



## APPROCCI BASATI SULL'EVOLUZIONE ADATTATIVA PER LA SELEZIONE DI LIEVITI DI INTERESSE ENOLOGICO

L'uso delle colture starter in enologia è da tempo una pratica consolidata, ciò nonostante, il mercato enologico è tutt'altro che uniformato, al contrario, è ampiamente diversificato e continuamente alla ricerca di nuovi lieviti sempre più performanti e dotati di specifici caratteri di interesse.

Gli sviluppi biotecnologici applicati al contesto enologico non possono prescindere dal supporto di collezioni microbiche ben caratterizzate, che operano secondo specifici standard riconosciuti a livello internazionale. Di fondamentale importanza è l'adeguata conservazione dei ceppi e il mantenimento della loro stabilità genetica, tuttavia, la disponibilità di database accurati che detengono informazioni dettagliate sulle colture microbiche preservate, costituisce un prerequisito altrettanto indispensabile. Ed è grazie a queste informazioni che è possibile sviluppare modelli matematici predittivi del *fenoma* capaci di descrivere il metabolismo dei lieviti e predirne i cambiamenti in risposta a perturbazioni nutrizionali o modificazioni genetiche, consentendo così di definire anche le strategie più idonee per ottenere in breve tempo i nuovi ceppi con fenotipi migliorati. Le collezioni microbiche sono spesso altamente specifiche per la tipologia del materiale biologico

conservato. Tra queste non mancano quelle che preservano lieviti di interesse enologico, che costituiscono, pertanto, un riferimento indispensabile per lo sviluppo di nuove colture starter. Nel contesto italiano, un esempio è dato dalla UNIMORE Microbial Culture Collection (UMCC -www.umcc.unimore.it) dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, che preserva biorisorse utili per la selezione e l'implementazione di ceppi dotati di caratteristiche innovative atte all'implementazione in nuovi processi tecnologici.

Le caratteristiche principali richieste ad un ceppo di lievito da impiegare in vinificazione sono sensibilmente cambiate nel tempo. Oltre alle caratteristiche essenziali richieste ad un buon ceppo enologico, oggi si richiede che sia dotato di proprietà più specifiche, in sintonia con le moderne tecnologie e con le richieste dei consumatori che, oltre ad apprezzare vini di qualità con proprietà sensoriali definite, sono sempre più attenti anche agli aspetti salutistici.

Questo spiega, ad esempio, il crescente interesse per i vini a basso contenuto alcolico o senza solfiti aggiunti; quest'ultimi, come ben noto, possono essere causa di allergie anche gravi nei soggetti più sensibili.

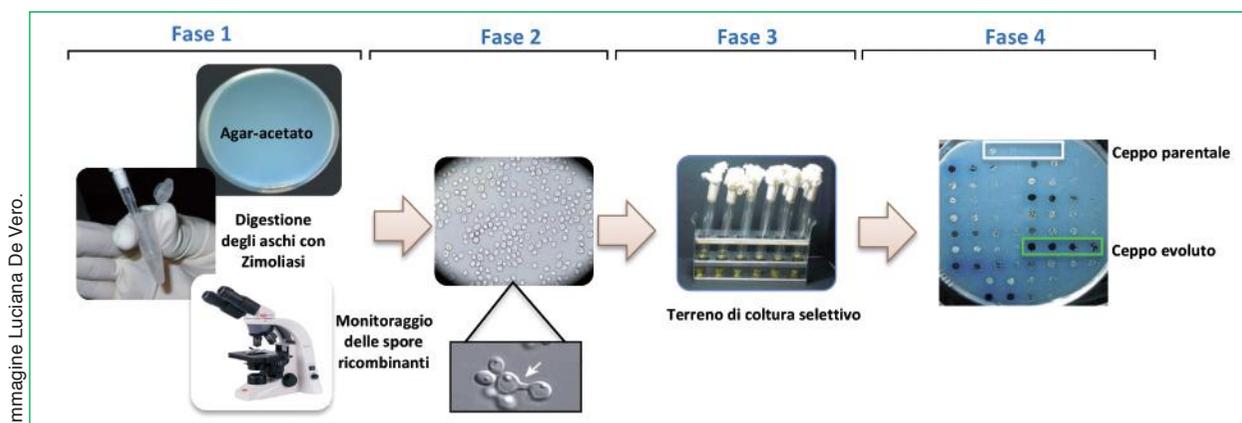


Immagine Luciana De Vero.

Figura 1 - Schema della strategia "evolution-based". Fase 1: Induzione dei processi meiotici in terreno minimo con agar-acetato e successiva digestione degli aschi. Fase 2: Randomizzazione del pool genico mediante ricombinazione sessuale delle spore e/o eventi mutazionali. Fase 3: Applicazione di una specifica pressione selettiva ai ceppi ricombinanti distribuiti in modo random in provette con terreno selettivo. Fase 4: Utilizzo di un fenotipo selezionabile per individuare i ceppi evoluti.

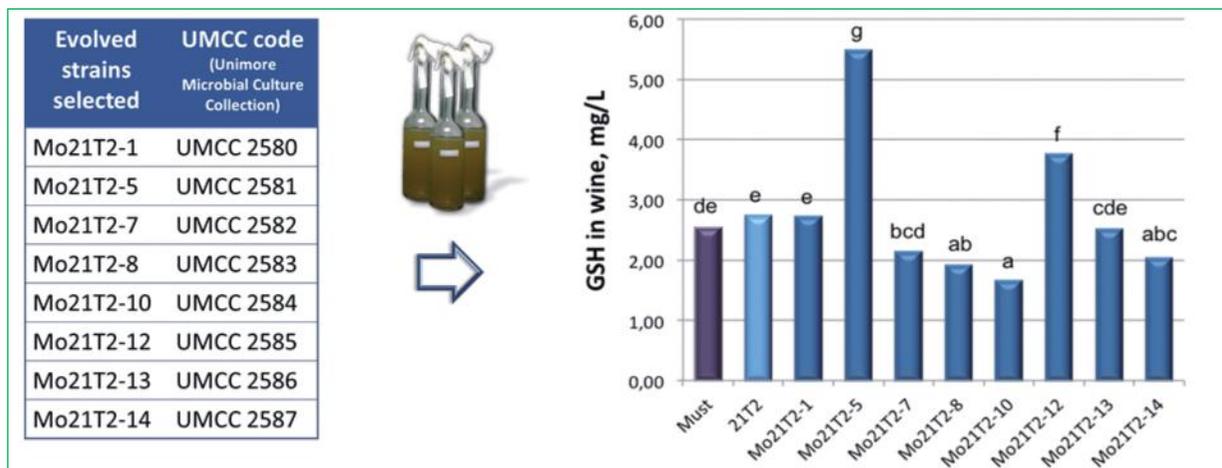


Immagine Luciana De Vero.

Figura 2 - Ceppi evoluti di *Saccharomyces cerevisiae* alto produttori di glutatione (GSH) ottenuti mediante "evolution-based strategy". Il grafico riporta il contenuto di GSH determinato al termine di un processo di microvinificazione di mosto Trebbiano. Il ceppo 21T2 rappresenta il ceppo parentale da cui sono derivati gli evoluti. Le lettere diverse indicano valori significativamente diversi (test di Tukey,  $P < 0,05$ ).

Pertanto, il miglioramento genetico e la selezione di nuovi ceppi di lievito devono essere improntati sulle nuove richieste del mercato e sul consenso dei consumatori. Tra le strategie di miglioramento utilizzate con successo negli ultimi anni, quelle basate sull'evoluzione adattativa hanno il vantaggio 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.

Le strategie di evoluzione adattativa, nella loro accezione più ampia rappresentano una mimica della selezione naturale. Infatti, in determinate condizioni di stress, la selezione agisce sulla formazione di cellule varianti dovute ad eventi mutazionali casuali, che risultano vantaggiosi per le cellule stesse. Nello specifico, i ceppi evoluti esprimono il carattere d'interesse vengono selezionati dopo essere stati sottoposti a colture seriali o continue per diverse generazioni, in presenza di una specifica pressione selettiva. Il collo di bottiglia di queste strategie è che possono richiedere tempi e screening lunghi e dispendiosi, soprattutto nel caso in cui non fosse possibile selezionare direttamente il fenotipo di interesse. D'altra parte, molte caratteristiche di interesse enologico tra cui, ad esempio, la produzione di composti sensorialmente favorevoli, sono legate a variazioni e ricombinazioni genetiche che non esprimono fenotipi direttamente selezionabili, su cui non è possibile operare approcci di evoluzione adattativa di tipo diretto.

Per superare questo limite, il nostro gruppo di ricerca UMCC, ha messo a punto una strategia definita *evolution-based*, i cui punti di forza sono la randomizzazione del pool genico dei ceppi di partenza sulla base dell'induzione dei processi meiotici, la formazione di ricombinanti casuali e l'utilizzo di un fenotipo selezionabile per individuare i ceppi evoluti di interesse (Figura 1). Quindi anche quando

il fenotipo non è direttamente selezionabile, si cerca di individuare nella *pathway* biosintetica del metabolita di interesse, lo *step* in cui applicare la pressione selettiva in modo da selezionare i ceppi evoluti potenzialmente in grado di esprimere il carattere di interesse.

Recentemente con questa strategia sono stati ottenuti ceppi di *S. cerevisiae* alto produttori di glutatione (GSH), sottoponendo il ceppo 21T2 a elevate concentrazioni di molibdato che è tossico per la cellula nella sua forma ionica esavalente. Il molibdato, infatti, essendo dal punto di vista strutturale analogo del solfato, attraversa la cellula, utilizzando le stesse permeasi di membrana, e attiva la via metabolica di assimilazione dei solfati fino a indurre una maggior produzione di GSH che, tra i suoi molteplici ruoli, ha anche quello di intervenire nei processi di detossificazione della cellula.

In tal modo la selezione di un carattere non direttamente selezionabile, quale la produzione di GSH, viene bypassata sfruttando la resistenza al molibdato quale metodo di screening rapido dei ceppi con un metabolismo alterato relativamente alla via di assimilazione dei solfati e della biosintesi del GSH. I ceppi selezionati per la produzione di GSH (Figura 2) sono attualmente depositati presso la collezione UMCC. Tali ceppi sono stati testati in prove di microvinificazione in mosto d'uva Trebbiano e a fine fermentazione i campioni fermentati sono stati analizzati per valutare il contenuto di GSH presente.

I risultati ottenuti hanno evidenziato l'abilità dei ceppi evoluti Mo21T2-5 (=UMCC 2581) e Mo21T2-12 (=UMCC 2585) nel produrre livelli più alti di glutatione extracellulare rispetto al ceppo parentale. In particolare l'incremento di GSH osservato con il ceppo Mo21T2-5 è stato del 100% rispetto al parentale e del 120% rispetto al mosto di partenza, mentre con il ceppo Mo21T2-12 è stato rispettivamente del 36% e del 50%.