IVES Technical Reviews
vigna & vino

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7725

La produzione di composti aromatici da parte dei lieviti enologici dipende dalla gestione del loro equilibrio redox intracellulare

James D. Duncan[1], Anne Ortiz-Julien[2], Mathabatha E. Setati[1], Benoit Divol[1]

[1] South African Grape and Wine Research Institute, Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University,
[2] Lallemand SAS

I lieviti enologici durante la fermentazione producono etanolo e una miriade di altri metaboliti che conferiscono al vino finale la sua impronta organolettica unica. La complessa rete di percorsi metabolici che portano alla produzione di questi composti aromatici dipende in gran parte dalle reazioni enzimatiche redox che fanno uso dei cofattori NAD(H) e NADP(H). In questo lavoro, abbiamo studiato l'equilibrio dei cofattori redox e la gestione di due ceppi di lievito geneticamente correlati durante la fermentazione alcolica, monitorando inoltre la loro produzione di metaboliti chiave.

Cinetiche di fermentazione alcolica

Le cinetiche di fermentazione di due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente correlati, EC1118™ e IONYSwf™[1], è stata confrontata in un mosto sintetico contenente 230 g/L di zuccheri costituiti da metà glucosio e metà fruttosio (Figura 1). Secondo quanto riportato, IONYSwf™ produce elevate quantità di acidi organici e glicerolo e basse quantità di etanolo e acido acetico[2].
Sono stati individuati i tempi corrispondenti alle principali fasi di fermentazione. Le fasi chiave considerate sono state le seguenti: ingresso del lievito nella fase di crescita esponenziale, metà della fase esponenziale, ingresso nella fase stazionaria (che corrisponde anche a un terzo del completamento della fermentazione), due terzi del completamento della fermentazione e fine della fermentazione (indicata da una concentrazione di zuccheri inferiore a 5 g/L). Entrambi i ceppi di lievito hanno prodotto profili di fermentazione tipici e raggiunto la secchezza, ma IONYSwf™ ha fermentato a un ritmo più lento rispetto a EC1118™, impiegando 120 ore per raggiungere la secchezza mentre il secondo ha richiesto 110 ore.

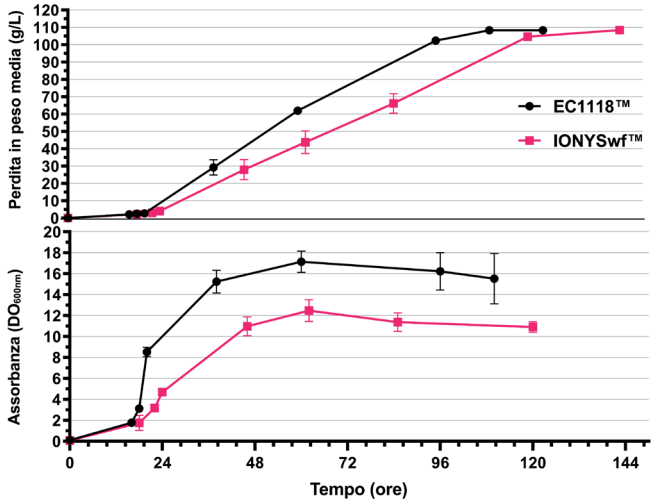


FIGURA 1. Cinetiche di fermentazione e crescita dei ceppi di lievito EC1118™ e IONYSwf™ in mosto sintetico contenente una concentrazione zuccherina di 230 g/L.

Dinamica della concentrazione intracellulare di NAD(H) durante la fermentazione

Le concentrazioni intracellulari dei cofattori redox NAD^+, NADH, $NADP^+$ e NADPH sono state monitorate nelle fasi chiave della fermentazione sopra menzionate. Mentre le concentrazioni e i rapporti di $NADP^+$ e NADPH sono risultati abbastanza stabili nel tempo (dati non mostrati), quelli di NAD^+ e NADH sono risultati variare in modo significativo (Figura 2). Infatti, la concentrazione totale di NAD(H) (cioè la somma di [NAD^+] e [NADH]) è rimasta stabile solo fino alla metà della fase esponenziale, dopodiché è diminuita drasticamente in entrambi i ceppi, ma con una marcata differenza. Infatti, la concentrazione di NAD(H) è diminuita prima in EC1118™. Allo stesso modo, il rapporto di NAD^+/NADH è diminuito prima in EC1118™, rivelando che IONYSwf™ è riuscito a mantenere una concentrazione più alta di NAD^+ rispetto a EC1118™ dopo il punto temporale di metà fase esponenziale.
È tipicamente riportato in letteratura che la concentrazione di NAD(H) e il rapporto di NAD^+/NADH sono stabili durante tutta la fermentazione[3 4]. I risultati di questo studio rivelano che la prima ipotesi sulla concentrazione è errata e che la seconda sul rapporto è solo parzialmente corretta. Queste ipotesi erano per lo più basate su modelli stabiliti in sistemi *fed-batch* quando i lieviti adottano un metabolismo respiratorio, un evento raro in *S. cerevisiae*, che è soggetto a un forte effetto Crabtree. Infatti, in questa specie di lievito, concentrazioni di zucchero fino a 150 mg/L inducono un passaggio dalla respirazione alla fermentazione indipendentemente dalla presenza di ossigeno[5]. I dati suggeriscono che, man mano che i lieviti si avviano verso la fase stazionaria, il NAD(H) viene progressivamente riconvertito nel suo substrato originale, la nicotinammide. Inoltre, una volta raggiunta la fase stazionaria, i lieviti faticano a mantenere l'equilibrio tra le due forme di NAD (ovvero NAD^+ e NADH), anche se alcuni ceppi sembrano cavarsela meglio di altri. I dati, quindi, gettano nuova luce non solo sulla gestione dei cofattori redox intracellulari di *S. cerevisiae*, ma anche sui suoi flussi metabolici ceppo-specifici. In effetti, la diversa entità dello squilibrio

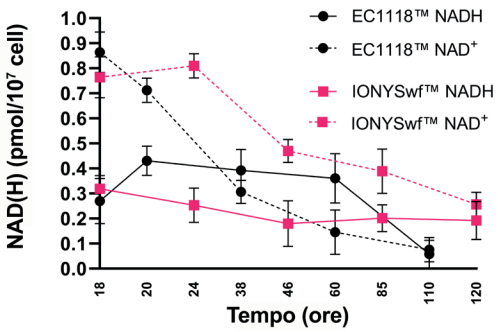


FIGURA 2. Dinamica della concentrazione intracellulare di NAD^+ e NADH durante la fermentazione nei ceppi EC1118™ e IONYSwf™.

La traduzione di questo articolo in italiano vi stata offerta da WineHunter Hub. https://www.winehunterhub.com/

TABELLA 1. Concentrazioni di metaboliti e biomassa prodotti alla fine della fermentazione alcolica nel mosto sintetico in condizioni completamente anaerobiche da EC1118™ e IONYSwf™.

	EC1118™	IONYSwf™
Zuccheri residui (g/L)	0.37 ± 0.03 [a]	2.42 ± 1.93 [a]
Biomassa (g/L)	4.56 ± 0.05 [a]	4.43 ± 0.02 [a]
Etanolo (g/L)	104.34 ± 1.97 [a]	100.57 ± 1.49 [b]
CO_2 (g/L)	108.27 ± 0.13 [a]	107.93 ± 0.07 [a]
Glicerolo (g/L)	6.78 ± 0.01 [b]	9.83 ± 0.11 [a]
Acido succinico (g/L)	0.46 ± 0.03 [b]	0.92 ± 0.03 [a]
Acido acetico (g/L)	0.66 ± 0.02 [a]	0.45 ± 0.01 [b]
Somma dei principali alcoli superiori* (g/L)	0.24 ± 0.00 [b]	0.32 ± 0.00 [a]
Somma dei principali esteri dell'acido acetico** (mg/L)	1.32 ± 0.1 [b]	4.75 ± 0.3 [a]

*Somma di Butan-1-olo, Propan-1-olo, 2-metilpropan-1-olo, 3-metilbutan-1-olo e 2-feniletanolo; **Somma di 3-metilbutil acetato e 2-feniletil acetato.

del rapporto NAD^+/NADH suggerisce differenze nella produzione di metaboliti e, in ultima analisi, nel profilo aromatico dei vini prodotto con specifici ceppi.

Produzione dei metaboliti principali

Per confermare che la gestione redox ceppo-specifica porta a impronte metaboliche uniche, i principali metaboliti prodotti da EC1118™ e IONYSwf™ sono stati quantificati alla fine della fermentazione (Tabella 1). Per comprendere la differenza nei flussi metabolici tra i due ceppi, i risultati sono mostrati in uno schema che mostra i principali percorsi e prodotti finali di rilevanza enologica (Figura 3). I risultati mostrano chiaramente che IONYSwf™ produce più glicerolo, meno etanolo, meno acido acetico e più acido succinico, oltre a più alcoli superiori e più esteri dell'acido acetico. Mentre questi risultati confermano quelli precedentemente riportati[2], la conoscenza del peculiare stato redox intracellulare di questo ceppo rispetto a EC1118™ ci permette di comprendere meglio la sua attività metabolica. In effetti, la sua maggiore produzione di glicerolo si traduce direttamente in una minore (sebbene limitatamente nelle condizioni di questo esperimento) produzione di etanolo perché riduce la disponibilità di zucchero.

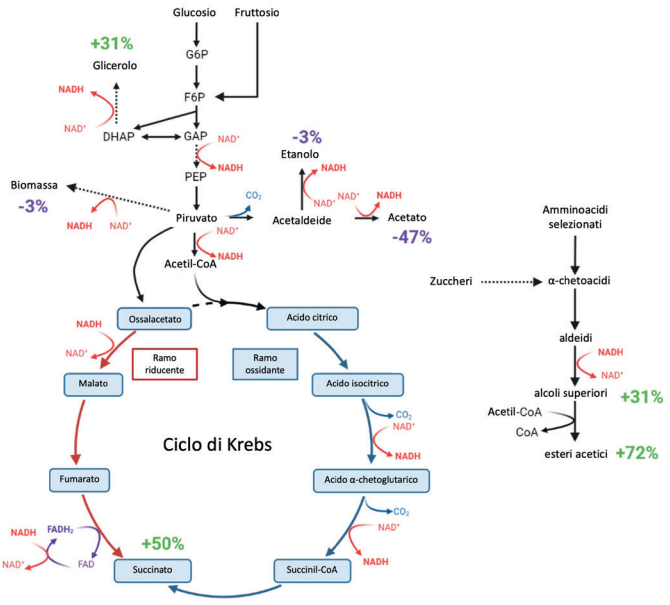


FIGURA 3. Vie metaboliche semplificate che portano alla formazione dei principali prodotti finali di interesse enologico. Le reazioni che coinvolgono i cofattori redox sono rappresentate in rosso. La percentuale di aumento o diminuzione dei prodotti finali in IONYSwf™ rispetto a EC1118™ è indicata rispettivamente in verde e viola accanto ai nomi dei prodotti finali. Le frecce tratteggiate indicano passaggi multipli. Abbreviazioni: G6P: glucosio-6-fosfato, F6P: fruttosio-6-fosfato, GAP: gliceraldeide-3-fosfato, PEP: fosfoenolpiruvato, DHAP: diidrossiacetone fosfato.

Dal punto di vista redox, l'aumento della produzione di glicerolo costringe anche il lievito a produrre più composti che gli permettono di rigenerare più NADH come meccanismo compensatorio. Questi includono acido succinico e principali composti aromatici come alcoli superiori ed esteri dell'acido acetico. Questi probabilmente spiegano la maggiore concentrazione di NAD^+ durante la fermentazione.

Conclusione

Questo studio getta nuova luce sulla gestione redox intracellulare nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. In particolare, mostra che la concentrazione di NAD(H) diminuisce nel tempo, il che è da correlare con la diminuzione della velocità di fermentazione alcolica dopo metà della fase esponenziale poiché sono disponibili meno cofattori per assistere la scomposizione enzimatica degli zuccheri. Sebbene fosse nota l'intricata connessione tra produzione di metaboliti primari e i cofattori redox, questo studio ha dimostrato una chiara specificità del ceppo. Nel caso di IONYSwf™, la sua elevata produzione intrinseca di glicerolo ha un effetto valanga metabolico. Dai dati generati in questo studio, si può presumere che le condizioni che portano a una produzione ancora più elevata di glicerolo riducano ulteriormente l'etanolo e aumentino la produzione dei sottoprodotti desiderati come l'acido succinico e i composti aromatici fermentativi. La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sul miglioramento della nostra comprensione delle dinamiche di produzione e degradazione del NAD(H) in varie condizioni ambientali e sul legame con la produzione di metaboliti di rilevanza enologica. ■

Finanziamento: *Gli autori ringraziano la Stellenbosch University e la National Research Foundation of South Africa (UID: 145290) per aver finanziato la borsa di J.D. Duncan, nonché Lallemand Oenology e Winetech per aver sostenuto congiuntamente il progetto di ricerca.*

Fonte: *articolo scientifico "Redox cofactor metabolism in Saccharomyces cerevisiae and its impact on the production of alcoholic fermentation end-products" (Food Research International, 2023)*

1 Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2014). Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae under hyperosmotic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 80(8), 2623–2632. https://doi.org/10.1128/AEM.03710-13

2 IONYSwf™ technical sheet. www.lallemandwine.com

3 Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J., K¨otter, P., Luttik, M. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiology Reviews, 25(1), 15–37. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00039-5

4 Richard, P., Teusink, B., Westerhoff, H. V., & van Dam, K. (1993). Around the growth phase transition S. cerevisiae's make-up favours sustained oscillations of intracellular metabolites. FEBS Letters, 318(1), 80–82. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81332-T

5 Verduyn, C., Zomerdijk, T. P., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. Applied Microbiology and Biotechnology, 19(3), 181–185. https://doi.org/10.1007/BF00256451

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.