

## NUOVI STRUMENTI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI ENOLOGICI DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. PARTE I: PROTEOMICA

Annalisa SANTUCCI, Alessandro PAFETTI, Lorenza TRABALZINI, Paola MARTELLI

Università degli Studi di Siena, Dipartimento di Biologia Molecolare

### Sommario

Mediante un'analisi proteomica, abbiamo valutato la risposta prodotta da un ceppo enologico di *S. cerevisiae* agli stress caratteristici della fermentazione. Durante questo processo, infatti, il lievito si trova progressivamente a dover fronteggiare gli stress derivanti dalla elevata concentrazione iniziale e dal successivo esaurimento di glucosio, che sono causa di shock da iperosmolarità e shock ossidativo. E per poter essere definito tale, un buon ceppo enologico deve essere in grado di superare questi stress. Considerando poi che la risposta ad una generica perturbazione è sempre ceppo-specifica, il tipo di indagine qui descritto dovrebbe essere esteso a tutti i lieviti 'starter' di fermentazione.

### Introduzione

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* di tipo 'budding' è stato il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato nel 1996 quale cellula modello nell'ambito di un progetto satellite del Progetto Genoma Umano; le relative sequenze sono adesso raccolte in esaurienti database ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org); [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)). Una volta che se ne conosce la struttura, il genoma indica le sequenze delle proteine che possono essere potenzialmente sintetizzate. Nonostante sia un'importante fonte di informazioni, la mera analisi delle sequenze genomiche non fornisce tuttavia indicazioni circa l'ampia diversificazione delle strutture proteiche derivanti da mutazioni e modificazioni post- e co-traduzionali, eventi che creano la complessità delle molecole proteiche funzionali. Per questo motivo è stato dedicato negli ultimi anni un interesse sempre maggiore alla caratterizzazione del repertorio proteico espresso da un singolo tipo cellulare od organismo (definito 'proteoma'), implicando in tal modo la necessità di un'indagine capace di rendere conto delle molecole espresse in un dato momento dai sistemi biologici funzionali. È in questo ambito che si inserisce la proteomica, analisi rivolta alla caratterizzazione dei prodotti proteici codificati dal genoma (Fig. 1). Analizzare il proteoma significa conoscere 'quante' proteine sono espresse ad un dato momento, 'in che misura' sono prodotte e 'come' sono strutturate per essere funzionali nella cellula.

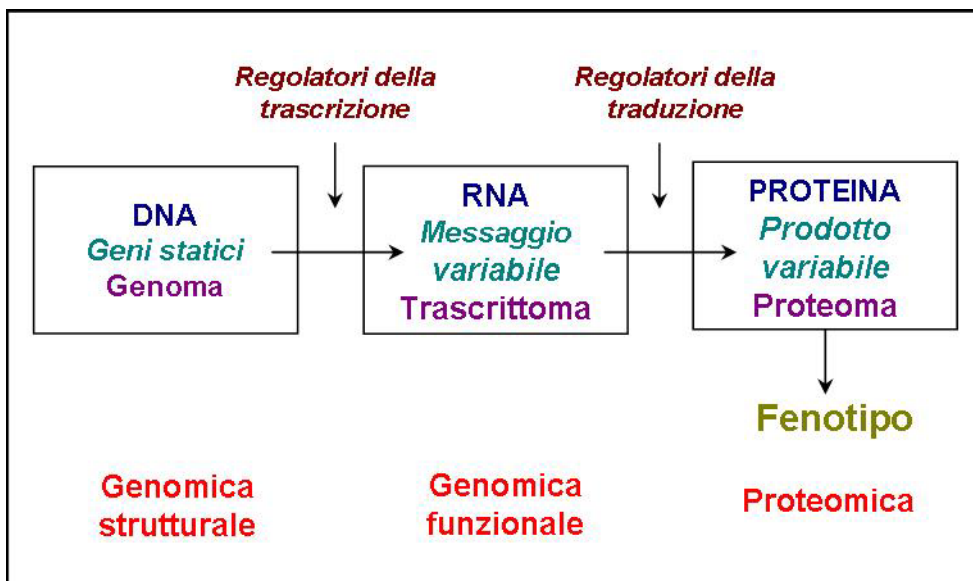


Fig. 1 – Relazione tra la natura conservativa del singolo genoma e la caratteristica dinamica dei proteomi multipli da esso derivanti. In rosso sono indicate le tecniche per lo studio dei differenti repertori.

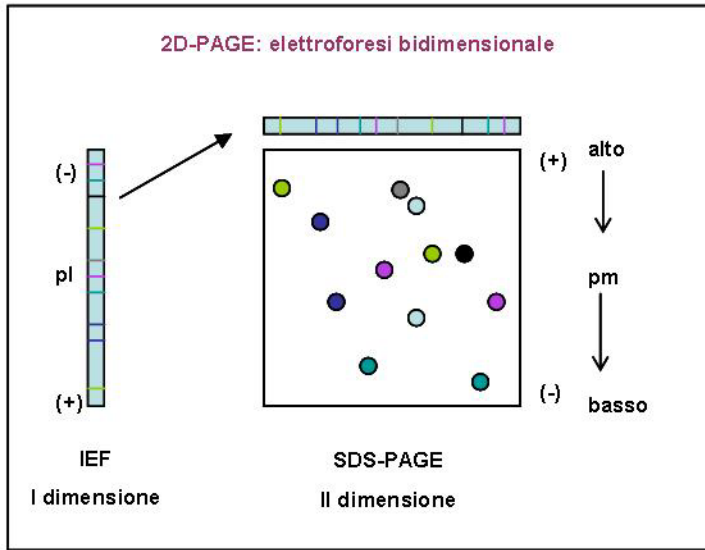


Fig. 2 – 2D-PAGE: combinazione ortogonale di due tecniche elettroforetiche che separano le proteine in base a due distinte caratteristiche chimico-fisiche, *pl*-punto isoelettrico (focalizzazione isoelettrica) e *pm*-peso molecolare (SDS-PAGE). Il risultato è la presenza nel gel di spot distinti, corrispondenti ciascuno ad ogni singola proteina espressa. Gli spot potranno poi essere rivelati mediante uso di opportuni coloranti.

L'elettroforesi bidimensionale computerizzata (2D-PAGE; Fig. 2) si è rivelata giocare un ruolo centrale nell'analisi del proteoma: è infatti uno strumento essenziale per produrre l'evidenza dell'espressione genica. L'identificazione e la conseguente caratterizzazione delle proteine che sono risolte in un gel bidimensionale possono essere condotte mediante strumenti opportuni quali il microsequenziamento e la spettrometria di massa (Fig. 3).

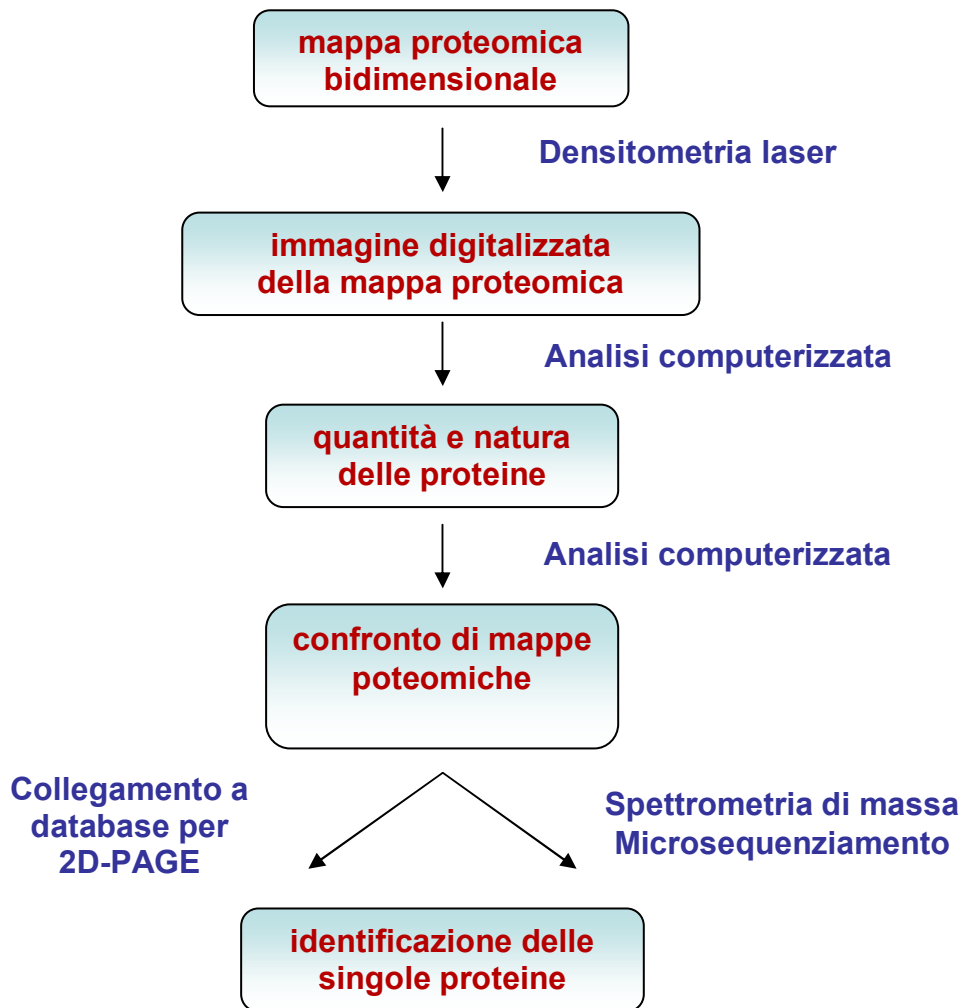


Fig. 3 – Analisi computerizzata delle mappe proteiche ottenute mediante 2D-PAGE: la procedura.

Oltre ad essere un sistema modello per le cellule dei mammiferi, il lievito è anche utilizzato come strumento biotecnologico nell'industria alimentare. Se da un lato i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* di tipo "baker" sono stati ampiamente studiati mediante sequenziamento del genoma o altri tipi di caratterizzazione, dall'altro possiamo osservare che i proteomi dei ceppi enologici o "brewing" sono ancora per la maggior parte, se non del tutto, sconosciuti. Si rende quindi auspicabile, per l'ottimizzazione dei processi industriali, una migliore conoscenza dei ceppi con specifiche applicazioni biotecnologiche.

Ottimizzare la produzione dei vini di alta qualità significa anche selezionare quei ceppi di lievito che avranno un ruolo preminente nel processo di vinificazione.

I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente presenti in natura (o WT, wild-type) dovrebbero perciò essere studiati per evidenziare quei fenotipi dotati di caratteristiche favorevoli, qual è appunto la capacità di portare a termine la fermentazione anche in condizioni micro-ambientali avverse. Sono allo stesso modo esigenze importanti la capacità di tollerare alte concentrazioni di etanolo e di fronteggiare la carenza di glucosio.

Nella pratica enologica, una fermentazione si considera incompleta quando il residuo zuccherino nel vino è superiore allo 0.4%, e quando il lievito incontra un ambiente sfavorevole, la fermentazione può protrarsi addirittura per mesi. Dal momento che la fermentazione dipende strettamente dalla crescita e dalla vitalità del lievito, è obiettivo cruciale evitare un arresto di fermentazione (causa frequente di vinificazioni anomale) prevenendo gli stress cellulari e/o selezionando i ceppi capaci di superare gli stress derivanti da carenza di nutrienti, tossicità da etanolo, temperature estreme, privazione di ossigeno, e così via.

### **Caratterizzazione proteomica di *Saccharomyces cerevisiae* esposto a diverse condizioni di fermentazione**

L'uso di diverse condizioni di fermentazione può riflettersi sul profilo dell'espressione proteica di *Saccharomyces cerevisiae*; tale profilo può quindi cambiare in condizioni normali e di stress (es. limitazione dei nutrienti). Mediante 2D-PAGE è possibile analizzare la dinamicità del proteoma e rivelare se un ceppo di lievito è capace di rispondere in modo appropriato ad uno stress ambientale durante la fermentazione alcolica.

Utilizzando questo tipo di approccio, abbiamo analizzato la mappa proteomica bidimensionale di un ceppo enologico di *Saccharomyces cerevisiae*, denominato K310, che è dotato di interessanti caratteristiche. Questo studio è parte integrante di un progetto sperimentale volto alla caratterizzazione dell'espressione proteica dei ceppi di lievito implicati nei processi biotecnologici e delle loro risposte allo stress. Abbiamo infatti prodotto la prima mappa proteomica bidimensionale completa di tale ceppo quale parte di un progetto collaborativo per la caratterizzazione sperimentale del profilo proteico dei ceppi di lievito coinvolti nei processi di vinificazione dei vini D.O.C.G. ottenuti dal 'Sangiovese'. Questa mappa proteomica potrà dunque essere utilizzata quale riferimento (master) per gli studi futuri e costituire il fondamento per la creazione di un database di mappe 2D in ambito enologico. K310 è infatti un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* derivante da selezione naturale che si è adattato alla crescita nelle condizioni stressanti della fermentazione in cantina; può quindi essere considerato un modello naturale per l'analisi dell'espressione genica o dei cambiamenti a carico del proteoma.

Mediante analisi 2D-PAGE sono stati risolti, nel range di pm considerato tra 8 e 250 kDa, circa 2500 spot proteici.

Le condizioni di coltura utilizzate in questo lavoro differiscono da quelle usate in studi precedenti, dal momento che abbiamo fatto crescere un ceppo enologico WT di *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni di semi-aerobiosi in un medium sintetico caratterizzato da una concentrazione iniziale di glucosio pari a 100 g/l, in modo tale da mimare il più possibile le condizioni di crescita del lievito nel mosto.

Durante la fermentazione abbiamo osservato come la variazione della concentrazione di glucosio si rifletta sull'entità e sulla qualità dell'espressione proteica. Tale analisi dinamica è stata condotta comparando le mappe bidimensionali di *S. cerevisiae* K310 cresciuto in differenti condizioni nutrizionali (concentrazione di glucosio nel mezzo di coltura) e le mappe ottenute a diversi momenti della fermentazione alcolica. Questo ci ha permesso di rilevare la diminuzione della sintesi di alcune proteine, presenti nella mappa ottenuta alle 16 ore (glucosio 80 g/l) ed assenti invece alle 44 ore (glucosio 0 g/L) dall'inizio della fermentazione (Fig. 4).

L'identificazione di queste proteine ha rivelato l'attivazione, conseguente all'esaurimento di glucosio, di geni probabilmente repressi in condizioni nutrizionali normali.

La lista completa delle proteine della risposta allo stress è disponibile in: *Biochemical Journal* 2003. Essendo K310 un ceppo di lievito selezionato come potenziale 'starter' di fermentazione, l'espressione di queste proteine può quindi essere considerata una sorta di caratteristica paradigmatica dei ceppi di lievito capaci di superare gli stress della fermentazione.

Inoltre, l'analisi di microsequenziamento del dominio N-terminale ha mostrato che molte di queste proteine sono in realtà i prodotti dell'attività proteolitica promossa dalla carenza di glucosio. La degradazione del 'pool' proteico citoplasmatico è quindi un'ulteriore strategia che la cellula adotta per fronteggiare la condizione stressante e superare una fase critica della fermentazione, ovvero prevenirne l'arresto o il rallentamento dovuti alla carenza di glucosio.

Un'analisi dettagliata della natura funzionale delle singole proteine processate sembra suggerire che la proteolisi non avvenga in modo casuale e che si possa fornire per questo fenomeno una spiegazione correlabile al metabolismo cellulare. Infatti, tenendo conto della classificazione funzionale, una caratteristica molto interessante è la predominanza di frammenti proteici derivanti da enzimi implicati nel metabolismo dei carboidrati, ed in particolar modo del metabolismo del glucosio; questo indica che l'autodigestione è diretta soprattutto verso quegli enzimi per i quali il substrato primario viene a mancare.

Un altro caso interessante è la proteina Met17 (Fig. 4). Il gene *MET17* codifica per una proteina bifunzionale: la O-acetilserina/O-acetilmoserina sulfidrilasi; si tratta dell'unico enzima responsabile dell'incorporazione in *Saccharomyces cerevisiae* di solfuro ridotto. I livelli di *MET17* possono variare in modo notevole da ceppo a ceppo, ed è stato recentemente riportato che un'attività elevata di *MET17* è correlata alla produzione di H<sub>2</sub>S. Il solfuro di idrogeno è un sotto-prodotto della fermentazione alcolica che può dare al vino prodotto un odore sgradevole. Di conseguenza, i lieviti usati in vinificazione non dovrebbero produrre alte quantità di H<sub>2</sub>S e questo potrebbe essere un criterio importante per la selezione dei ceppi con applicazioni biotecnologiche. Anche il ceppo K310 è stato selezionato in base alle qualità organolettiche del vino che produce; esso contiene infatti H<sub>2</sub>S solo in tracce.

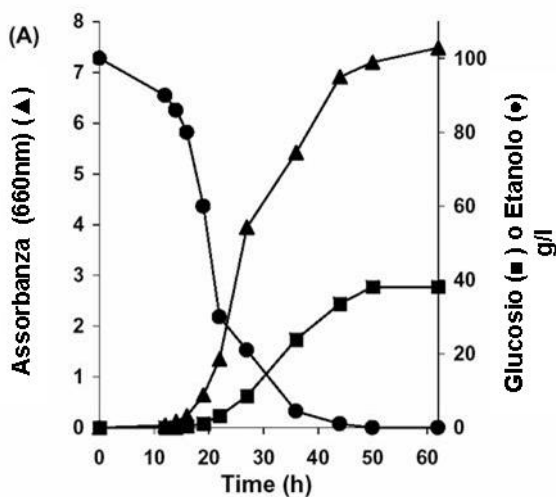
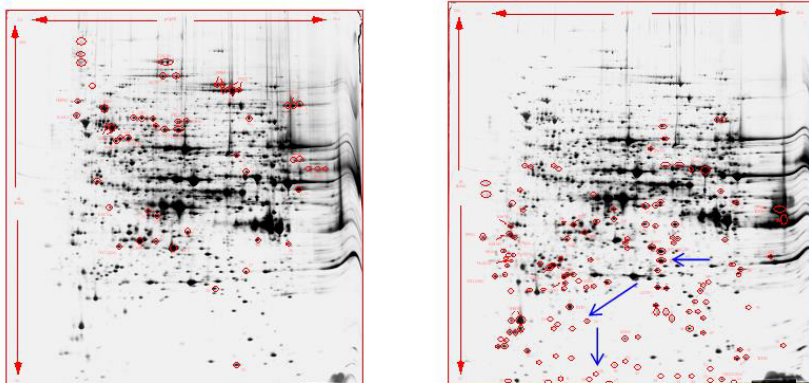


Fig. 4 – Comparazione dei proteomi del ceppo enologico di *Saccharomyces cerevisiae* in due diverse condizioni nutrizionali/stressanti durante la fermentazione alcolica: inizio della fase di crescita

esponenziale (alti livelli di glucosio, etanolo assente, a sinistra – 16 ore, 80 g/l glucosio) ed inizio della fase stazionaria (glucosio assente, alti livelli di etanolo, a destra - 44 ore, 0 g/l glucosio). I cerchi rossi indicano le proteine la cui espressione varia in questi momenti della vita metabolica. Si noti l'alto numero di proteine a basso peso molecolare (parte bassa del gel, proteine proteolizzate) alle 44 ore. Le frecce blu indicano i frammenti proteolitici della proteina Met17.



Diversi fattori ambientali hanno dimostrato tuttavia di contribuire alla produzione di H<sub>2</sub>S, e tra questi si cita la scarsità di nutrienti ed in particolare di azoto, che può essere a sua volta conseguenza dello stress da etanolo. Abbiamo ipotizzato che lo stress da fermentazione possa diminuire l'attività di *MET17* nel ceppo K310 in conseguenza della diminuzione del substrato fermentabile e che così, come visto per gli enzimi glicolitici, la regolazione dei livelli citoplasmatici possa essere raggiunta mediante proteolisi.

Come nel caso di K310, conoscere attraverso un'indagine proteomica le proteine stress-indotte in *Saccharomyces cerevisiae* può influenzare le stesse applicazioni biotecnologiche del lievito. Sono infatti i cambiamenti cellulari osservati in *S. cerevisiae* durante la fermentazione (autoproteolisi) e l'invecchiamento (autolisi) che conferiscono al vino le sue peculiari caratteristiche organolettiche. Anche la quantità di azoto negli autolisati e la concentrazione di aminoacidi liberi sono influenzate in modo significativo dal ceppo, condizionando anch'esse la composizione e la qualità del prodotto finale.

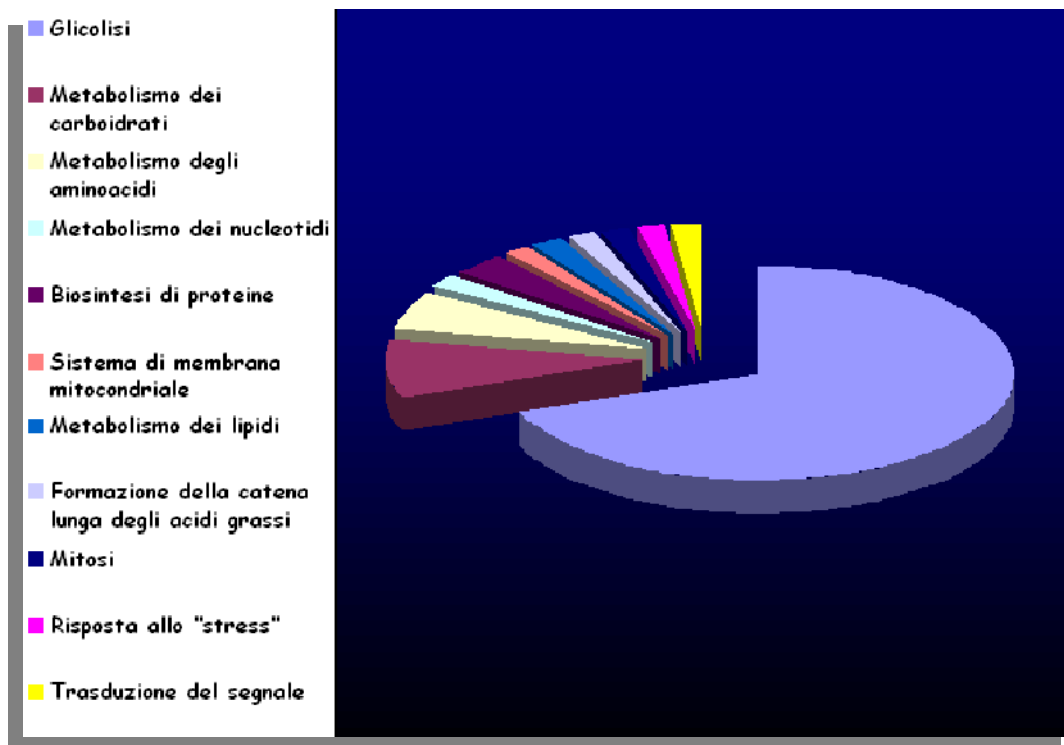


Fig. 5 – Classificazione funzionale delle proteine da cui durante la fermentazione hanno origine i relativi frammenti; la rivelazione mediante 2D-PAGE indica che la proteolisi è diretta in modo principale verso gli enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio.

Per gli enzimi proteolitici è stato inoltre suggerito un ruolo nel rilascio di composti azotati prima e durante i processi autolitici del lievito, processi osservabili nelle comuni condizioni di vinificazione. Oltre agli aminoacidi sono rilasciati infatti anche polipeptidi con pm compreso tra 10000 e 16000 e peptidi con pm inferiore a 10000. Questi sono ulteriormente trasformati in peptidi più piccoli ad opera degli enzimi rilasciati dal lievito, e ciò modifica di conseguenza il sapore del vino.

Ulteriormente, durante la fermentazione e in concomitanza con la scarsità dei nutrienti, i ceppi enologici di *S. cerevisiae* possono rilasciare aminoacidi nel medium in conseguenza della processazione delle proteine o della loro sintesi *de novo* a partire dall'etanolo. È stato suggerito infatti che la cellula di lievito sia capace di usare gli aminoacidi non solo come fonte di azoto ma anche come agenti redox per il bilanciamento del potenziale ossido-riduttivo in condizioni ambientali critiche.

## **Saccharomyces cerevisiae**

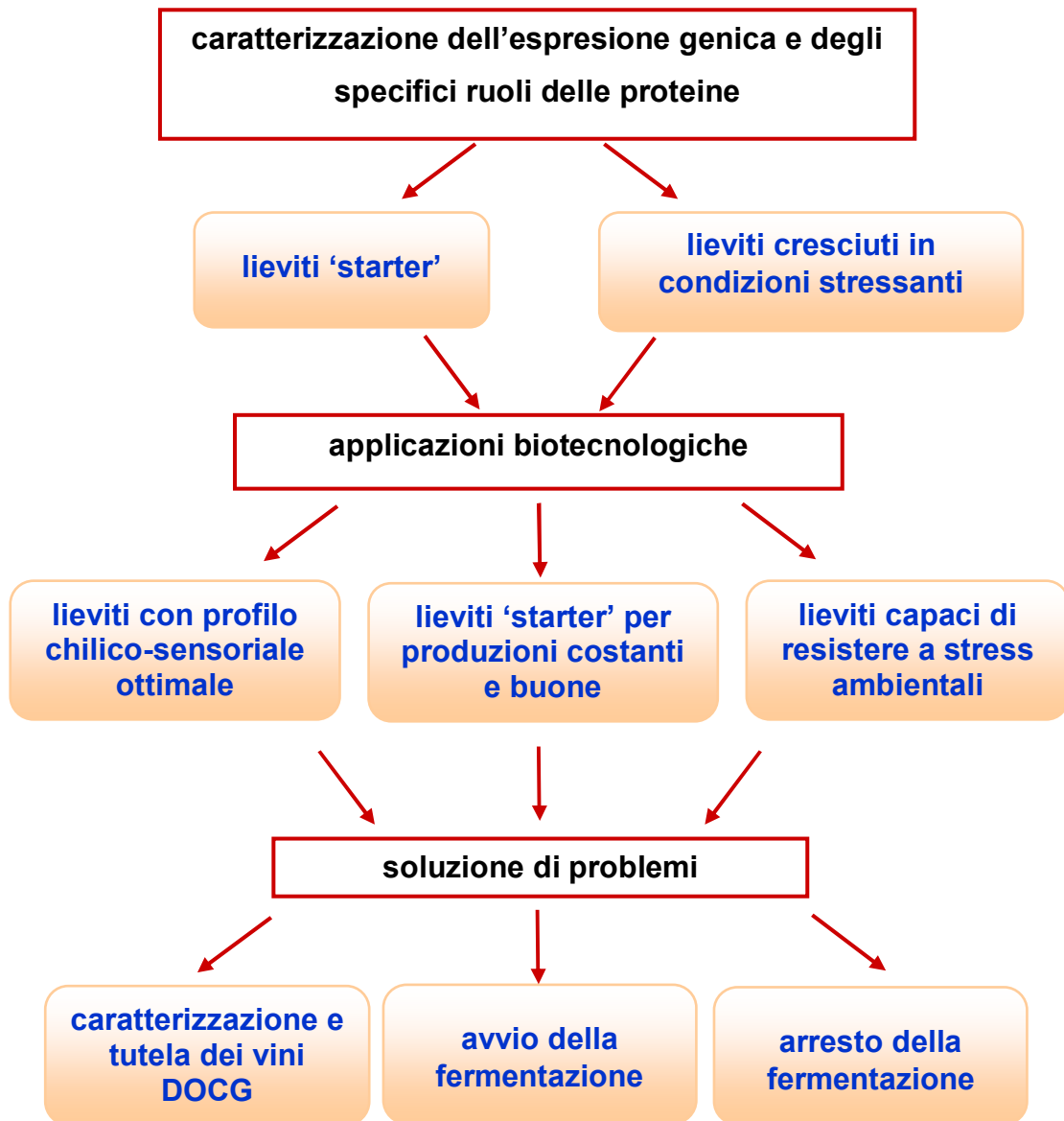


Fig. 6 – La proteomica come strumento utile per la caratterizzazione di lieviti "starter" e/o la selezione di ceppi di lievito con caratteristiche ottimali per applicazioni biotecnologiche. I ceppi caratterizzati e selezionati consentiranno il controllo dei processi fermentativi e la tutela di vini di alta qualità.

### **Conclusioni**

La proteomica è uno strumento sempre più importante per la ricerca applicata sia nel campo dell'agricoltura che dell'alimentazione. In particolare, considerando l'impiego del lievito in campo biotecnologico, la proteomica è utile per:

- i. selezionare ceppi per applicazioni enologiche o alimentari
- ii. caratterizzare i prodotti a marchio DOCG, IGP, DOP.

Abbiamo dimostrato come la proteomica sia un'analisi capace di caratterizzare e selezionare i ceppi di lievito dotati delle caratteristiche ottimali per portare a termine la fermentazione e dare allo stesso tempo al vino prodotto le proprietà organolettiche desiderabili (Fig. 6). Questo tipo di caratterizzazione consentirà quindi di ottimizzare le applicazioni biotecnologiche, cosicché la selezione e l'uso di ceppi naturali di *S. cerevisiae* potranno essere una valida alternativa alla manipolazione genetica del lievito per l'ottenimento di un prodotto finale ottimale.

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato da grants della Fondazione Monte dei Paschi di Siena, progetto “Qualità dei prodotti alimentari e loro relazione con l’ambiente e la salute dell’uomo” e da MIUR, Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base RBAU01JE9Aj002.

## Bibliografia

ARSIA (Azienda Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione nel settore Agricolo-forestale)  
progetto “Miglioramento qualitativo delle produzioni vitivinicole e del materiale di propagazione - Innovazione della tecnica di vinificazione mediante interventi biotecnologici”,  
2003, FINAL REPORT

Falugi F., Trabalzini L., Paffetti A., Santucci A., Bovalini L., Coratza G. and Martelli P.  
Protein expression during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* is affected by glucose levels: analysis by two-dimensional electrophoresis.  
IT. BIOCHEM. SOC. TRANSACTIONS. 6, 90, 1995

Joubert, R., Brignon, P., Lehmann, C., Monribot, C., Gendre, F. and Boucherie, H.  
Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts.  
YEAST 16, 511-22, 2000

Martinez-Rodriguez, A.J. and Polo, M.C.  
Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System.  
J. AGRIC. FOOD CHEM. 48, 1081-1085, 2000

Martinez-Rodriguez, A.J., Carrascosa, A.V. and Polo, M.C.  
Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system.  
INT. J. FOOD MICROBIOL. 68, 155-60, 2001

Mauricio, J.C., Valero, E., Millan, C. and Ortega, J.M.  
Changes in Nitrogen Compounds in Must and Wine during Fermentation and Biological Aging by Flor Yeasts.  
J. AGRIC. FOOD CHEM. 49, 3310-3315, 2001

Santucci A., Paffetti A., Trabalzini L., Bovalini L., Neri P. and Martelli P.  
Phenotypic expression of *Saccharomyces cerevisiae* (wine yeast) under different cell culture conditions.  
“FROM GENOME TO PROTEOME” 2<sup>ND</sup> SIENA 2D ELECTROPHORESIS MEETING, 1996

Santucci A., Trabalzini L., Paffetti A., Bovalini L. and Martelli P.  
Mapping the phenotype of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain by 2D-PAGE and microsequencing.  
IT. BIOCHEM. SOC. TRANSACTIONS. S44, 1996

Santucci A., L. Trabalzini, L. Bovalini, P. Neri and P. Martelli  
Differences between genotypic and phenotypic sequences in *Saccharomyces cerevisiae*  
ELECTROPHORESIS 21, 37171-37123, 2000

Santucci A., L. Trabalzini, A. Paffetti, L. Bovalini e P. Martelli  
Relazioni genoma-proteoma in un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* impiegato per la vinificazione del “Sangiovese”  
“IL SANGIOVESE”, ARSIA Ed., Firenze, 477-480, 2001

Santucci A., L. Trabalzini, A. Paffetti, L. Bovalini e P. Martelli  
Modificazioni dell’espressione proteica di un ceppo di lievito nella vinificazione del “Sangiovese”  
“IL SANGIOVESE”, ARSIA Ed., Firenze, 481-484, 2001

Spiropoulis, A. and Bisson, L.F.  
MET17 and Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*.  
APPL. ENV. MICROBIOLOGY 66, 4421–4426, 2000

Trabalzini L., A. Paffetti, A. Scaloni, E. Ferro, G. Coratza, L. Bovalini, P. Lusini, P. Martelli and A. Santucci  
VINIDEA.NET – RIVISTA INTERNET TECNICA DEL VINO, 2005, N.1

Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*  
BIOCHEMICAL JOURNAL 15, 35-46, 2003

Trabalzini L., A. Paffetti, E. Ferro, A. Scaloni, F. Talamo, L. Millucci, P. Martelli and A. Santucci  
Proteomic characterization of a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*  
ITALIAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 52, 72-80, 2003

L. Millucci, D. Braconi, A. Paffetti, S. Martini, M. Ricci, F. Bartolini, L. Trabalzini, P. Martelli, C. Rossi and A. Santucci  
Proteomics and metabolomics to characterize enological *Saccharomyces cerevisiae*  
7<sup>th</sup> NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONGRESS, Catania, September 8-10, 2004