sui lieviti, in termini di riduzione dell'attività e del vigore fermentativo, dovuti all'accumulo della CO₂ durante il processo.

Per comprendere meglio tali effetti, occorre prendere in considerazione l'azione degli acidi organici deboli, i quali influenzano il metabolismo della cellula secondo modalità analoghe a quelle dell'anidride carbonica. La CO₂ infatti, seppur in basse concentrazioni, forma acido carbonico, ossia un acido debole; se si valutano le costanti di dissociazione acida dell'acido carbonico e di altri acidi organici deboli, si può notare che hanno all'incirca valori analoghi, sarà quindi ragionevolmente simile lo stato dissociativo di queste molecole nelle matrici intra ed extra cellulari. Gli acidi organici deboli a un valore di pH intorno a 3-3,5, si trovano in forma indissociata XCOOH, in questo stato riescono a entrare liberamente all'interno della cellula dove il pH è di 7,4.

A questo valore dissociano nell'anione carbossilico XCOO⁻ e ione H⁺. Gli anioni carbossilici non riescono a uscire dalla membrana passivamente e vanno accumulandosi all'interno del citoplasma. Questo accumulo induce diverse risposte cellulari allo stress e, se non controllato, può indurre anche l'apoptosi.

Ne consegue che una potenziale selezione di colture di lievito idonee alla spumantizzazione, può essere ottenuta con

Codice UMCC	Specie	Etanolo 12%		Etanolo 15%		Acido acetico 50 mM	Acido acetico 75 mM	H ₂ S (Biggy agar)
		15 °C	27 °C	15 °C	27 °C	27 °C	27 °C	27 °C
UMCC 2949	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	media
UMCC 2633	<i>S. uvarum</i>	+	+	-	-	+	-	bassa
UMCC 3008	<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>	+	+	+	+	+	-	bassa

Tabella 1 - Screening di resistenza all'etanolo, effettuato su terreno YPDA addizionato di etanolo 12% o 15% (incubazione a 15 °C e 27 °C) e all'acido acetico, effettuato su terreno minimo Yeast Nitrogen Base (YNB) addizionato di acido acetico 50mM o 75mM, inoltre, valutazione qualitativa della produzione di H₂S su terreno BIGGY agar, dopo 6 giorni di incubazione delle piastre.

strategie di evoluzione adattativa, utilizzando acidi organici deboli, quali diverse concentrazioni di acido acetico, acido sorbico o acido benzoico, come fattore di stress. In generale gli approcci basati sui principi evolutivi risultano essere molto efficaci per ottenere ceppi con fenotipi specifici richiesti in campo industriale. Il punto chiave per l'approccio di adattamento evolutivo è la variabilità genetica originata dai processi di ricombinazione, che aumentano la probabilità di selezionare i ceppi migliorati per le caratteristiche di interesse.

In particolar modo, i processi di ricombinazione meiotica risultano particolarmente efficaci nel caso dei ceppi eterozigoti, poiché il rimescolamento dei geni consente di ottenere un diverso set di cellule aploidi; in pratica si sfrutta il *crossing over* come fonte di nuova variabilità genetica. Tale approccio può essere applicato anche nei programmi di breeding per ottenere ibridi sia intra che interspecifici. In un primo lavoro svolto dal gruppo di ricerca della Unimore Microbial Culture Collection (UMCC), l'approccio evolutivo, precedentemente descritto, ha consentito di ottenere un nuovo ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, depositato con il codice UMCC 2949, avente le caratteristiche fenotipiche di interesse quali, la resistenza agli acidi organici deboli. Al fine di validare l'ipotesi sperimentale della corrispondenza con la resistenza anche a elevate concentrazioni di CO₂, sono state effettuate delle prove di spumantizzazione in prototipi di autoclave, in cui il ceppo selezionato è risultato performante. Per migliorare ulteriormente il ceppo UMCC 2949, conferendogli anche una maggiore resistenza alle basse temperature, è stata successivamente applicata la strategia di breeding interspecifico, incrociando il ceppo di *S. cerevisiae* con il ceppo UMCC 2633 della specie *S. uvarum*. Le colonie derivanti dai diversi incroci

tra le spore dei due ceppi parentali sono state caratterizzate a livello molecolare, mediante "colony PCR" e analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) della regione ITS-5,8S del rRNA, al fine di confermare la formazione degli ibridi (Figura 1). Successivamente l'ibrido selezionato, denominato UMCC 3008, è stato testato su terreni selettivi per verificare la tolleranza all'etanolo 12% e 15%, in due diverse condizioni di temperatura, rispettivamente 15 e 27 °C, e la resistenza all'acido acetico alle concentrazioni di 50 mM e 75 mM. Le performance fermentative dell'ibrido UMCC 3008 sono state preliminarmente valutate in test di microvinificazioni effettuati in beute con vino base addizionato di saccarosio alla concentrazione finale di 30g/L. Infine, è stato effettuato un test su terreno di crescita BIGGY agar per una stima qualitativa della produzione di idrogeno solforato.

I risultati ottenuti dagli screening fenotipici sono riportati nella Tabella 1. Dall'osservazione dei dati si evince che l'ibrido è tollerante all'etanolo nelle condizioni testate, è resistente a concentrazioni di acido acetico fino a 50mM e, inoltre, è un basso produttore di H₂S.

L'ibrido UMCC 3008 oltre alla buona tolleranza alle pressioni selettive applicate negli screening fenotipici ha mostrato anche un'ottima fitness fermentativa nelle prove di microvinificazione. Pertanto, si ritiene che tale ibrido sia un ottimo candidato come coltura starter da validare mediante ulteriori sperimentazioni al fine di confermare le sue performance fermentative e la sua potenziale attitudine alla produzione di vini spumanti.

Si ringrazia la ditta AEB Group (Brescia) che ha parzialmente finanziato la ricerca e i Dottori Carlo Montanini e Tommaso Bonciani per la collaborazione.

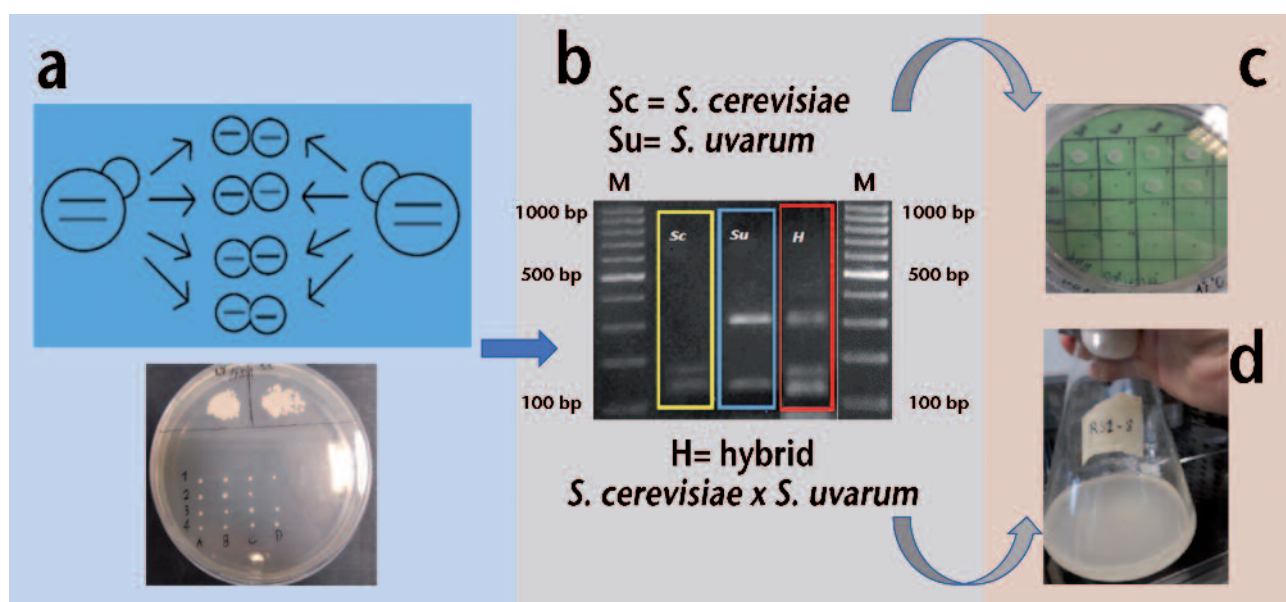


Figura 1 - Rappresentazione schematica della strategia di breeding interspecifico: a) incrocio spora-spora diretto tra il ceppo di *S. cerevisiae* e quello di *S. uvarum*; b) caratterizzazione molecolare delle colture derivate dagli incroci; c) screening fenotipici; d) test di fermentazione per la valutazione delle performance dell'ibrido.