

DAI PRECURSORI AGLI AROMI: IL RUOLO DEI LIEVITI

Alexandra Bisotto, Anne Julien-Ortiz, Peggy Rigou, Jean-Michel Salmon, Remy Schneider

Come noto, durante la fermentazione alcolica i lieviti trasformano alcuni **precursori di aromi** in composti aromatici. Risulta ormai acquisito il fatto che alcuni terpeni delle uve, come linalolo, geraniolo, nerolo, citronellolo, α -terpineolo e ossido di linalolo, legati a diglicosidi, contribuiscano in modo significativo al bouquet del vino.

L'idrolisi enzimatica di questi composti richiede una reazione sequenziale: dapprima una α -L ramnosidasi o una β -D-apiofuranosidasi taglia il legame glicosidico in posizione 1-6; poi i composti aromatici vengono liberati dai monoglicosidi dall'azione di una β -glucosidasi. La rottura dei legami può avvenire anche durante l'invecchiamento, in condizioni blandamente acide.

Il contesto

Nel 2011 Gamero *et al.* hanno indagato il profilo terpenico di vini Moscato ottenuti con lieviti *Saccharomyces* o **ibridi**, non evidenziando alcuna relazione tra tale profilo e l'attività β -D-glucosidasi. Il rilascio o la formazione di composti aromatici dai precursori è risultato essere fortemente legato all'ibrido utilizzato. Per esempio, l'ibrido triplo *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii*, in particolare, e secondariamente l'ibrido *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, si sono dimostrati molto efficienti nella produzione della maggior parte dei terpenoli varietali.

Nel loro insieme, questi risultati indicano che ci sono due principali fattori che limitano il completo rilascio di monoterpenoli da composti glicosidici da parte dei lieviti.

Il primo collo di bottiglia si presenta con il **trasporto dei precursori** all'interno della cellula di lievito. I precursori glicosidici sono molecole di grandi dimensioni che non possono passare attraverso la membrana plasmatica per semplice diffusione in cellule vitali intatte.

Inoltre alcuni Autori indicano come l'attività β -D-glucosidasi si trovi nello spazio periplasmatico della cellula di lievito e che presumibilmente essa venga liberata durante l'autolisi dei lieviti. In aggiunta, è stato anche trovato che fecce da diversi ceppi di lievito possono presentare capacità leggermente differenti di rilasciare composti volatili derivati da precursori glicosidici.

Il secondo punto verte sull'attività degli enzimi stessi. Lavori già pubblicati hanno stabilito, testando cellule intere, che solo le specie non-*Saccharomyces* mostrano **attività β -glucosidasi**. All'opposto, altre ricerche hanno evidenziato che cellule intere di *Saccharomyces cerevisiae* possono mostrare una debole attività β -glucosidasi. Lo scopo del presente lavoro è stabilire un metodo generale per valutare la capacità intrinseca dei lieviti di rilasciare aromi da precursori glicosilati. A questo scopo è stata utilizzata la tecnica della permeabilizzazione delle cellule, per indurre nelle membrane la formazione di pori tali da permettere ai precursori di entrare liberamente nelle cellule, dove può aver luogo la liberazione enzimatica dei terpeni.

Le tecniche utilizzate

Le prove sono state eseguite su uve di Moscato di Frontignan raccolte

(A) - Lieviti utilizzati nella sperimentazione

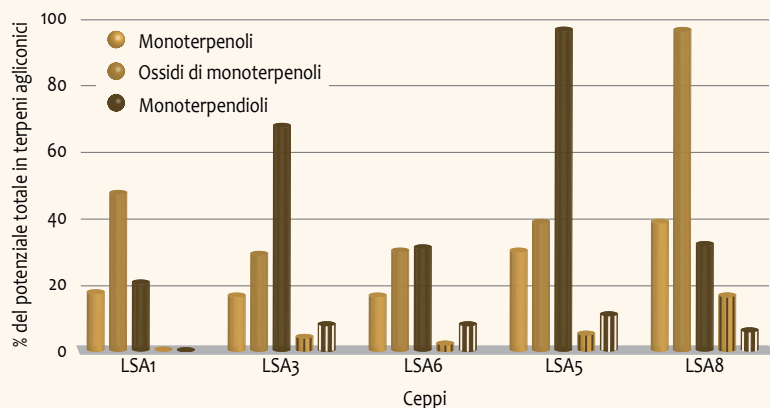
Tipo di lievito	Ceppo	Nome nel testo
<i>S. cerevisiae</i>	LSA1	LSA1
<i>S. cerevisiae</i>	Lalvin ICV K1	LSA3
<i>S. cerevisiae</i>	Uvaferm DV10	LSA4
<i>S. cerevisiae</i>	Uvaferm CEG	LSA5
<i>S. cerevisiae</i>	Lalvin EC-1118	LSA6
Ibrido <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. uvarum</i>	LSA2	LSA2
Non- <i>Saccharomyces</i> (<i>Torulaspota delbrueckii</i> TD291)	Biodiva	LSA7
Non- <i>Saccharomyces</i> (<i>Metschnikowia pulcherrima</i> MP346)	Flavia	LSA8

te a 17°Brix nel vigneto sperimentale dell'Inra Pech-Rouge (Gruissan, France), ammostate e trattate dapprima per la rimozione della frazione libera dei terpeni presenti, con successivo recupero della frazione legata a molecole glicosidiche. Tale frazione è stata successivamente sottoposta, in parte, a trattamento enzimatico di idrolisi e in parte messa a contatto con cellule di lievito precedentemente permeabilizzate (con il metodo proposto da Salmon, 1984). Il risultato dell'idrolisi enzimatica e della reazione a contatto con cellule permeabilizzate è stato sottoposto ad analisi tramite gascromatografia GC/MS. Tutti i ceppi di lievito testati erano LSA forniti dall'azienda Lallemant Inc (A).

(B) - Terpeni liberati dalla frazione glicosidica di un mosto da uve Moscato da cellule permeabilizzate (CP) dopo 16 ore di incubazione a 40 °C e da cellule intere vitali (CIV) dopo 36 ore di fermentazione a 28 °C. I risultati sono espressi come percentuale del potenziale totale in terpeni agliconici determinato dopo idrolisi con un preparato ad attività enzimatica β -D-glucosidasi. NR: non rilevabile.

Composti liberati dai lieviti	Ceppo di lievito											
	LSA1		LSA3		LSA6		LSA5		LSA2		LSA8	
	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV	CP	CIV
linalolo	4,71	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	49,7	NR
otrienolo	25,0	NR	87,5	23,0	61,3	3,5	36,5	16,7	NR	NR	9,1	0,7
α -terpineolo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	82,9	NR
nerolo	26,3	NR	NR	NR	8,2	NR	26,6	NR	NR	NR	40,1	NR
geraniolo	20,4	NR	NR	NR	8,9	NR	35,0	NR	NR	NR	39,9	NR
linalolo idrato	28,0	NR	69,2	NR	48,2	NR	100,0	NR	NR	NR	25,5	NR
z-8-idrssiilinalolo	72,3	NR	41,0	NR	48,2	NR	59,0	NR	NR	NR	94,5	NR
Ox di transpirano linalolo	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	100,0	NR
3,6 terpendiolo	NR	NR	100,0	NR	52,6	NR	100,0	NR	NR	NR	100,0	NR
3,7 terpendiolo	26,4	NR	53,0	8,7	35,2	7,7	100,0	11,2	NR	NR	11,6	1,0
3,8 terpendiolo	NR	NR	100,0	NR	NR	NR	93,1	NR	NR	NR	99,5	NR

(C) - Monoterpenoli, ossidi di monoterpenoli e monoterpendioli rilasciati dalle cellule permeabilizzate (incubazione di 16 ore a 40 °C, (barre piene) e cellule intere (fermentazione alcolica di 36 ore a 28 °C, (barre rigate) a partire dalla frazione glicosidica del mosto da uve Moscato, espressi come percentuale del potenziale totale in terpeni agliconici determinato con idrolisi enzimatica



Processo di permeabilizzazione

La tecnica di permeabilizzazione testata si è dimostrata efficace per tutti i lieviti testati eccetto che per i ceppi LSA4 e LSA7 (attività alcol-deidrogenasi non misurabile in condizioni sperimentali).

Efficienza nel rilascio di terpeni

I ceppi di *Saccharomyces* testati hanno mostrato una certa attività β -glucosidasi, seppur bassa. Il ceppo di *M. pulcherrima* MP346 (LSA8) ha invece mostrato una maggiore attività β -glucosidasi.

L'efficienza di tali cellule nel rilasciare terpeni agliconici dalla frazione glicosidica degli aromi presente nel mosto da uve Moscato è stata prima valutata analizzando la frazione volatile ottenuta per idrolisi enzimatica.

In seguito, le cellule permeabilizzate sono state incubate per 20 ore in presenza della medesima frazione glicosidica, sia a temperatura ambiente sia a 40 °C.

L'innalzamento della temperatura di incubazione non ha influenzato né il profilo né la quantità di terpeni rilasciati, bensì solo la velocità di rilascio. Solo cinque dei sei ceppi testati hanno idrolizzato la frazione glicosidica e liberato terpeni (B). Le cellule permeabilizzate del ceppo LSA2, ibrido di *S. cerevisiae* e *S. uvarum*, non sono state in grado di liberare alcun terpene nelle condizioni sperimentali. In termini di quantità e tipologia di terpeni rilasciati, le cellule permeabilizzate di LSA8 sono apparse come quelle con la maggior attività di idrolisi dei glucosidi tra i ceppi testati (C, D).

VITENDA 2016, (XXI)

Globalmente, i monoterpendioli, come **3,6** e **3,7 monoterpendiolo**, sono stati i terpeni più rilasciati dalle cellule permeabilizzate. È interessante sottolineare come queste molecole inodore possano essere trasformate in molecole aromatiche durante l'invecchiamento grazie a numerose reazioni che avvengono in mezzo acido, come l'isomerizzazione, la chiusura ad anello, l'idratazione, la disidratazione e l'ossidazione.

Gli altri terpeni maggiormente rilasciati sono stati monoterpenoli e ossidi di monoterpeni, con un'elevata efficienza osservata per il ceppo LSA8.

Cellule permeabilizzate o vitali

Allo scopo di determinare se la permeabilizzazione cellulare abbia influenzato il rilascio di terpeni dalla frazione glicosidica del mosto di uve Moscato, lieviti non permeabilizzati sono stati testati per la loro capacità di rilasciare i terpeni agliconici nel corso di una fermentazione alcolica della durata di 36 ore. In tali condizioni, le cellule intere non sono state in grado di rilasciare aromi liberi come quelle permeabilizzate. Solo l'*o*-trienolo e il **3,7 monoterpendiolo** sono stati rilevati al termine della fermentazione da parte di alcuni ceppi (LSA1, LSA6, LSA5 e LSA8) e comunque in concentrazioni inferiori a quelle rilevate con le cellule permeabilizzate.

Applicazioni pratiche

Lo scopo di questo lavoro era valutare la capacità nativa dei ceppi di lievito commerciali per uso enologico di rilasciare aromi da precursori glicosidici in

(D) - Attività β -glucosidasi misurata nelle cellule permeabilizzate di 8 ceppi di LSA enologici in commercio. Media e deviazione standard di tre ripetizioni. Substrato utilizzato: p-nitrofenilglucopiranoside. Biodiva: *Torulasporea delbruekii* ceppo TD291; EC-1118, K1M, LSA1, CEG e DV10: *Saccharomyces cerevisiae*; Flavia: *Metschnikowia pulcherrima* ceppo MP346; LSA2: ibrido naturale di *S. cerevisiae* e *S. bayanus*

Ceppo	Media	Deviazione standard
Flavia	69,85	0,75
K1M	21,90	0,45
LSA1	22,05	0,39
EC-1118	20,02	0,59
CEG	19,95	0,55
LSA2	20,08	0,62
DV10	10,05	0,25
Biodiva	6,98	0,15

mosti di uve Moscato. Nonostante alcuni ceppi abbiano mostrato di resistere al trattamento di permeabilizzazione, i risultati mettono in evidenza le potenzialità di questa tecnica per migliorare le attività enzimatiche dei lieviti.

I risultati indicano l'ingresso dei precursori aromatici all'interno della cellula del lievito, importante fattore limitante, fatto di particolare interesse fisiologico che potrebbe orientare i programmi di breeding verso la selezione di nuovi ibridi interspecifici.

L'ottenimento di un ibrido tra *S. cerevisiae* e *S. mikatae* è stato recentemente descritto con lo scopo di selezionare un nuovo ceppo di lievito in grado di apportare al vino una complessità maggiore di quella ottenibile con i ceppi già presenti sul mercato.

Un approccio simile potrebbe essere applicato per migliorare geneticamente i ceppi commerciali di *S. cerevisiae*, affiancando alla loro nativa attività enzimatica idrolitica glucosidasi la capacità di trasportare attivamente i precursori aromatici dal mosto all'interno della cellula. Si tratterebbe di un'arma in più nelle mani del winemaker per sviluppare nuovi stili enologici.

Per un approfondimento si rimanda all'articolo scientifico originale, Evaluation of the inherent capacity of commercial yeast strains to release glycosidic aroma precursors from Muscat grape must. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21/2015, pagg. 194-199.

Alexandra Bisotto, Anne Julien-Ortiz
Lallemand Sas (Blagnac, France)

Peggy Rigou, Jean-Michel Salmon
Sciences Pur L'oenologie, Inra (Montpellier - Gruissan, France)

Remy Schneider
Institut Français De La Vigne Et Du Vin (Gruissan, France)
flopardo@lallemand.com