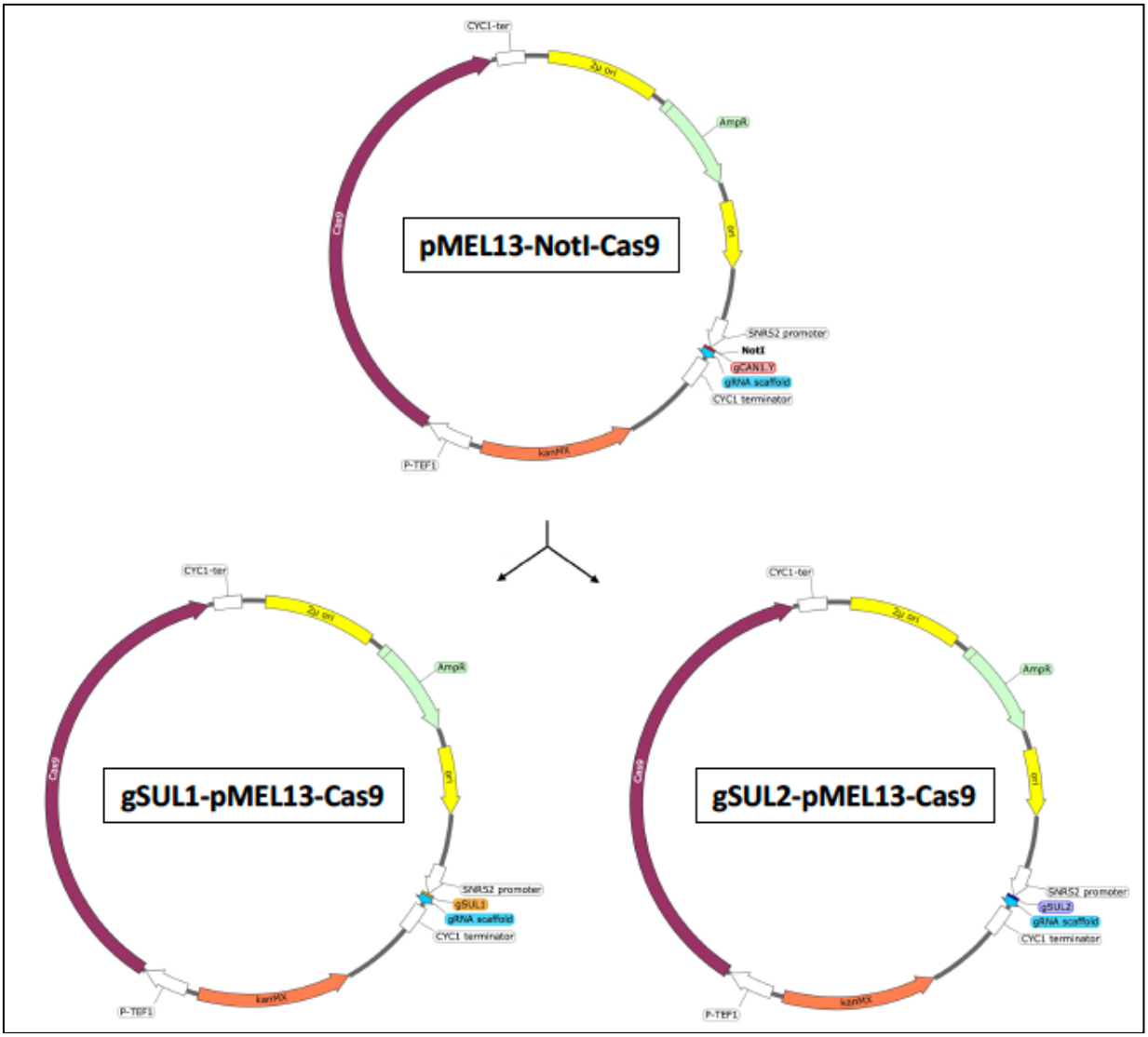
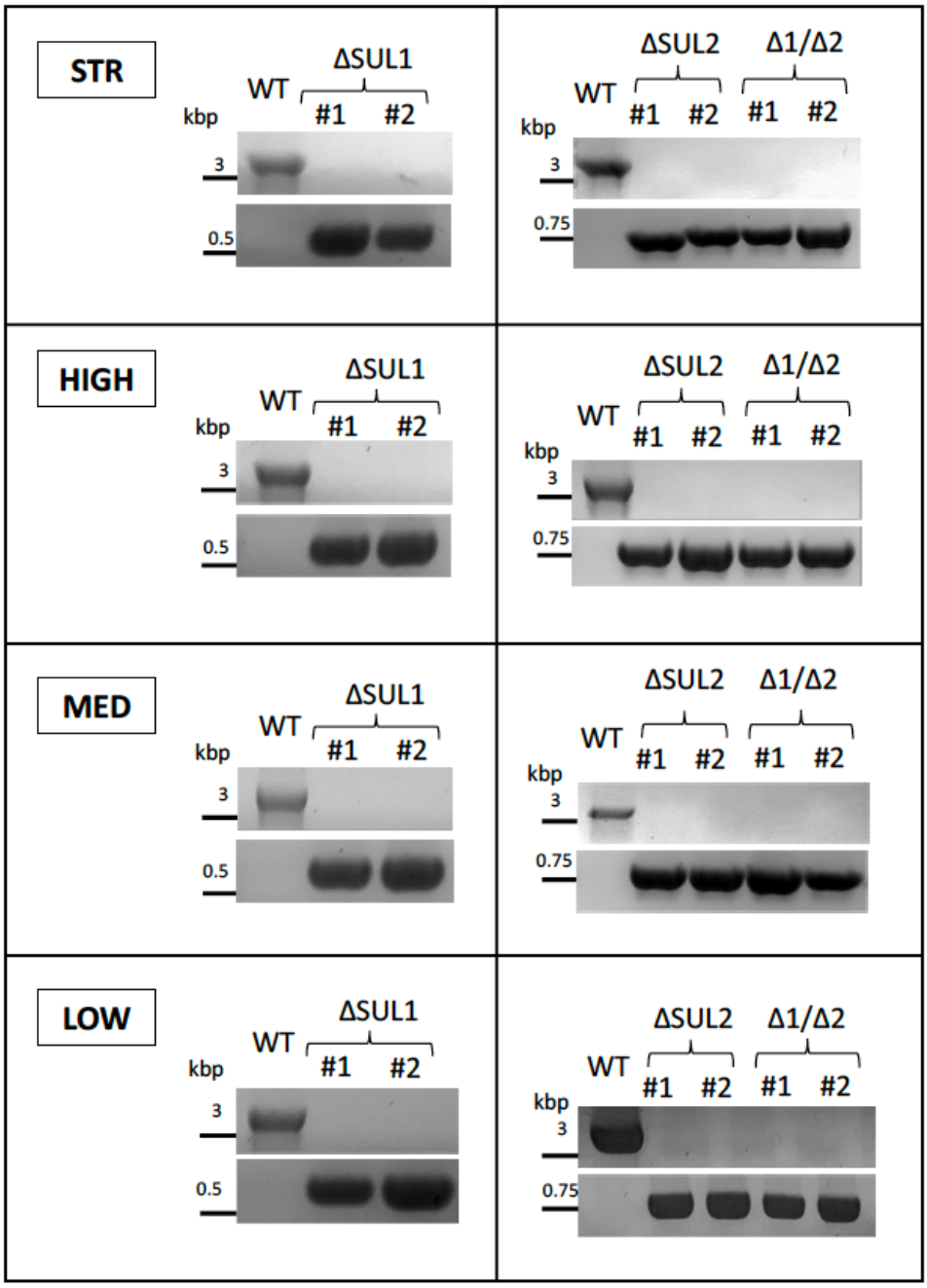
Supplementary Materials.

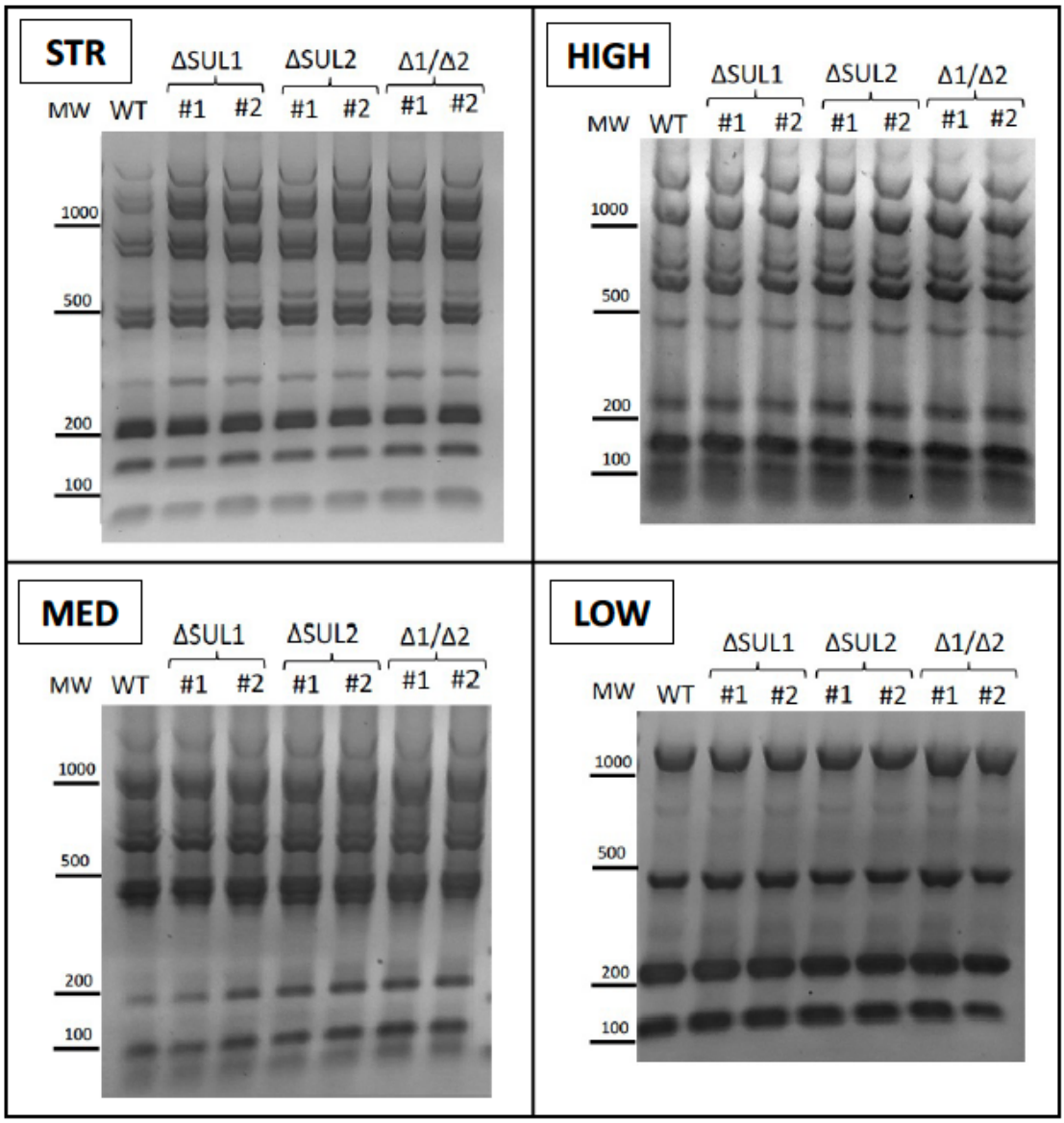
Figure S1: plasmid maps
Figure S2: PCR analysis of *SUL1* and *SUL2* loci
Figure S3: genotype analysis by PCR inter-delta assay
Table S1: volatile compounds detected by GC-MS analysis
Table S2: plasmids and primers
Table S3: features of natural grape juices



Supplementary Figure S1. *Plasmids used.*
Maps of the plasmids constructed in this work, representing their main features. By the site-specific replacement of the gCAN.Y sequence (including the NotI site) with a specific target gDNA region (as indicated for *SUL1* or *SUL2* genes), the gDNA-pMEL13-Cas9 plasmid can be used to manipulate the genome of any natural yeast strain without the need for specific auxotrophic markers.



Supplementary Figure S2. *PCR analysis of SUL1 and SUL2 loci*
Agarose gel electrophoresis showing PCR amplifications of the genomic DNA, extracted from two different clones (#1, #2) generated by the CRISPR/Cas9-assisted genetic modification of the indicated strains (STR, HIGH, MED, LOW) targeting either *SUL1*, or *SUL2* genes, or both (Δ1/Δ2). Unmodified (WT) strains were used as controls. The PCR were performed using either dgSUL1, or dgSUL2, forward (F) and reverse (R) primers, respectively mapped outside the *SUL1* or the *SUL2* coding sequence. PCR fragments are expected to be sized ~3500 bp for the parental alleles, ~570 bp for ΔSUL1 and ~800 for ΔSUL2 alleles.



Supplementary Figure S3. *Genotype analysis by PCR inter-delta assay*
Agarose gel electrophoresis showing the inter-Delta profile obtained by PCR amplifications of the genomic DNA from two different clones (#1, #2) of the indicated strains (STR, HIGH, MED, LOW) deleted for either *SUL1*, or *SUL2* genes, or both (Δ1/Δ2). Unmodified (WT) strains were used as controls. The PCR were performed using δ12 and δ21 primers as reported (see Materials and Methods)

Supplementary Table S1. *Volatile compounds detected by GC-MS assay* (values are expressed as mean ± S.E., *n*=4).

	STR						HIGH						MED						LOW					
	WT			ΔSUL1/ΔSUL2			WT			ΔSUL1/ΔSUL2			WT			ΔSUL1/ΔSUL2			WT			ΔSUL1/ΔSUL2		
ALCOHOLS (mg/L)																								
2-Methyl-propanol	18,66	±	1,55	15,91	±	1,12	19,08	±	0,29	17,51	±	1,04	15,66	±	0,31	16,38	±	1,13	23,91	±	3,03	19,75	±	2,31
n-Butanolo	0,08	±	0,02	0,11	±	0,00	0,06	±	0,01	0,09	±	0,01	0,13	±	0,00	0,15	±	0,00	0,11	±	0,01	0,09	±	0,00
2-Methyl-butanol	13,43	±	0,18	12,13	±	0,38	15,67	±	0,59	12,32	±	0,22	13,14	±	0,13	13,47	±	0,24	16,15	±	1,58	13,08	±	0,26
3-Methyl-butanol	73,41	±	1,35	69,11	±	1,9	107,77	±	3,47	87,95	±	2,67	85,73	±	2,39	82,67	±	0,29	86,13	±	1,78	67,21	±	0,51
2-phenyl-ethanol	44,78	±	5,92	43,60	±	0,74	32,17	±	4,57	23,59	±	0,37	45,16	±	0,47	47,00	±	0,75	44,88	±	4,53	32,65	±	3,10
1-hexanol	0,87	±	0,08	0,92	±	0,01	0,68	±	0,09	0,90	±	0,05	1,08	±	0,01	1,08	±	0,01	0,86	±	0,08	0,95	±	0,06
Benzyl alcohol	0,13	±	0,02	0,16	±	0,01	0,09	±	0,01	0,11	±	0,01	0,16	±	0,00	0,15	±	0,01	0,12	±	0,01	0,16	±	0,02
trans-3-hexenol	0,14	±	0,01	0,15	±	0,00	0,09	±	0,02	0,12	±	0,01	0,15	±	0,00	0,15	±	0,00	0,13	±	0,00	0,15	±	0,00
cis-3-hexenol	0,30	±	0,03	0,34	±	0,00	0,18	±	0,04	0,27	±	0,01	0,34	±	0,00	0,33	±	0,01	0,27	±	0,01	0,32	±	0,00
3-Ethoxy-propanol	1,95	±	0,27	2,81	±	0,09	0,23	±	0,01	0,85	±	0,05	4,99	±	0,22	12,31	±	0,71	0,10	±	0,01	0,83	±	0,06
3-Methyl-thio-propanol	0,74	±	0,23	0,51	±	0,02	0,80	±	0,09	0,20	±	0,00	1,16	±	0,09	0,48	±	0,04	2,22	±	0,15	0,32	±	0,06
tot	***154,49***	***±***	***9,66***	***145,75***	***±***	***4,27***	***176,80***	***±***	***9,19***	***143,90***	***±***	***4,45***	***167,70***	***±***	***3,63***	***174,17***	***±***	***3,18***	***174,88***	***±***	***11,18***	***135,51***	***±***	***6,38***
CARBOXYLIC ACIDS (mg/L)																								
2-Methyl-propanoic	0,94	±	0,08	1,16	±	0,03	0,77	±	0,10	0,91	±	0,04	1,08	±	0,03	0,89	±	0,01	1,39	±	0,04	1,36	±	0,06
Butanoic	0,32	±	0,03	0,39	±	0,01	0,24	±	0,01	0,32	±	0,02	0,56	±	0,01	0,52	±	0,02	0,36	±	0,00	0,43	±	0,03
3-Methyl-butanoic	0,11	±	0,01	0,13	±	0,00	0,16	±	0,01	0,17	±	0,01	0,23	±	0,00	0,19	±	0,01	0,20	±	0,01	0,21	±	0,00
Hexanoic	2,27	±	0,26	2,44	±	0,02	3,17	±	0,17	3,48	±	0,28	7,91	±	0,32	5,61	±	0,48	3,87	±	0,22	4,17	±	0,23
Octanoic	7,48	±	1,17	8,29	±	0,04	8,02	±	0,56	9,75	±	0,89	18,32	±	0,70	13,29	±	0,91	7,56	±	0,43	8,60	±	0,53
Decanoic	3,48	±	0,60	4,38	±	0,06	1,38	±	0,11	1,85	±	0,18	4,25	±	0,23	2,44	±	0,14	0,62	±	0,06	0,90	±	0,16
tot	***14,60***	***±***	***2,15***	***16,80***	***±***	***0,16***	***13,74***	***±***	***0,96***	***16,48***	***±***	***1,42***	***32,35***	***±***	***1,30***	***22,94***	***±***	***1,57***	***14,00***	***±***	***0,76***	***15,67***	***±***	***1,00***
ESTERS (mg/L)																								
Ethyl lactate	0,34	±	0,01	0,38	±	0,00	0,24	±	0,00	0,30	±	0,01	0,30	±	0,01	0,32	±	0,00	0,32	±	0,01	0,31	±	0,01
Monoethyl-succinate	1,07	±	0,16	1,65	±	0,00	0,60	±	0,12	1,22	±	0,03	1,49	±	0,03	1,34	±	0,09	1,02	±	0,14	0,91	±	0,02
Diethyl-succinate	0,05	±	0,00	0,05	±	0,01	0,08	±	0,01	0,10	±	0,01	0,07	±	0,00	0,06	±	0,00	0,14	±	0,00	0,11	±	0,01
Ethyl isobutyrate	0,68	±	0,08	1,06	±	0,05	0,12	±	0,00	0,30	±	0,02	0,19	±	0,01	0,36	±	0,00	0,17	±	0,01	0,42	±	0,01
Ethyl butanoate	0,79	±	0,08	0,76	±	0,06	0,53	±	0,06	0,62	±	0,05	0,95	±	0,02	0,87	±	0,02	0,86	±	0,06	1,08	±	0,05
Ethyl 3-Methyl-butanoate	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00
Ethyl hexanoate	0,89	±	0,04	0,96	±	0,03	1,04	±	0,03	1,25	±	0,04	1,69	±	0,05	1,39	±	0,02	1,11	±	0,05	1,39	±	0,03
Ethyl octanoate	0,25	±	0,02	0,20	±	0,01	0,40	±	0,02	0,43	±	0,02	0,62	±	0,03	0,54	±	0,01	0,85	±	0,03	0,81	±	0,06
Ethyl decanoate	0,05	±	0,01	0,03	±	0,00	0,10	±	0,01	0,10	±	0,01	0,19	±	0,01	0,12	±	0,00	0,14	±	0,00	0,16	±	0,00
Ethyl 2-phenyl-acetate	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00
Isobutyl acetate	0,10	±	0,00	0,10	±	0,00	0,06	±	0,00	0,06	±	0,00	0,06	±	0,00	0,06	±	0,00	0,15	±	0,02	0,11	±	0,00
n-Butyl acetate	0,04	±	0,00	0,04	±	0,00	0,05	±	0,00	0,05	±	0,00	0,03	±	0,00	0,03	±	0,00	0,04	±	0,00	0,04	±	0,00
Isoamyl acetate	3,30	±	0,15	3,11	±	0,10	2,84	±	0,06	2,40	±	0,07	2,25	±	0,05	2,20	±	0,04	5,48	±	0,67	4,01	±	0,37
n-Hexyl acetate	0,16	±	0,02	0,17	±	0,00	0,07	±	0,01	0,09	±	0,00	0,11	±	0,00	0,12	±	0,00	0,16	±	0,02	0,16	±	0,01
2-phenyl-ethyl acetate	1,42	±	0,19	1,32	±	0,02	0,70	±	0,13	0,49	±	0,02	0,90	±	0,03	0,90	±	0,03	1,70	±	0,09	1,02	±	0,19
tot	***9,13***	***±***	***0,76***	***9,84***	***±***	***0,27***	***6,84***	***±***	***0,46***	***7,41***	***±***	***0,28***	***8,84***	***±***	***0,24***	***8,32***	***±***	***0,23***	***12,15***	***±***	***1,10***	***10,53***	***±***	***0,76***
TERPENES (µg/L)																								
Linalool	17,63	±	0,80	20,85	±	0,34	11,93	±	1,09	14,16	±	0,82	14,72	±	0,39	16,19	±	0,14	16,51	±	1,03	15,52	±	0,15
α-Terpineol	2,19	±	0,21	2,88	±	0,06	1,23	±	0,14	1,65	±	0,09	2,48	±	0,06	2,83	±	0,03	1,92	±	0,06	2,32	±	0,15
β-Citronellol	43,39	±	1,33	43,53	±	2,35	23,28	±	0,95	23,25	±	0,54	45,61	±	0,76	43,32	±	1,32	39,23	±	0,54	40,29	±	1,21
Nerol	52,85	±	8,40	54,32	±	10,98	34,24	±	6,98	46,08	±	6,98	59,09	±	5,80	60,00	±	3,06	55,84	±	2,94	51,36	±	4,52
Geraniol	26,06	±	1,87	27,09	±	1,60	14,15	±	2,15	18,52	±	0,48	16,88	±	0,21	19,41	±	0,49	20,46	±	0,66	21,20	±	0,61
β-Damascenone	0,32	±	0,06	0,51	±	0,07	0,40	±	0,10	0,67	±	0,03	0,43	±	0,07	0,43	±	0,03	0,45	±	0,09	0,56	±	0,06
β-Ionone	0,60	±	0,14	0,80	±	0,00	0,40	±	0,00	0,40	±	0,00	0,53	±	0,08	0,67	±	0,08	0,47	±	0,08	0,53	±	0,08
tot	***143,04***	***±***	***12,81***	***149,98***	***±***	***15,39***	***85,63***	***±***	***11,40***	***104,73***	***±***	***8,94***	***139,75***	***±***	***7,37***	***142,84***	***±***	***5,17***	***134,88***	***±***	***5,39***	***131,79***	***±***	***6,78***
ALDEHYDES (mg/L)																								
Benzaldehyde	0,19	±	0,01	0,18	±	0,01	0,16	±	0,02	0,19	±	0,02	0,19	±	0,01	0,17	±	0,00	0,17	±	0,01	0,19	±	0,02
KETONES																								
Diacetyl	nd			nd			nd			nd			nd			nd			nd			nd		
Acetoin	nd			nd			nd			nd			nd			nd			nd			nd		

Supplementary Table S2. *List of Plasmid and Primers.*

Plasmids generated and primers used		
	Plasmid name	**Main features (size; yeast marker; bacterial marker; gDNA)**
1)	pMEL13-NotI	6130 bp; KanR; AmpR; gDNA: CAN1.Y-NotI
2)	pMEL13-NotI-Cas9	10969 bp; KanR; AmpR; gDNA: CAN1.Y-NotI; SpCas9 expression
3)	gSUL1-pMEL13-Cas9	10969 bp; KanR; AmpR; gDNA: SUL1; SpCas9 expression
4)	gSUL2-pMEL13-Cas9	10969 bp; KanR; AmpR; gDNA: SUL2; SpCas9 expression
	Primer name	**Sequence 5'-3'**
1)	pMEL-NotI-F	CTCCGCAGTGAAAGATAAATGATCGATACGCGGCCGCTGGAGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
2)	pMEL-NotI-R	CTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACTCCTCCAGCGGCCGCGTATCGATCATTTATCTTTCACTGCGGAG
3)	Cas9-pMEL F	ATTAAGGGTTGTCGA C AGCTCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC
4)	Cas9-pMEL R	TACGCTGCAGGTCGA C CAAATTAAAGCCTTCGAGCGTCCC
5)	6006 F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
6)	gSUL1 target R	TTCTAGCTCTAAAAC**TTAGATTGTATCTCATTTAT**GATCATTTATCTTTCACTGCGGAGA
7)	gSUL2 target R	TTCTAGCTCTAAAAC**TTTGATAATTTTGTGTAACC**GATCATTTATCTTTCACTGCGGAGA
8)	ssSUL1 repair F	CAATAGCTTTAAAAATAAAAATAAATCCCTGCAGAATACTCGGAAAGAATTGTAGTAGATAGTAAGTACTTTAATTACCCCCCCTGTTTTTAGTTATACA
9)	ssSUL1 repair R	TGTATAACTAAAAACAGGGGGGGTAATTAAAGTACTTACTATCTACTACAATTCTTTCCGAGTATTCTGCAGGGATTTATTTTTATTTTTAAAGCTATTG
10)	ssSUL2 repair F	TCTTTTCTTGAGGTGTGTGTGTGTATAGATTAGCAGGGAATTATCTAAGATCCAATGCATTTACAATGGACATGCAAACATTTATATCATCTCTTTTTTTC
11)	ssSUL2 repair R	GAAAAAAAGAGATGATATAAATGTTTGCATGTCCATTGTAAATGCATTGGATCTTAGATAATTCCCTGCTAATCTATACACACACACCTCAAGAAAGA
12)	dgSUL1 control F	AAACTCCACACCTTCCCCAC
13)	dgSUL1 control R	GACCATGTCTTTTCAGCGCC
14)	dgSUL2 control F	ACTAGCAACGTCGGATAGCG
15)	dgSUL2 control R	TAAGTGACATCGGGGATGCC
16)	δ12	TCAACAATGGAATCCCAAC
17)	δ21	CATCTTAACACCGTATATGA

Supplementary Table S3. *Characterization of natural must types.*

	Must	**Winery (Italy)**	**Year**	**Sugar (g/L)**	**YAN* (mg/L)**	**SO_4^{--} (mg/L)**	**Free SO_2 (mg/L)**	**Total SO_2 (mg/L)**	**pH**
1)	Prosecco	*Lorenzonetto*	2021	124.4	108	390	8.3	37.7	3.37
2)	Gewurztraminer	*Caldaro*	2020	137.7	167	550	4.4	18.7	3.53
3)	Sauvignon blanc	*Masut rive*	2021	204	202	480	5.8	27.4	3.35
4)	Prosecco (2)	*Vigna vecchia*	2020	138	81	124	10.2	28.8	3.35

**: YAN, yeast assimilable nitrogen*