

## Microbiologia e biotecnologie applicate

DOI 10.1007/s00253-005-1994-2

### Mini-Review

## L'UTILIZZO DI CEPPI MODIFICATI DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE IN ENOLOGIA

D. Schuller · M. Casal

Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

D. Schuller

Phone: +351-253-604310

Fax: +351-253-678980

E-mail: dschuller@bio.uminho.pt

### Riassunto

Negli ultimi decenni, la scienza e la tecnologia degli alimenti hanno contribuito all'introduzione di nuovi prodotti per soddisfare le richieste nutrizionali, socio-economiche e di qualità. Con la moderna genetica molecolare, l'importanza industriale di *Saccharomyces Cerevisiae* è accresciuta ulteriormente. La richiesta di ceppi geneticamente modificati (GM) di *S. cerevisiae* per il biodiesel, l'industria delle bevande e del pane o per la produzione di prodotti biotecnologici (per esempio, enzimi, prodotti farmaceutici) continuerà a crescere in futuro. Negli ultimi anni, sono stati ottenuti numerosi ceppi enologici specializzati di *S. cerevisiae*, che presentavano diverse e nuove proprietà enologiche, in grado di soddisfare le richieste derivanti dalle moderne pratiche di vinificazione. La comprensione delle complessità del trascrittoma, proteoma e metaboloma darà un contributo decisivo alla conoscenza della composizione genetica dei ceppi commerciali enologici ed influenzerà il miglioramento genetico grazie all'ingegneria genetica. I progressi più importanti riguardanti le implicazioni dell'utilizzo di ceppi GM nell'industria enologica sono discussi in questo articolo. Vengono considerati diversi aspetti, incluse le strategie utilizzate per la costruzione di ceppi nel rispetto degli obblighi legislativi attuali, la valutazione dei rischi ambientali riguardanti i ceppi geneticamente modificati, i metodi per il rilevamento del DNA ricombinante e la proteine e le ragioni dell'atteggiamento negativo dei consumatori nell'utilizzo di tali ceppi.

### Introduzione

L'inoculo di colture pure selezionate di lieviti nel mosto è una pratica enologica nata nel 1970, per produrre del vino con determinate caratteristiche organolettiche e per garantire una certa continuità nel corso delle successive vendemmie. Attualmente, la maggior parte della produzione di vino si basa sull'utilizzo dei lieviti starter che sono stati selezionati soprattutto per la loro capacità fermentativa. Indagini biogeografiche estensive effettuate nel corso di molti anni e la valutazione della flora fermentante di una determinata regione viticola sono stati i punti di partenza per la selezione dei ceppi di lieviti e per i programmi di miglioramento. Comunque, è altamente improbabile di trovare in natura ceppi di lieviti che posseggono la combinazione ideale di caratteristiche enologiche. Negli anni seguenti alla pubblicazione della sequenza del genoma di *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al. 1996), nuovi strumenti genetici hanno consentito la costruzione di ceppi di lieviti geneticamente modificati. Attualmente, numerosi laboratori di ricerca di tutto il mondo hanno ottenuto ceppi in grado di migliorare per esempio la performance della fermentazione, l'efficienza e la qualità organolettica del vino. E' stato attentamente valutato il loro comportamento in condizioni enologiche. L'introduzione futura di lieviti GM richiede anche, in accordo con le leggi attuali, una valutazione dettagliata sulla sicurezza e sull'impatto ambientale e probabilmente i ceppi ottenuti con il self-cloning, usando materiale genetico derivante dall'ospite, verranno approvati. Comunque, gli atteggiamenti critici dei consumatori riguardo l'uso di lieviti GM per la produzione del vino non sono cambiati negli ultimi 10 anni e questa è la ragione principale per cui nell'industria enologica non si usano ceppi ricombinanti.

Questo lavoro fa un'analisi globale dei progressi recenti riguardanti le implicazioni dell'uso di ceppi GM nell'industria enologica. Abbiamo considerato diversi aspetti, quali le strategie usate per la costruzione di ceppi nel rispetto delle leggi in vigore, la valutazione dei rischi ambientali riguardanti il rilascio di ceppi GM, i metodi più importanti per il rilevamento del DNA ricombinante e delle proteine, e le ragioni che sono alla base dell'atteggiamento critico dei consumatori nei confronti dell'uso dei ceppi GM.

### **Selezione dei ceppi di lieviti commerciali**

Recenti scoperte hanno mostrato che i residui contenuti all'interno di una delle prime giare di vino rinvenute in Egitto contenevano DNA ribosomiale di *S. cerevisiae*, indicando che sin dal 3150 a.C. questo lievito è il responsabile della fermentazione del vino (Cavaliere et al. 2003). La selezione nel corso di millenni può aver creato caratteristiche enologiche interessanti, che però non erano molto diffuse, né si trovavano combinate in un unico ceppo. La selezione clonale di ceppi selvatici di *Saccharomyces* isolati in natura derivanti da aree viticole di interesse è sempre il punto di partenza per un programma di selezione. I lieviti starter selezionati sono attualmente molto diffusi poiché presentano ottime caratteristiche fermentative ed enologiche, contribuendo così sia ad una standardizzazione del processo fermentativo che alla qualità del vino. Attualmente, sono disponibili circa 150 diversi ceppi di lieviti, rappresentati principalmente da *S. cerevisiae*. Considerando la tendenza attuale nella produzione di vini di alta qualità e con proprietà particolari, occorre soddisfare la richiesta degli enologi per "lieviti speciali per caratteristiche particolari" (Mannazzu et al. 2002; Pretorius 2000; Romano et al. 2003b).

La definizione di un'adeguata strategia di selezione deve sempre dipendere dai tratti che un lievito dovrebbe contenere e dal numero di ceppi da controllare. I composti sintetizzati possono variare da ceppo a ceppo, in particolare tra diverse specie di lieviti. Vennero valutate numerose caratteristiche enologiche (tabella 1). I dati di tipo tecnologico possono essere ottenuti monitorando l'andamento della fermentazione e i tratti quantitativi sono determinati con analisi chimica alla fine della fermentazione.

La scoperta di ceppi che posseggono la combinazione ideale di caratteristiche enologiche è altamente improbabile; quindi la selezione dei ceppi venne estesa ai lieviti non-*Saccharomyces*, per esempio *Candida*, *Kloeckera*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* o *Rhodotorula*. Sebbene le specie non-*Saccharomyces non siano* competitive alle condizioni enologiche soprattutto perché non hanno un'elevata energia di fermentazione e posseggono una minore resistenza allo stress rispetto a *S. cerevisiae*, l'utilizzo di miscele di colture starter o le fermentazioni successive (per esempio *Candida canterellii* / *S. cerevisiae*) hanno avuto successo per guidare le fermentazioni verso la produzione di glicerolo e di minor acido acetico (Toro and Vazquez 2002). I lieviti *Torulasporea delbrueckii* e *Candida stellata* sono considerati positivamente per il loro contributo di caratteristiche organolettiche positive, mentre i lieviti apiculati come *Kloeckera apiculata* hanno un'influenza negativa sulla qualità del vino dovuta alla formazione di acido acetico e etil acetato associati alla bassa produzione di etanolo (Ciani e Maccarelli 1998).

Numerosissime studi riportano l'influenza benefica e dannosa dei lieviti non-*Saccharomyces* sui composti volatili nel mosto cambiando le varietà di uva (Ciani and Maccarelli 1998; Clemente-Jimenez et al. 2004; Granchi et al. 2002; Mingorance-Cazorla et al. 2003; Plata et al. 2003; Romano et al. 2003c) e si trovarono notevoli differenze anche nell'ambito di ceppi commerciali o autoctoni di *S. cerevisiae* (Patel and Shibamoto 2003; Romano et al. 2003a; Steger and Lambrechts 2000).

I ceppi non-*Saccharomyces* producono e rilasciano numerosi enzimi, come la pectinasi (che aumenta l'estrazione del succo, migliora la chiarifica e facilita la filtrazione), le  $\beta$ -glicosidasi (che idrolizzano i precursori non volatili glicosidici aromatici dell'uva), le proteasi (che migliorano la chiarifica), le esterasi (che contribuiscono alla formazione dell'aroma) o le lipasi (che degradano i lipidi dell'uva o derivanti dalle reazioni di autolisi dei lieviti), che interagendo con i composti precursori presenti nell'uva contribuiscono a estrarre l'aroma varietale e a migliorare la vinificazione (Esteve-Zarzoso et al. 1998; Fernandez et al. 2000; Fleet and Heard 1993; Otero et al. 2003). *S. cerevisiae* non produce

molti enzimi nel corso della vinificazione; il proprio contributo è limitato alla produzione della  $\beta$ -glicosidasi (Restuccia et al. 2002; Rodriguez et al. 2004). I lieviti non-*Saccharomyces* sono disponibili commercialmente, per esempio le cellule immobilizzate di *Schizosaccharomyces pombe* (ProMalic, commercializzato da PROENOL) per la disacidificazione del mosto ottenuta dalla metabolizzazione dell'acido malico (Silva et al. 2003).

### L'ingegneria genetica applicata ai ceppi di *S. cerevisiae*

Le esigenze in continua evoluzione delle pratiche legate alla vinificazione determinano una richiesta crescente di ceppi specializzati di *S. cerevisiae* con un'ampia gamma di proprietà ottimali e innovative. Il miglioramento genetico di ceppi industriali tramite l'ingegneria genetica classica (per esempio, la mutagenesi o la fusione di protoplasti) ha lasciato il passo negli ultimi 20 anni alle tecnologie del DNA ricombinante.

La pubblicazione del genoma completo di *S. cerevisiae* (Goffeau et al. 1996), unitamente alle tecnologie del DNA ricombinante, hanno dato un notevole impulso alla genetica molecolare, alla fisiologia e biotecnologia e ha reso possibile la costruzione di ceppi commerciali specializzati, principalmente tramite l'espressione di geni eterologhi o tramite il dosaggio di geni alterati (overespressione o delezione).

Gli obiettivi più importanti del miglioramento dei ceppi riguardano il miglioramento della tecnologia e della qualità della vinificazione, come per esempio un buon andamento della fermentazione, una maggiore tolleranza all'etanolo, una migliore utilizzazione degli zuccheri ed assimilazione dell'azoto e il miglioramento delle caratteristiche organolettiche (Blondin and Dequin 1998; Dequin 2001; Dequin et al. 2003; Pretorius 2000; Pretorius and Bauer 2002; Pretorius et al. 2003) (Tabella 2).

In genere, il materiale genetico utilizzato per la costruzione di microorganismi coinvolti nella fermentazione di alimenti dovrebbe provenire dalle stesse specie (self-cloning) o organismi GRAS (generalmente considerati sicuri) aventi alle spalle una storia di utilizzo sicuro, mentre occorre evitare l'uso delle sequenze di DNA derivanti da specie tassonomicamente vicine ma imparentate a specie patogene. In molti casi è stata usata l'espressione di geni eterologhi, dato che i geni di interesse erano isolati per esempio da *Lactobacillus casei* (LDH), *Lactobacillus plantarum* (pdc), *Bacillus subtilis* (padc), *Pediococcus acidilactici* (pedA), *Schizosaccharomyces pombe* (mae1 e mae2), il pioppo ibrido (4CL216), vite (vst1), *Aspergillus* sp. (egl1, abfB, xlnA, rhaA) o *Fusarium solani* (pelA), e altri, come ATF1, GPD1 o PGU1 derivati da *S. cerevisiae* (Tabella 2).

Nella maggior parte dei casi, abbiamo usato forti promotori e terminatori, che provenivano sia da enzimi glicolitici che sono costitutivi in condizioni fermentative (ADH1, ADH2, PGK) sia dal gene dell'actina (ACT). I lieviti industriali in genere non hanno marcatori auxotrofici (LEU2, URA2), quindi abbiamo usato il gene della resistenza alla cicloeximide CYH2 o i marker eterologhi della resistenza alla fleomicina o alla geneticina ble (Tn5) o G418 (Tn903). Non è consigliabile costruire ceppi industriali con vettori portanti copie multiple delle sequenze di interesse portatrici della resistenza alla ampicillina di *Escherichia coli* e marker della resistenza a sostanze medicinali, perché la possibilità del trasferimento del DNA alla microflora dell'intestino è possibile, anche se remota. Per i ceppi enologici di lieviti questo non dovrebbe essere rilevante, perché le cellule sono rimosse alla fine della fermentazione. I geni dei plasmidi dovrebbero essere integrati, dato che gli elementi inseriti devono essere stabili nell'organismo costruito; abbiamo usato questi metodi in pochi casi (Lilly et al. 2000; Malherbe et al. 2003; Volschenk et al. 2001). L'interruzione genica simultanea all'inserzione di marker auxotrofici porta all'ottenimento di una linea self-cloning (ILSI 1999), come è avvenuto con il gene GPD (Michnick et al. 1997), (ILSI 1999) è un approccio meno problematico per quanto riguarda la valutazione dell'accettabilità. La secrezione di proteine extracellulari, come la pediocina o la glucosio ossidasi veniva controllata dal segnale della secrezione del fattore  $\alpha$  del feromone dell'accoppiamento (MFa1s) (Malherbe et al. 2003; Schoeman et al. 1999).

Le modificazioni introdotte non dovrebbero cambiare le caratteristiche essenziali dell'ospite nel processo fermentativo. Nella maggior parte delle modificazioni genetiche, mostrammo che a parte il cambiamento metabolico introdotto, non c'erano differenze significative a livello delle caratteristiche enologiche tra i vini prodotti con ceppi commerciali e i ceppi modificati corrispondenti.

Al contrario, la maggiore produzione di glicerolo dovuta alla modulazione dell'espressione di *GPD* portò a una minore produzione di etanolo (calo di 1%, v/v) e all'accumulo di prodotti intermedi come il piruvato, l'acetato, l'acetoino e il 2,3-butandiolo, come conseguenza del cambiamento del flusso del carbonio (Michnick et al. 1997). La delezione del *ALD6* causò una minore produzione di acido acetico (dal 40 al 70% in meno) e indirizzò il flusso del carbonio verso il glicerolo, il succinato e il butandiolo (Remize et al. 2000). Si notò anche che l'acidificazione del mosto dovuta alla overespressione del *LDH* e la conseguente produzione di acido lattico L(+) dipende sia dal genoma di *S. cerevisiae* che dalla varietà di uva (Dequin et al. 1999).

I vini che contenevano l' 1.8–2.0% in meno di alcol derivavano da ceppi che presentavano una overespressione della glucosio ossidasi, poiché questo enzima produceva anche l' L-glucono- $\delta$ -lattone e l'acido gluconico dal glucosio (Malherbe et al. 2003).

Recentemente, un ceppo di lieviti del sakè è stato approvato come lievito self-cloning dal governo giapponese e non viene considerato lievito GM (Akada 2002). Una sostituzione genica attraverso un doppio passaggio venne usata per la costruzione di un ceppo privo di sequenze marker batteriche e resistenti a medicinali. Una mutazione puntiforme (Gly1250Ser) della sintetasi degli acidi grassi dei lieviti *FAS2* conferisce resistenza alla cerulenina ed è associata ad una maggiore produzione dell'etil caproato nel sakè giapponese. Venne usato un nuovo marker per la contro-selezione, costituito da un promotore per l'overespressione inducibile dal galattosio e dalla sequenza inibitrice della crescita (*GALp-GIN11*). Le cellule con il marker non crescono sul galattosio a causa dell'effetto inibitorio sulla crescita mediato dall'overespressione del *GIN11*. Un plasmide contenente il gene mutato *FAS2*, un marker resistente a sostanze medicinali e il marker per la contro-selezione venne integrato nel loco originale *FAS2*, e la perdita della sequenze del plasmide permise la crescita sul galattosio, che è possibile grazie alla perdita del *GALp-GIN11*. I ceppi contro-selezionati contenevano sia l'allele originale che quello mutato *FAS2*, ma non le sequenze plasmidiche e la differenza risultante tra il mutante e il ceppo originario era una sola base (Akada et al. 1999; Aritomi et al. 2004).

Questo tipo di contro-selezione può essere usata per l'introduzione di geni multipli, ad esempio per operare sulle vie metaboliche. Altre strategie, per esempio la mutagenesi sito-diretta del gene della solfito reduttasi *MET10*, vennero usate per costruire un lievito che producesse una minore quantità di solfito di idrogeno (Sutherland et al. 2003). L'allele *LEU4-1* conferisce resistenza alla 5,5,5-trifluoro-DL-leucina e i ceppi corrispondenti producono il doppio della quantità di alcol isoamilico in fermentazioni di laboratorio rispetto ai ceppi originari (Bendoni et al. 1999).

Il genoma di *S. cerevisiae* è stato il primo genoma eucariotico ad essere sequenziato e probabilmente sarà il primo organismo il cui trascrittoma, proteoma e metaboloma saranno capiti. Dato che molti tratti fisiologici sono la conseguenza di una complicata regolazione multigene, la comprensione del modo in cui i geni sono espressi nel corso della fermentazione darà un contributo alla conoscenza della genetica dei lieviti commerciali ed influirà sul miglioramento dei lieviti tramite l'ingegneria genetica. Lo stesso tipo di approccio è il più appropriato per mostrare che le modifiche introdotte non sono associate a effetti collaterali negativi, come la produzione di sostanze tossiche.

In futuro ceppi specifici potrebbero servire da riserva di geni naturali per i programmi di miglioramento, poiché collegare i fenotipi osservati ad un'analisi di espressione globale fornisce ulteriori informazioni che potrebbero essere utili per la costruzione di ceppi di lieviti self-cloning. I geni potrebbero essere separati dai loro sistemi di controllo di regolazione e indotti solo in condizioni particolari di fermentazione. Simili ceppi di *S. cerevisiae* potrebbero ad esempio essere ceppi che posseggono l'attività  $\beta$ -glicosidasi (Rodriguez et al. 2004) o la capacità di ridurre la concentrazione di rame nel mosto per mezzo di un maggiore accumulo intracellulare (Brandolini et al. 2002), ceppi privi dell'attività solfito reduttasi (Mendes-Ferreira et al. 2002; Spiropoulos et al. 2000), o ceppi che producono basse quantità di acido acetico (Romano et al. 2003a).

### **Regolamenti riguardanti gli organismi geneticamente modificati per uso alimentare**

Nel maggio 1997, divenne operativo il regolamento europeo EC258/97 sugli alimenti nuovi e gli ingredienti nuovi (EC1997) ed include gli alimenti e gli ingredienti contenenti o costituiti da organismi geneticamente modificati (OGM) o prodotti da organismi geneticamente modificati, anche se non sono



presenti direttamente nel cibo. La sicurezza di un alimento derivante da un organismo geneticamente modificato doveva essere paragonata con l'alimento più simile che avesse una storia di utilizzo sicuro. Questo significa che, se un cibo derivante da un OGM è sostanzialmente equivalente all'originario, esso è altrettanto sicuro rispetto all'alimento corrispondente convenzionale e dovrebbe essere considerato come tale, mentre eventuali differenze devono essere analizzate dal punto di vista tossicologico, analitico e nutrizionale.

La conoscenza dettagliata sia delle caratteristiche generali che della genetica degli organismi, la fonte dei geni trasferiti e la funzione dei geni modificati è essenziale per questa valutazione. Considerando che il risultato finale di una modificazione genetica è basato su processi che sono controllati da numerosi geni e la funzione di molti geni è ancora poco conosciuta, si stanno valutando metodi per l'identificazione e la caratterizzazione di effetti non voluti su scala genomica, proteomica e metabolomica per un uso di routine (Corpillo et al. 2004; Kuiper and Kleter 2003; Kuiper et al. 2002). La "Novel Food Regulation" è stata di recentemente emendata da tre nuovi regolamenti riguardanti organismi geneticamente modificati EC1829/2003 (EC 2003a), 1830/2003 (EC 2003b) e 65/2004 (EC 2004), che definiscono le procedure per l'autorizzazione, l'etichettatura e la rintracciabilità. Il regolamento 1829/2003 descrive le informazioni da dare a coloro che intendono porre un prodotto sul mercato. Il richiedente deve dimostrare che (1) il cibo non ha effetti negativi sulla salute umana e degli animali e sull'ambiente, (2) non inganna il consumatore e (3) che la differenza con il cibo che verrebbe sostituito non è tale da rappresentare uno svantaggio nutrizionale per il consumatore. Tali prodotti devono essere controllati prima di essere messi sul mercato, redigendo anche un dossier tecnico che fornisce informazioni dettagliate sui risultati delle ricerche per valutare l'impatto degli OGM sulla salute umana e sull'ambiente. Ciò viene definito nell'Allegato III della Direttiva 2001/18/EC (EC 2001) riguardante il rilascio nell'ambiente di organismi geneticamente modificati da porre sul mercato o per qualsiasi altro proposito, che riprendeva il precedente Council Directive 90/220/EC (EC 1990). Dato che l'immissione di un prodotto sul mercato equivale all'immissione dello stesso nell'ambiente, occorre effettuare anche una valutazione di rischio ambientale in accordo con l'Allegato II della Direttiva 2001/18/EC (EC 2002). Il prodotto viene quindi sottoposto alla procedura di approvazione da parte della European Food Safety Agency (EFSA) in Bruxelles, della Commissione Europea e degli stati membri. L'etichettatura è obbligatoria, anche se il DNA ricombinante o la proteina corrispondente non sono presenti nel prodotto finale. Gli alimenti che contengono OGM devono riportare in etichetta "geneticamente modificati" o "prodotti da geneticamente modificati (nome dell'ingrediente)". L'etichettatura non è richiesta per quei cibi che contengono tracce di OGM, che sono tecnicamente inevitabili, in una percentuale minore della soglia del 0.9% degli ingredienti del cibo (relazione tra ingrediente ricombinante e non ricombinante). Mentre la Novel Food Regulation era basata sul principio di evidenza, con un'etichettatura obbligatoria per i cibi contenenti più dell'1% di OGM, il regolamento EC1829/2003 si basa sul principio di utilizzo, rendendo obbligatoria la dichiarazione dell'uso di OGM nella produzione del cibo, ma la dichiarazione non si basa sulla rilevazione del DNA ricombinante o proteine nel prodotto finale.

In base ai Regolamenti N. 1830/2003 (EC 2003b) e 65/2004 (EC 2004), gli OGM e i prodotti derivati devono essere rintracciabili nel corso di tutti gli stadi, dalla produzione all'immissione sul mercato, per facilitare un eventuale ritiro dei prodotti, se questo fosse necessario.

I regolamenti americani non prevedono l'etichettatura obbligatoria degli OGM, perché non sono considerati diversi dagli altri cibi in modo significativo o comunque non danno maggiori problemi di sicurezza rispetto ai cibi derivanti dagli incroci tradizionali (Federal Register of May 29, 1992 57 FR 22984). La FDA utilizza il termine "cibo bioingegnerizzato" per indicare quei prodotti derivati dalla tecnologia GM. (Federal Register of May 29, 1992 57 FR 22984).

E' richiesta la valutazione e l'approvazione prima della vendita, quando il gene introdotto codifica un prodotto che non è stato mai contenuto in nessun altro cibo, come ad esempio i nuovi agenti dolcificanti. Le norme di etichettatura degli alimenti in generale si applicano anche agli alimenti che provengono dall'applicazione di biotecnologie. Un'etichetta deve "rivelare tutti i fatti materiali" di un cibo, per esempio se il cibo bioingegnerizzato è significativamente diverso dal suo corrispondente

naturale, se ha proprietà nutrizionali significativamente diverse, o se è presente un potenziale allergene.

I vini prodotti con i lieviti GM dovrebbero essere considerati sostanzialmente equivalenti ai vini "tradizionali". I composti come il glicerolo, l'acido malico e lattico sono sostanze naturali e il loro contenuto nel vino verrebbe semplicemente reso ottimale dal punto di vista delle proprietà organolettiche. Inoltre, l'utilizzo di ceppi di che esprimono gli enzimi pectolitici comporta una vinificazione più economica e più facile senza alterare le caratteristiche del prodotto finale, poiché l'aggiunta di enzimi commerciali è una normale pratica enologica. Comunque occorre valutare attentamente caso per caso.

### **La valutazione dei rischi ambientali derivanti dall'uso di lieviti geneticamente modificati**

L'utilizzo futuro di lieviti geneticamente modificati dipenderà dalla possibilità di valutare i rischi potenziali associati alla loro introduzione nell'ecosistema.

Il controllo della diffusione dei ceppi industriali nei vigneti vicini alle cantine dove tali ceppi sono stati usati nel corso degli ultimi 5-10 anni è stato usato come modello sperimentale per giudicare il destino dei lieviti geneticamente modificati nell'ambiente naturale. Questi studi, effettuati nel corso di un periodo di 3 anni in alcuni vigneti situati nel Portogallo del nord e nel sud della Francia, hanno rivelato che la diffusione dei lieviti commerciali è limitata a distanze e a periodi limitati ed è favorita dalla presenza di rigagnoli di acqua. In campioni presi a distanze dalle cantine superiori a 100 metri, meno del 2% della microflora aveva un profilo genetico identico a quello dei lieviti commerciali. Nei campioni prelevati in prossimità delle cantine e di rigagnoli d'acqua, la percentuale di lieviti commerciali era del 10-43%. La maggior parte (94%) dei lieviti commerciali furono trovati ad una distanza compresa tra i 10 e i 200 metri dalla cantina.

I lieviti commerciali, nonostante il loro utilizzo intensivo annuale, non riescono a crescere bene nei vigneti e non sono predominanti sulla flora indigena, essendo la loro presenza nei vigneti caratterizzata da fluttuazioni naturali di comparsa e scomparsa periodica (Valero, comunicazione personale).

E' stato valutato il comportamento dei lieviti geneticamente modificati all'interno delle popolazioni microbiche di una determinata cantina e di un vigneto in serra. Dal lievito commerciale VIN13, vennero costruiti diversi ceppi geneticamente modificati che contenevano geni eterologhi che codificavano l' $\alpha$ -amilasi (*LKA1*), l'endo- $\beta$ -1,4-glucanasi (*end1*), la xilanasi (*XYN4*) o la pectato liasi (*peh1*) sotto il controllo di forti promotori e terminatori e usando marker della resistenza *kanMX* o *SMR-410*. Dopo un'iniziale caratterizzazione della flora di lieviti autoctoni di un nuovo impianto di vigneto in serra, le piante di quattro blocchi (ognuno dei quali era composto da 20 piante) venivano irrorate con sospensioni di lieviti contenenti  $2.5 \times 10^6$  CFU/ml in base ad uno schema precedentemente definito. Benché la concentrazione iniziale di cellule fosse molto alta, solo pochi ceppi di *S. cerevisiae* furono isolati nel corso dei controlli settimanali delle popolazioni di lieviti sull'uva, sulle foglie, sui tralci e sul suolo. I risultati (1) non hanno evidenziato una differenza significativa tra la presenza dei lieviti modificati e la presenza di lieviti commerciali parentali, anche per quei lieviti GM che si pensava avessero un vantaggio selettivo nei confronti dei ceppi parentali (secernevano glucanasi e pectinasi) dimostrando che quelle modifiche non conferivano alcun vantaggio di adattamento; (2) la popolazione in generale sulle piante irrorate era molto simile a quella delle viti non trattate, concludendo quindi che l'equilibrio ecologico della flora di un vigneto in un sistema confinato non è influenzato né dai lieviti commerciali né dai lieviti GM; (3) non vennero rilevate differenze significative tra i ceppi coinvolti nella fermentazione di micro-vinificazioni spontanee (Bauer et al. 2003).

Il trasferimento orizzontale di DNA può avvenire tra le specie di lieviti, generando ibridi che possiedono entrambi i corredi cromosomici parentali (Marinoni et al. 1999). Si osservò la trasformazione naturale del lievito del pane con il DNA plasmidico in condizioni non artificiali di deperimento, quando le cellule non in fase di crescita metabolizzano gli zuccheri in assenza di altri nutrienti. Questo meccanismo è stato valutato come un meccanismo evolutivo che contribuisce alla diversità genetica, essendo uno scenario possibile negli ambienti naturali (Nevoigt et al. 2000). Al

momento, si stanno svolgendo degli studi per valutare la somiglianza tra il trasferimento orizzontale e verticale di geni tra ceppi commerciali modificati alle condizioni di vinificazione (Bauer et al. 2003). Un altro obiettivo, ugualmente importante per la valutazione della sicurezza dell'uso dei lieviti GM nella produzione del vino, è la valutazione del rilascio potenziale e della stabilità del DNA ricombinante e della proteina corrispondente nel corso della fermentazione alcolica e della maturazione del vino sui lieviti. L'autolisi delle cellule dei lieviti è caratterizzata dalla perdita della permeabilità della membrana, l'idrolisi di macromolecole cellulari come il DNA e le proteine, seguito dalla diffusione di questi composti nell'ambiente. Gli esperimenti di autolisi vennero condotti in mezzi di coltura di laboratorio e mostrarono che l'incubazione a 40°C per 10-14 giorni ad un pH tra 4.0–7.0 portava ad una degradazione del 55% del DNA totale, associata ad una perdita di deossiribonucleotidi e di pochi polinucleotidi nell'ambiente extracellulare (Zhao and Fleet 2003).

### **Metodi per il rilevamento del DNA geneticamente modificato o delle proteine**

Nei vini sperimentali prodotti con lieviti GM, non sono ancora disponibili dati sulla presenza o sulla concentrazione delle cellule ricombinanti, DNA o proteine. E' stato stimato che il numero di cellule ricombinanti per bottiglia sia piuttosto basso (da 1 a 10 cellule), dato che vengono rimosse con la filtrazione o inattivate con trattamenti termici. Questo implica che si debbano utilizzare tecniche molto sensibili per individuare il DNA ricombinante nel corso della vinificazione o nel prodotto finale. In base ai recenti Regolamenti Europei N. 1829/2003 e 1830/2003, sono necessari metodi analitici affidabili e precisi per quei cibi contenenti OGM o prodotti da OGM. Nel corso degli ultimi anni, i metodi basati sul DNA o sulle proteine sono stati sviluppati e applicati soprattutto per il rilevamento della soia transgenica e del mais transgenico e dei loro derivati.

Per l'analisi delle proteine, sono stati sviluppati specifici anticorpi monoclonali e policlonali per il rilevamento immunochimico, l'analisi Western blot e la tecnica ELISA. Le analisi immunocromatografiche, Reveal CP4 e Reveal Cry9C rilevano la 5-enol-piruvil-sichimmato-3-fosfato sintetasi (EPSPS), derivato dal ceppo *Agrobacterium* sp. CP4 che conferisce resistenza all'erbicida glifosato alla soia e al mais, la proteina Cry *Bacillus thuringiensis* che protegge dagli insetti le piante, i semi e la granella di mais. Entrambi i kit, commercializzati da Neogen (<http://www.neogen.com>), rilevano la presenza di OGM in 5-20 minuti ad un prezzo basso ed hanno una sensibilità elevata (<0.125% della frazione di OGM); entrambi sono test affidabili per il controllo della distribuzione dei prodotti derivanti dalle biotecnologie (Ahmed 2002; Auer 2003; Brett et al. 1999; Rogan et al. 1999; Stave 1999; van Duijn et al. 1999, 2002).

Si possono usare i metodi basati sulla PCR per il rilevamento di OGM grazie all'amplificazione di elementi genetici presenti nei più comuni OGM in Europa. I limiti del rilevamento sono compresi tra 20 pg e 10 ng di DNA, che corrisponde a 0.0001–1% della massa di OGM (Ahmed 2002; Auer 2003; ILSI 1998, 2001; Meyer 1999; van Duijn et al. 1999, 2002).

La PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) si fonda sull'amplificazione parallela del transgene e del gene endogeno corrispondente che controlla sia l'assenza di inibizione sia l'amplificabilità del DNA bersaglio del campione. La quantificazione è possibile paragonando le concentrazioni del prodotto PCR derivanti dalle amplificazioni con proporzioni variabili del DNA bersaglio/DNA standard.

Questo approccio venne testato con successo in studi effettuati da 12 laboratori europei e permise il rilevamento dello 0.1% di DNA da OGM (Hübner et al. 1999; Lüthy 1999). Un metodo ibrido che prevede l'uso di PCR quantitativa accoppiata alla tecnologia del DNA array riuscì a testare numerosi alimenti a livelli di 0.1% di GM (Rudi et al. 2003). Le tecnologie PCR in tempo reale sono molto sensibili e adatte per una quantificazione precisa del DNA a dosi basse, misurando la produzione degli ampliconi durante la fase log-lineare dell'amplificazione PCR (Ronning et al. 2003; Vaitilingom et al. 1999). La quantificazione dei prodotti PCR tramite le prove di immunoassorbimento legate agli enzimi (PCR-ELISA) è stata descritta di recente come molto sensibile e poco costosa in alternativa alla PCR in tempo reale (Liu et al. 2004; Petit et al. 2003).

Mentre gli alimenti grezzi sono facilmente identificabili come OGM, l'identificazione risulta più difficile quando un alimento viene lavorato: il DNA può essere degradato e possono essere presenti sostanze che interferiscono con la reazione PCR. Divenne essenziale una valutazione delle procedure fatta da

diversi laboratori e si determinarono degli standard internazionali (DIN, ISO, EN) riguardanti il campionamento (DIN 2003), l'estrazione del DNA (DIN 2002b), il rilevamento del DNA da OGM (DIN 2002a) e delle proteine da OGM (DIN 2002c).

L'evoluzione tecnologica degli OGM, le modifiche dei regolamenti dei vari Paesi e l'adozione di linee guida sulla valutazione del rischio continueranno a guidare lo sviluppo di tecniche analitiche da applicare agli OGM. Nuovi metodi di caratterizzazione basati sulla trascrittómica, proteómica e metabolómica sono stati indicati come i metodi più adeguati per lo studio degli effetti secondari (Kuiper e Kleter 2003) e l'analisi del proteoma dimostrò una sostanziale equivalenza tra un pomodoro geneticamente modificato virus-resistente e gli ibridi non modificati (Corpillo et al. 2004).

### **L'atteggiamento del consumatore**

Nel 1988, la Gist-Brocade ottenne un ceppo in cui i geni che codificavano la permeasi del maltosio e la maltasi erano sostituiti con un set più efficiente di geni derivanti da un altro ceppo. Dato che non era presente alcun DNA non-*Saccharomyces*, le autorità inglesi diedero l'autorizzazione nel 1989. Alcuni anni dopo, un ceppo ricombinante di birra, ottenuto nel 1993 dalla Brewing Research International, venne anch'esso approvato. Questo ceppo di *S. cerevisiae* conteneva un gene dell'amilasi derivante da *Saccharomyces diastolicus* insieme ad un gene per la resistenza al rame. Poiché l'industria non ha voluto affrontare una possibile reazione negativa dei consumatori, nessun ceppo è stato prodotto industrialmente (Moseley 1999). Per le stesse ragioni, negli ultimi anni nessun ceppo enologico geneticamente modificato è stato usato industrialmente, sebbene siano stati sviluppati numerosi ceppi, come viene mostrato nella tabella 2, in seguito alla crescente richiesta di innovazione e diversità da parte dell'industria delle bevande fermentate.

L'indagine Eurobarometer, iniziata nei primi anni 90, è una delle più importanti indagini sull'opinione pubblica (in termini del numero di persone intervistate) che controlla i cambiamenti dell'atteggiamento dei consumatori nei confronti della biotecnologia in diversi Paesi europei. L'ultima indagine del 2001 (Anonymous 2001) su 16,000 persone europee ha evidenziato un'attitudine positiva nei riguardi della scienza e tecnologia, mentre il progresso scientifico non è considerato la panacea universale per tutti i problemi. La quasi totalità degli intervistati (95%) rispose che il proprio atteggiamento negativo nei confronti del consumo di alimenti geneticamente modificati era dovuto alla impossibilità di scelta di prodotti alternativi e secondo il 60% degli intervistati gli OGM sono potenzialmente dannosi per l'ambiente. Considerando che molti concetti scientifici non sono conosciuti dal pubblico, la consapevolezza del rischio da parte del consumatore è molto diversa da quella degli esperti, che rendendo il dibattito sulle tecnologie transgeniche complesso, accresce la sfiducia sulla biotecnologia e sugli OGM. I timori dei critici riguardano i cambiamenti delle qualità nutrizionali degli alimenti, la tossicità potenziale, la resistenza agli antibiotici, la potenziale allergenicità e cancerogenità del consumo di OGM, l'inquinamento ambientale, il trasferimento involontario di geni, la possibile creazione di nuovi virus e tossine, preoccupazioni religiose, culturali e etiche, ma anche la paura di ciò che non si conosce (Uzogara 2000).

Come si vede in Fig. 1, le preoccupazioni dei consumatori riguardanti le modificazioni genetiche dipendevano da molti fattori. Per quanto riguarda gli OGM, i benefici erano percepiti come marginali o astratti, come capitò per la birra, i pomodori, le fragole e il salmone. Qualsiasi modifica che riguardava gli animali o l'uomo comportava grandi preoccupazioni etiche, mentre le applicazioni mediche nel campo farmaceutico o nel campo delle malattie ereditarie erano ritenute le più importanti (Frewer 2003; Frewer et al. 1997).



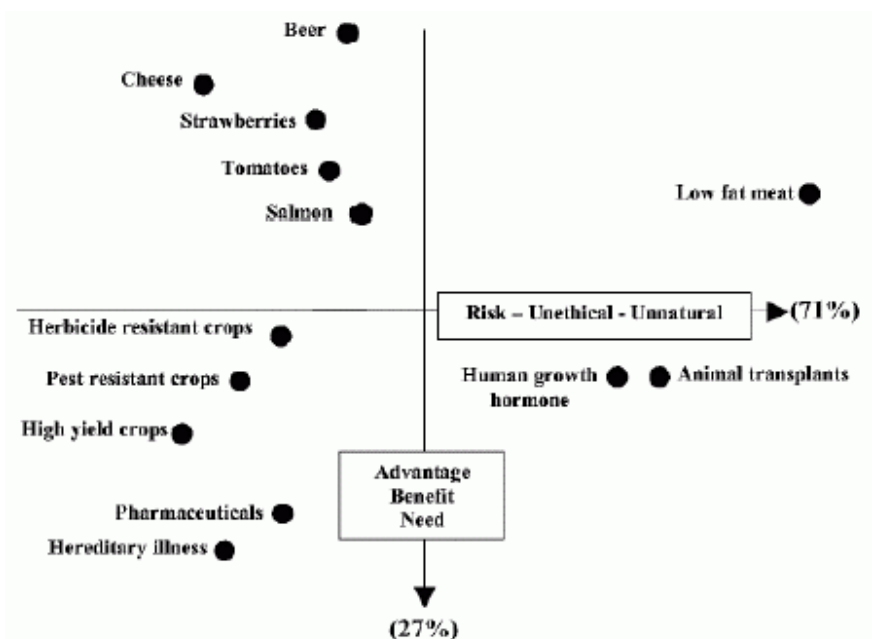


Fig. 1 L'opinione pubblica sul rapporto rischi/benefici dei cibi geneticamente modificati (tratto da Frewer 2003)

In conclusione, la recente disponibilità di regolamenti che definiscono i requisiti per la costruzione e la valutazione della sicurezza degli organismi geneticamente modificati, ma anche l'etichettatura dei prodotti derivanti da OGM rappresenta un passo decisivo per una scelta consapevole e informata del consumatore e il futuro prossimo darà un'indicazione della validità o meno di questa strategia per cambiare l'atteggiamento negativo del consumatore nei riguardi degli OGM. La costruzione di organismi geneticamente modificati dovrebbe essere ottenuta con strategie basate sul self-cloning. In questo contesto, ceppi specifici in ambienti di vinificazione, con caratteristiche enologiche positive, potrebbero fungere da riserva di geni naturali per la costruzione di ceppi, dando una nuova dimensione all'esplorazione della diversità dei ceppi.

**Ringraziamenti** Questo studio è stato finanziato dai progetti ENOSAFE (No. 762, Programa AGRO, medida 8) Instituto Nacional de Investigação Agrária and LeVini (POCTI/AGR/56102/2004) Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal.

### Bibliografia

- Ahmed FE (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. Trends Biotechnol 20:215–223
- Akada R (2002) Genetically modified industrial yeast ready for application. J Biosci Bioeng 94:536–544
- Akada R, Matsuo K, Aritomi K, Nishizawa Y (1999) Construction of recombinant sake yeast containing a dominant FAS2 mutation without extraneous sequences by a two-step gene replacement protocol. J Biosci Bioeng 87:43–48
- Anonymous (2001) Europeans, Science and Technology (Eurobarometer 55.2), Brussels, European Opinion Research Group, available (April 2004) at [http://europa.eu.int/comm/research/public\\_opinion](http://europa.eu.int/comm/research/public_opinion)
- Aritomi K, Hirose I, Hoshida H, Shiigi M, Nishizawa Y, Kashiwagi S, Akada R (2004) Self-cloning yeast strains containing novel FAS2 mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake. Biosci Biotechnol Biochem 68:206–214

- Auer CA (2003) Tracking genes from seed to supermarket: techniques and trends. *Trends Plant Sci* 8:591–597
- Bauer F, Dequin S, Pretorius I, Shoeman H, Wolfaardt MB, Schroeder MB, Grossmann MK (2003) The assessment of the environmental impact of genetically modified wine yeast strains. Proceedings of the “Actes de 83ème Assemblée Générale de l’O.I.V”
- Becker JW, Armstrong GO, Van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, Pretorius IS (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* 4:79–85
- Bendoni B, Cavalieri D, Casalone E, Polsinelli M, Barberio C (1999) Trifluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine. *FEMS Microbiol Lett* 180:229–233
- Blondin B, Dequin S (1998) Yeast, wine and genetic engineering. *Biofutur* 182:16–20
- Brandolini V, Tedeschi P, Capece A, Maietti A, Mazzotta D, Salzano G, Paparella A, Romano P (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine strains differing in copper resistance exhibit different capability to reduce copper content in wine. *World J Microbiol Biotechnol* 18:499–503
- Brett GM, Chambers SJ, Huang L, Morgan MRA (1999) Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* 10:401–406
- Caridi A, Cufari A, Ramondino D (2002) Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *J Gen Appl Microbiol* 48:261–267
- Carstens M, Vivier MA, Van Rensburg P, Pretorius IS (2003) Overexpression, secretion and antifungal activity of the *Saccharomyces cerevisiae* chitinase. *Ann Microbiol* 53:15–28
- Cavalieri D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J Mol Evol* 57:S226–S232
- Ciani M, Maccarelli F (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* 14:199–203
- Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martinez-Rodriguez S, Las Heras-Vazquez FJ, Rodriguez-Vico F (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* 21:149–155
- Corpillo D, Gardini G, Vaira AM, Basso M, Aime S, Accotto GR, Fasano M (2004) Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato. *Proteomics* 4:193–200
- Dequin S (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:577–588
- Dequin S, Baptista E, Barre P (1999) Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid. *Am J Enol Vitic* 50:45–50
- Dequin S, Salmon JM, Nguyen HV, Blondin B (2003) Wine yeasts. In: Boekhout T, Robert B (eds) *Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects*. Berhr’s Verlag, Hamburg, Germany, pp 389–412
- DIN (2002a) (Norm-Entwurf) DIN EN ISO 21569, Ausgabe:2002-12. Lebensmittel-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten-Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (ISO/DIS 21569:2002); Deutsche Fassung prEN ISO 21569:2002. Deutsches Institut für Normung
- DIN (2002b) (Norm-Entwurf) DIN EN ISO 21571, Ausgabe:2002-12. Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Nukleinsäureextraktion (ISO/DIS 21571:2002); Deutsche Fassung prEN ISO 21571:2002. Deutsches Institut für Normung
- DIN (2002c) (Norm-Entwurf) DIN EN ISO 21572, Ausgabe:2002–03. Lebensmittel-Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und daraus hergestellten Erzeugnissen-Proteinverfahren (ISO/DIS 21572:2002); Deutsche Fassung prEN ISO 21572:2002. Deutsches Institut für Normung
- DIN (2003) (Norm-Entwurf) DIN EN ISO 21568, Ausgabe: 2003-07. Lebensmittel-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten-Probenahme (ISO/DIS 21568:2003);

- Deutsche Fassung prEN ISO 21568:2003. Deutsches Institut für Normung du Toit C, Pretorius I (2000) Microbial spoilage and preservation of wine: using new weapons from nature's own arsenal—a review. *S Afr J Enol Vitic* 21:74–96
- EC (1990) Directive 90/220/EEC of the European Council of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. *Official Journal of the European Communities* L117, 08.05.1990:15–27
- EC (1997) Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal of the European Communities* L43, 14.02.1997:1–6
- EC (2001) Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities* L106, 12.3.2001:1–38
- EC (2002) Commission Decision 2002/623/EC of 24 July 2002 establishing guidance noted supplementing Annex II to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities* L200, 30.7.2002:20–32
- EC (2003a) Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Communities* L268, 18.10.2003:1–23
- EC (2003b) Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Official Journal of the European Communities* L268, 18.10.2003:24–28
- EC (2004) Regulation (EC) No 65/2004 of 14 January 2004 establishing a system for the development and assignment of unique identifiers for genetically modified organisms. *Official Journal of the European Communities* L10, 16.1.2004:5–10
- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramon D, Querol A (1998) The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int Microbiol* 1:143–148
- Esteve-Zarzoso B, Gostincar A, Bobet R, Uruburu F, Querol A (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). *Food Microbiol* 17:553–562
- Fernandez M, Ubeda JF, Briones AI (2000) Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int J Food Microbiol* 59:29–36
- Fleet GH, Heard GM (1993) Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood, Philadelphia, PA, pp 27–55
- Frewer L (2003) Societal issues and public attitudes towards genetically modified foods. *Trends Food Sci Technol* 14:319–332
- Frewer L, Howard C, Shepherd R (1997) Public concerns about general and specific applications of genetic engineering: risk, benefit and ethics. *Sci Technol Human Values* 22:98–124
- Ganga MA, Pinaga F, Valles S, Ramon D, Querol A (1999) Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int J Food Microbiol* 47:171–178
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274(5287):546, 563–7
- Gonzalez-Candelas L, Cortell A, Ramon D (1995) Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene. *FEMS Microbiol Lett* 126:263–269
- Gonzalez-Candelas L, Gil JV, Lamuela-Raventos RM, Ramon D (2000) The use of transgenic yeasts

- expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. *Int J Food Microbiol* 59:179–183
- Granchi L, Ganucci D, Messini A, Vincenzini M (2002) Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res* 2:403–407
- Guerra E, Mannazzu I, Sordi G, Tangherlini M, Clementi F, Fatichenti F (1999) Characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from the Italian region of Marche: hunting for new strains for local wine quality improvement. *Ann Microbiol Enzimol* 49:79–88
- Hübner P, Studer E, Lüthy J (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10:353–358
- ILSI (1998) Detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. International Life Science Institute Europe, Brussels
- ILSI (1999) Safety assessment of viable genetically modified microorganisms used in food—consensus guidelines reached at a workshop held in April 1999. Brussels International Life Science Institute Europe, Novel Food Task Force
- ILSI (2001) Method development in relation to regulatory requirements for the detection of GMOs in the food chain—summary report of a joint workshop held in December 2000; Prepared by the International Life Science Institute Novel Food Task Force in collaboration with the European Commission's Joint Research Centre (JRC) and ILSI International Food Biotechnology Committee
- Kuiper HA, Kleter GA (2003) The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified foods. *Trends Food Sci Technol* 14:277–293
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn H, Kok EJ (2002) Substantial equivalence—an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? *Toxicology* 181:427–431
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol* 66:744–753
- Liu G, Su W, Xu Q, Long M, Zhou J, Song S (2004) Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 15:303–306
- Lüthy J (1999) Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10:359–361
- Maifreni M, Comi G, Rondinini G (1999) Selection and oenological characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Tocai, Pinot and Malvasia grapes and musts of the Collio area. *Ann Microbiol Enzimol* 49:33–43
- Malherbe DF, du Toit M, Otero RRC, van Rensburg P, Pretorius IS (2003) Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:502–511
- Mannazzu I, Clementi F, Ciani M (2002) Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. In: Ciani M (ed) *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp 19–35
- Manzanares P, Orejas M, Gil JV, de Graaff LH, Visser J, Ramon D (2003) Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an alpha-L-rhamnosidase of enological interest. *Appl Environ Microbiol* 69:7558–7562
- Marinoni G, Manuel M, Petersen RF, Hvidtfeldt J, Sulo P, Piskur J (1999) Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J Bacteriol* 181:6488–6496
- Martinez-Rodriguez A, Carrascosa AV, Barcenilla JM, Pozo-Bayon MA, Polo MC (2001) Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiol* 18:183–191
- Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, Leão C (2002) Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *J Food Prot* 65:1033–1037
- Meyer R (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10:391–399



- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S (1997) Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* 13:783–793
- Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Martinez-Rodriguez S, Las Heras-Vazquez FJ, Rodriguez-Vico F (2003) Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol* 19:297–304
- Moseley BEB (1999) The safety and social acceptance of novel foods. *Int J Food Microbiol* 50:25–31
- Nevoigt E, Fassbender A, Stahl U (2000) Cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are transformable by DNA under non-artificial conditions. *Yeast* 16:1107–1110
- Otero RRC, Iranzo JFU, Briones-Perez AI, Potgieter N, Villena MA, Pretorius IS, van Rensburg P (2003) Characterization of the beta-glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Food Sci* 68:2564–2569
- Patel S, Shibamoto T (2003) Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine. *J Food Compos Anal* 16:469–476
- Perez-Coello MS, Perez AIB, Iranzo JFU, Alvarez PJM (1999) Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiol* 16:563–573
- Pérez-González JA, Gonzalez R, Querol A, Sendra J, Ramon D (1993) Construction of a recombinant wine yeast strain expressing  $\beta$ -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* 59:2801–2806
- Petit L, Baraige F, Balois AM, Bertheau Y, Fach P (2003) Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *Eur Food Res Technol* 217:83–89
- Plata C, Millan C, Mauricio JC, Ortega JM (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol* 20:217–224
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675–729
- Pretorius IS, Bauer FF (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol* 20:426–432
- Pretorius IS, du Toit M, van Rensburg P (2003) Designer yeasts for the fermentation industry of the 21<sup>st</sup> century. *Food Technol Biotechnol* 41:3–10
- Rainieri S, Pretorius IS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Ann Microbiol* 50:15–31
- Regodon JA, Perez F, Valdes ME, DeMiguel C, Ramirez M (1997) A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol* 14:247–254
- Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin S (1999) Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl Environ Microbiol* 65:143–149
- Remize F, Andrieu E, Dequin S (2000) Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg<sup>2+</sup> and mitochondrial K<sup>+</sup> acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 66:3151–3159
- Restuccia C, Pulvirenti A, Caggia C, Giudici P (2002) A beta-glucosidase positive strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must. *Ann Microbiol* 52:47–53
- Rodriguez ME, Lopes CA, Broock M, Valles S, Ramon D, Caballero AC (2004) Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J Appl Microbiol* 96:84–95
- Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR, Fuchs RL (1999) Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. *Food Control* 10:407–414
- Romano P, Monteleone E, Paraggio M, Marchese R, Caporale G, Carlucci A (1998) A methodological approach to the selection of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Food Technol Biotechnol* 36:69–74



- Romano P, Caruso M, Capece A, Lipani G, Paraggio M, Fiore C (2003a) Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts. *World J Microbiol Biotechnol* 19:311–315
- Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A (2003b) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86:169–180
- Romano P, Granchi L, Caruso M, Borra G, Palla G, Fiore C, Ganucci D, Caligiani A, Brandolini V (2003c) The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int J Food Microbiol* 86:163–168
- Ronning SB, Vaitilingom M, Berdal KG, Holst-Jensen A (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol* 216:347–354
- Rudi K, Rud I, Holck A (2003) A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res* 31(11):e62
- Salmon JM, Barre P (1998) Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol* 64:3831–3837
- Sanchez-Torres P, Gonzalez-Candelas L, Ramon D (1996) Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* abfB gene. *FEMS Microbiol Lett* 145:189–194
- Schoeman H, Vivier MA, Du Toit M, Dicks LMT, Pretorius IS (1999) The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:647–656
- Silva S, Ramon-Portugal F, Andrade P, Abreu S, Texeira MD, Strehaiano P (2003) Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am J Enol Vitic* 54:50–55
- Smit A, Otero RRC, Lambrechts MG, Pretorius IS, Van Rensburg P (2003) Enhancing volatile phenol concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 51:4909–4915
- Spiropoulos A, Tanaka J, Flerianos I, Bisson LF (2000) Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. *Am J Enol Vitic* 51:233–248
- Stave JW (1999) Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO—future needs. *Food Control* 10:367–374
- Steger CLC, Lambrechts MG (2000) The selection of yeast strains for the production of premium quality South African brandy base products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:431–440
- Sutherland CM, Henschke PA, Langridge P, Lopes MD (2003) Subunit and cofactor binding of *Saccharomyces cerevisiae* sulfite reductase—towards developing wine yeast with lowered ability to produce hydrogen sulfide. *Aust J Grape Wine Res* 9:186–193
- Toro ME, Vazquez F (2002) Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J Microbiol Biotechnol* 18:347–354
- Uzogara SG (2000) The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. *Biotechnol Adv* 18:179–206
- Vaitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P (1999) Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem* 47:5261–5266
- van Duijn G, van Biert R, Bleeker-Marcelis H, Peppelman H, Hessing M (1999) Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10:375–378
- van Duijn G, van Biert R, Bleeker-Marcelis H, van Boeijen I, Adan AJ, Jhakrie S, Hessing M (2002) Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods. *J AOAC Int* 85:787–791
- Vilanova M, Blanco P, Cortes S, Castro M, Villa TG, Sieiro C (2000) Use of a PGU1 recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. *J Appl Microbiol* 89:876–883
- Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Petzold B, Bauer F, Subden RE, Young RA, Lonvaud A, Denayrolles

- M, vanVuuren HJJ (1997) Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. Nat Biotechnol 15:253–257
- Volschenk H, Viljoen-Bloom M, Subden RE, van Vuuren HJJ (2001) Malo-ethanolic fermentation in grape must by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 18:963–970
- Zhao J, Fleet GH (2003) Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol 30:175–182

**Table 1** Oenological characteristics considered in the selection of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains (Brandolini et al. 2002; Caridi et al. 2002; Esteve-Zarzoso et al. 2000; Guerra et al. 1999; Maifreni et al. 1999; Mannazzu et al. 2002; Martinez-Rodriguez et al. 2001; Mendes-Ferreira et al. 2002; Perez-Coello et al. 1999; Rainieri and Pretorius 2000; Regodon et al. 1997; Romano et al. 1998; Steger and Lambrechts 2000)

Oenological characteristics	Comment
Fermentation vigour	Maximum amount of ethanol (% v/v) produced at the end of the fermentation Desirable: good ethanol production
Fermentation rate	Grams of CO <sub>2</sub> produced during the first 48 h of fermentation Desirable: prompt fermentation initiation
Mode of growth in liquid medium	Dispersed or flocculent growth, sedimentation speed
Foam production	Desirable: dispersed yeast growth during, but sedimentation at the end of fermentation Height of foam produced during fermentation Undesirable: increased foam production
Optimum fermentation temperature	Thermotolerance and cryotolerance is related to oenological properties Optimum fermentation temperature ranges between 18 and 28°C
Volatile acidity, acetic acid production	Selected strains should not release more than 100–400 mg/l during fermentation Undesirable: increased volatile acidity/acetic acid production
Malic acid degradation or production	Whether degradation of production is desirable depends on the characteristics of the must. Malic acid degradation varies between 0 and 20% depending on the <i>S. cerevisiae</i> strain
Glycerol production	Desirable major fermentation by-product (5–8 g/l) contributing to wine sweetness, body and fullness
Acetaldehyde production	Desirable metabolite in sherry, dessert and port wines being an important character for selection of strains to be applied in wine ageing
Esters, higher alcohols and volatile compounds	Desirable metabolites, markedly influence wine flavour and depend on the presence of precursors related to both grape cultivar and grape maturity. Limited amounts contribute positively to global sensorial characteristics
SO <sub>2</sub> tolerance and production	Antioxidant and antimicrobial agent Desirable: high fermentation vigour and rate in the presence of SO <sub>2</sub> concentrations usually applied in winemaking. Undesirable: excessive SO <sub>2</sub> production
H <sub>2</sub> S production	Determined as the strains colony colour on a bismuth containing indicator medium, e.g. BIGGY Agar H <sub>2</sub> S is detrimental to wine quality, considered as off-flavour with very low threshold value (50–80 µg/l)
Stress resistance	Tolerance to combined acid/osmotic stress

	Comment
Oenological characteristics	High copper concentrations may cause stuck fermentations
Copper resistance	Desirable: high copper resistance and the ability to reduce the copper content

**Table 2** Targets for *S. cerevisiae* strain improvement (adapted from Pretorius 2000 and Pretorius et al. 2003), indicating, whenever possible, examples of the strategies used for genetic modifications

Improvement	Metabolism/protein(s)	Gene(s)	Source	Construction			Reference		
				P	T	Pla		M	Chr
Sensory quality (Background flavour complexity and intensity)	Aroma-liberating enzymes	<i>egl1</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>ACT</i>	-	2µ	<i>CYH2</i>	-	Perez-González et al. (1993)
	Arabinofuranosidase	<i>abfB</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>ACT</i>	-	2µ	<i>CYH2</i>	-	Sanchez-Torres et al. (1996)
	Endoxylanase	<i>xlnA</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>ACT</i>	-	2µ	<i>CYH2</i>	-	Ganga et al. (1999)
	Rhamnosidase	<i>rhaA</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>GPD</i>	<i>PGK</i>	-	<i>TRP</i>	-	Manzanares et al. (2003)
	Malate permease	<i>mae1</i>	Schizosaccharomyces pombe	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ	<i>SMR1-140</i>	+	Voischenk et al. (2001)
	Malic enzyme	<i>mae2</i>		<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ	<i>URA3</i>	-	Voischenk et al. (1997)
	Malolactic enzyme	<i>mleS</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ	<i>URA3</i>	-	Voischenk et al. (1997)
	Acetaldehyde dehydrogenase	<i>ALD6</i> (deletion)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>kanMX4</i>	-	Remize et al. (2000)
	Lactate dehydrogenase	<i>LDH</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2µ	<i>G418 (Trp903)</i>	-	Dequin et al. (1999)
	Glycerol production	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>GPD1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2µ	<i>ble (Trn5)</i>	-
Volatile phenol formation	Phenolic acid decarboxylase	<i>pac pacC</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ	<i>URA3</i>	-	Smat et al. (2003)
	Acetate ester production	Alcohol acetyltransferase	<i>ATF1</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ	<i>LEU2</i>	+	Lilly et al. (2000)
	Hydrogen sulphide production	Sulphite reductase	<i>MET10</i>						Sutherland et al. (2003)
	Resveratrol production	β-Glucosidase	<i>bglV</i>	<i>Candida molischiana</i>	<i>ACT</i>	<i>ACT</i>	2µ	<i>CYH2</i>	-



Improvement	Resveratrol synthase Coenzyme-A ligase Ethyl carbamate elimination Blocking urea secretion	4CLL216	Hybrid poplar Grapevine <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ADH2 ENO2	ADH2 ENO2	2µ 2µ	UR43 LEU2	Chr	Reference
Spoilage microorganism control	Production of antimicrobial enzymes	<i>pedA</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2µ	UR43	-	Schoeman et al. (1999)
	Chitinase	<i>CTSI-2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	2µ		-	Carstens et al. (2003)
Fermentation performance (Achieving a complete conversion of sugar to alcohol and CO <sub>2</sub> without the development of off-flavours)	Leucocin	<i>lcaB</i>	<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>	2µ	UR43	-	du Toit and Pretorius (2000)
	Glucose oxidase	<i>gox</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>PGH1</i>	<i>PGK1</i>		UR43	+	Malherbe et al. (2003)
	Trehalose	<i>TPSI, TPS2, ATH1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Pretorius et al. (2003)
	Glycogen	<i>GSY1, GSY2</i>							
	Sterols	<i>SUT1, SUT2</i>							
	Hexose transporters	<i>HXT1-18</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Pretorius et al. (2003)
	Hexose kinases	<i>HAK1, HAK2</i>							
	Proline oxidase	<i>PUT1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Pretorius et al. (2003)
	Pyruvate-5-carboxylate dehydrogenase	<i>PUT2</i>							
	<i>PUT1</i> and <i>PUT2</i> repressor	<i>wre2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Salmon and Barre (1998)
Ethanol tolerance	Sterol accumulation	<i>SUT1, SUT2, PMA1, PMA2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					Pretorius et al. (2003)	
Membrane ATPase activity									
Agrochemicals resistance	Copper chelation	<i>CUP1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Pretorius et al. (2003)

Improvement	Metabolism/protein(s)	Gene(s)	Source	Construction				Reference
				P	T	Pla	M	
Processing efficiency (Fining and clarification) (Removal of filter-clogging polysaccharides)	Exopolysaccharase	<i>PGU1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>	LEU2		Vilanova et al. (2000)
	Pectate lyase	<i>pelA</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>ACT</i>	-	<i>CTH</i>	2 $\mu$	Gonzalez-Candelas et al. (1995)
Flocculation timing	Flocculin	<i>FLO1, FLO11</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>HSP30</i>				Pretorius et al. (2003)

*P* Promoter, *T* terminator, *Pla* plasmid, *M* marker, *Chr* chromosomal integration