

NUOVI APPROCCI TECNOLOGICI APPLICATI ALLA SELEZIONE DEI LIEVITI

Guido Parodi

L'uso dei lieviti selezionati sotto forma di lieviti secchi attivi non è certamente una novità per il settore enologico, anzi potremmo dire che ormai rappresenta la regola per la maggior parte dei produttori, o per lo meno per tutti coloro che, in questa biotecnologia, hanno visto il modo per eliminare difetti dai vini e ridurre molti rischi nella vinificazione. Ciò non toglie che gli studi di genetica e fisiologia su *Saccharomyces* siano sempre in pieno fermento con lo scopo di ampliarne le conoscenze e rendere più performanti i processi di selezione.

I motivi che hanno inizialmente convinto all'applicazione di questa biotecnologia in cantina sono assai semplici e possono essere così brevemente riassunti:

- assicurare un rapido avvio della fermentazione,
- averne un maggior controllo,
- assicurare il completo esaurimento degli zuccheri,
- limitare la produzione di sottoprodotti indesiderati.

In seguito ci si sono posti altri e più ambiziosi obiettivi che hanno portato ad un notevole miglioramento e specializzazione delle prestazioni enologiche dei lieviti selezionati.

Come spesso accade mano a mano che una tecnologia diventa di uso comune e ci si prende confidenza sono gli stessi operatori che iniziano a chiedere di più, incitando gli addetti ai lavori nella ricerca e messa a punto di ceppi con prestazioni particolari, superiori o in grado di risolvere problematiche specifiche.

Qui entrano in gioco le tecniche di selezione.

Selezione massale

Inizialmente si è lavorato con la selezione massale. In questo caso si parte da popolazioni naturali di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* che si sviluppano in mosti in **fermentazione spontanea** e dunque in grado di condurre la fermentazione alcolica. Si separano i ceppi più interessanti con i quali si costituiscono collezioni ed in queste si vanno succes-

sivamente ad individuare, facendo un enorme lavoro di coltura su piastra e microvinificazioni, i ceppi con le caratteristiche tecnologiche, enologiche e impatto organolettico più interessanti. Tanto più ampia è la base di partenza, cioè il numero di ceppi messi in collezione, con tutta la mole di lavoro che ne deriva, tanto maggiore è la probabilità di trovare qualcosa di veramente interessante, che viene infine validata con diverse prove di inoculo e fermentazione condotte in scala di cantina.

Miglioramento genetico

Nell'evolversi dell'enologia, delle tecnologie e delle esigenze si è rivolta l'attenzione verso la ricerca mirata al miglioramento genetico. Preso atto che ad oggi in enologia non sono accettati ceppi di lievito modificati geneticamente (**OGM**), quelli ottenuti con la tecnica del DNA ricombinante ed in grado ad esempio di compiere oltre la fermentazione alcolica anche quella malo-lattica, di aumentare molto la liberazione di terpeni perché dotati di forte **attività beta glicosidasi**, o di incrementare enormemente la produzione di esteri o glicerolo, abbassando la resa in alcool, sono rimasti alla stregua di esperimenti di laboratorio e lì confinati.

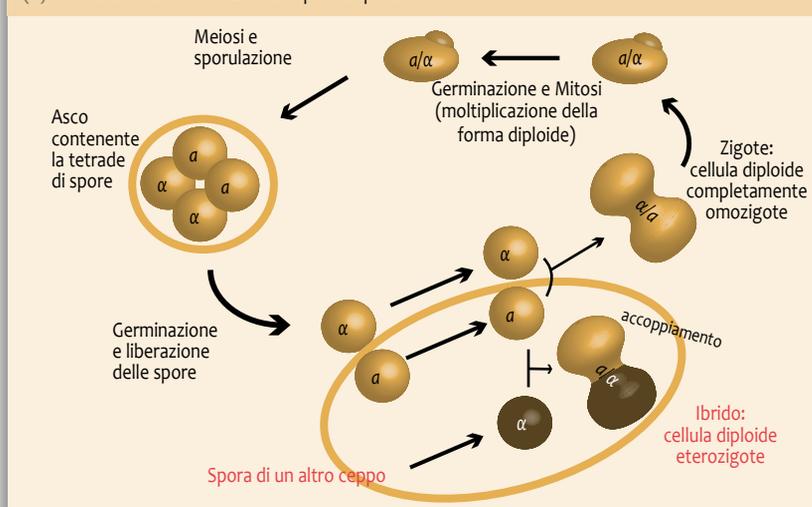
Per contro metodologie meno invasive e più tradizionali come l'induzione

di **mutazioni** e l'incrocio, intra o interspecifico, hanno avuto un certo sviluppo ed applicazione.

Per mutazione si intende ogni modificazione stabile ed ereditabile del patrimonio genetico, può essere naturale, ossia avvenire spontaneamente, oppure indotta. La prima avviene in natura ed è alla base della variabilità genetica e dell'evoluzione, ma ha solitamente una frequenza assai bassa, assolutamente non compatibile con i tempi della ricerca; la seconda può essere indotta in laboratorio con mezzi fisici o chimici. Pur avendo diverse limitazioni e controindicazioni (non è mirata, può indurre mutazioni silenziose, non riscontrabili sul fenotipo, o mutazione non desiderata con peggioramento di caratteri), introduce sicuramente nuova variabilità genetica negli individui, per cui operando successivamente un'attenta selezione sulle popolazioni che si sviluppano dalla progenie dei ceppi trattati, può risultare utile all'ottenimento di nuovi ceppi, con nuove caratteristiche o espressioni geniche migliorate.

È vero che normalmente il *Saccharomyces* si moltiplica per **gemmazione**, via vegetativa asessuata, ma in particolari condizioni può **sporificare**. In questo processo da una cellula si genera un asco contenente quattro spore aploidi, frutto di meiosi, che rappresentano i gameti, si passa cioè alla riproduzione

(A) - Schema del metodo d'incrocio spora a spora



sessuata. In questo contesto mettendo in contatto spore di segno sessuale opposto, e provenienti da ceppi diversi, si ottiene un riassortimento dei caratteri con generazione di individui aventi caratteristiche differenti da quelle dei due ceppi parentali (A).

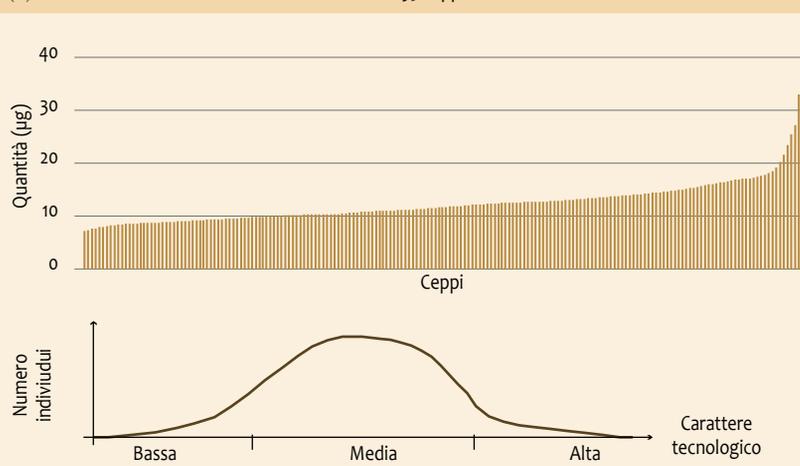
Nel caso di incrocio si può parlare di incrocio tra spore provenienti da cellule differenti ma della stessa specie (*S. cerevisiae* x *S. cerevisiae*) o **incrocio tra** spore provenienti da **lieviti di due specie differenti** (*S. cerevisiae* x *S. uvarum* o *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, ecc). In entrambi i casi si ottiene una ricombinazione genetica che porta alla produzione di cellule con nuove caratteristiche, mutuate dai parentali e riassortite, sulle quali diviene interessante operare un lavoro di selezione clonale per isolare individui che esprimono nuovi fenotipi di interesse enologico, dati dalla combinazione in un unico individuo di caratteri ereditari interessanti.

Importante sottolineare che l'ibridazione tra microrganismi non richiede nel modo più assoluto manipolazione genetica, pertanto porta alla produzione di lieviti del tutto naturali, non certo OGM.

Screening

Oggi, acquisite queste pratiche già dominio di molti laboratori, il punto chiave per rendere veramente performanti le tecniche di miglioramento e selezione è la messa a punto di adeguati metodi di screening, in grado di individuare con una certa rapidità profili genetici corrispondenti a fenotipi desiderati, in modo da facilitare l'isolamento degli individui con fenotipo migliorato all'interno di una nuova popolazione ricombinante. Tutto questo tenendo conto che l'ulteriore grande difficoltà è rappresentata dal fatto che molti dei caratteri di interesse enologico, quali la vigoria fermentativa, la tolleranza all'alcool, la produzione di acidità volatile, la produzione di aromi fermentativi, ecc., sono caratteri definiti di tipo quantitativo. Ciò significa che sono frutto di un **determinismo genetico complesso**, controllato da più loci, si parla di **QTL** (Quantitative Trait Locus) tratto di DNA associato ad un particolare carattere quantitativo che è l'espressione della somma di più geni che possono trovarsi anche ad una certa distanza tra loro. Maggiore è il numero di geni coinvolti

(B) - Produzione di acetato di isoamile misurata su 195 ceppi in fermentazione



nella determinazione di uno stesso carattere fenotipico, minore è l'effetto di ognuno e maggiore la difficoltà a selezionare individui con una elevata espressione dello stesso.

Sono caratteri che tipicamente variano secondo una scala continua e volendo misurare uno di questi caratteri in una popolazione di individui per poi andare a rappresentare la frequenza e l'intensità su un piano cartesiano, si ottiene una tipica distribuzione di tipo gaussiano (B).

In questo contesto e con il fine che ci siamo proposti, ossia la messa a punto di adeguati metodi di screening veloce, di grande aiuto risultano le nuove tecnologie genomiche come i chip a DNA (o DNA-microarray) ed il sequenziamento genico che hanno in parte permesso di correlare geni ed espressione del fenotipo inteso come l'insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali di un organismo determinate dalla sua costituzione genetica.

Una volta che si conoscono i caratteri fenotipici e genotipici specifici di un ceppo con particolari studi statistici di correlazione è possibile identificare le regioni genetiche responsabili delle differenze fenotipiche. In questo caso si parla di **genetica quantitativa** e di mappatura QTL. Questi metodi permettono di prevedere, già dall'analisi del genotipo, quale sarà l'espressione fenotipica di un ceppo di lievito, ancor prima di dover ricorrere alla messa in opera di innumerevoli prove di fermentazione per riuscire ad isolare, in una popolazione naturale o frutto di ricombinazione per incrocio, gli individui dotati dei caratteri obiettivo della selezione.

Applicazioni pratiche

L'applicazione di queste metodologie di screening in abbinamento alla tecnica del breeding ha permesso a diversi ricercatori di ottenere ceppi di lievito ad uso enologico con prestazioni fermentative e caratteri secondari di estremo interesse. Sono ad esempio oggi disponibili ceppi di lievito ad elevata capacità di colonizzazione del substrato anche a basse temperature, abbinata alle buone prestazioni fermentative ed elevata capacità di rivelazione aromatica, oppure ceppi ad elevate prestazioni fermentative abbinata alle buone prestazioni aromatiche ed alla bassa produzione di SO₂, H₂S e prodotti combinanti la solforosa.

L'utilizzo di questi ceppi, frutto delle più recenti tecniche di selezione, che spesso fanno aborrire chi predica la naturalità dei vini, in realtà rappresentano la via più naturale e biologica alla corretta e razionale produzione di vino. Il corretto uso dei lieviti selezionati, seguito magari anche da quello dei batteri malolattici, si è infatti dimostrato essere il migliore strumento per controllare popolazioni indigene di microrganismi non del tutto adeguati ad una produzione enologica di qualità, come è il caso del *Brettanomyces*. Inoltre in tutti i contesti e protocolli di vinificazione volti alla limitazione o all'azzeramento dell'impiego di SO₂ non si può nel modo più assoluto prescindere dall'impiego di lieviti selezionati, meglio ancora se di ultima generazione e selezionati anche per la bassa produzione di SO₂ e di prodotti combinanti la stessa.