

RUOLO PROTETTORE DEGLI STEROLI NELLA FASE DI REIDRATAZIONE DEI LIEVITI SECCHI ATTIVI

Anne ORTIZ-JULIEN¹ e Jean-Michel SALMON²

1. Lallemand SA, 19, rue des Briquetiers, Blagnac Cedex, 31702 France

2. Unité Mixte de Recherches «Sciences pour l'Oenologie», INRA, 2, place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France.

Riassunto

I Lieviti Secchi Attivi utilizzati per l'inoculo ragionato delle fermentazioni in enologia sono tutti commercializzati sotto forma disidratata. Per riattivare i microrganismi prima dell'inoculo è quindi necessaria una fase di reidratazione, necessaria per l'ottenimento di una buona integrità della membrana plasmatica e di conseguenza per permettere la sopravvivenza del lievito una volta immesso nel mezzo di fermentazione. L'apporto di steroli specifici sotto forma solubile nella fase di reidratazione permette di migliorare la struttura della membrana plasmatica e, alla fine, permette al lievito di meglio assicurare una fermentazione alcolica regolare, soprattutto in condizioni difficili. In questo senso gli steroli giocano un ruolo importante di protettori dei lieviti durante la fase di reidratazione.

Modifiche della membrana plasmatica durante la fase di disidratazione e reidratazione dei lieviti

L'essiccazione dei lieviti provoca profonde modificazioni della struttura interna dei microrganismi, dovute alla contrazione del volume totale della cellula (1). Tale contrazione del volume cellulare porta ad un ripiegamento importante della membrana plasmatica ed all'apparizione di rotture che ne interrompono la continuità (2, figura 1).

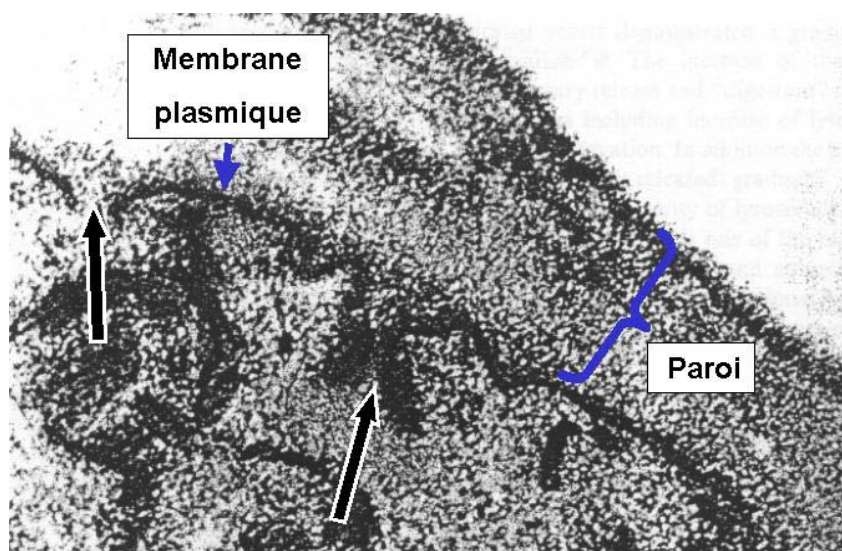


Figura 1 : Fotografia al microscopio elettronico (ingrandimento 145000) delle cellule disidratate di *Saccharomyces cerevisiae*. La membrana plasmatica è fortemente ripiegata. Le frecce mostrano le rotture della membrana. (Membrane plasmique: membrana plasmatica; Paroi = parete). Fonte: riferimento bibliografico n. 1.

A partire dalla fase di reidratazione dei Lieviti Secchi Attivi, le cellule cominciano a mobilitare le loro riserve lipidiche, per riparare rapidamente le membrane deteriorate (3). La nostra unità di ricerca ha recentemente dimostrato che durante questa fase di reidratazione, i lieviti possono anche incorporare lipidi extracellulari ed utilizzarli nella riparazione delle loro membrane danneggiate (4).

Questa incorporazione rapida (in meno di 15 minuti) permette allora alla cellula di recuperare rapidamente la funzionalità delle membrane plasmatiche danneggiate. Nella nostra ricerca abbiamo studiato in modo particolare l'incorporazione di steroli, classe di composti noti per il loro ruolo nella sopravvivenza della cellula nelle tappe finali della fermentazione alcolica (5,6).

L'assimilazione di steroli è stata seguita grazie all'impiego di uno standard radioattivo (colesterolo [$4\text{-}^{14}\text{C}$]) durante una reidratazione classica a 37°C , in presenza di una sospensione di steroli solubilizzati (figura 2).

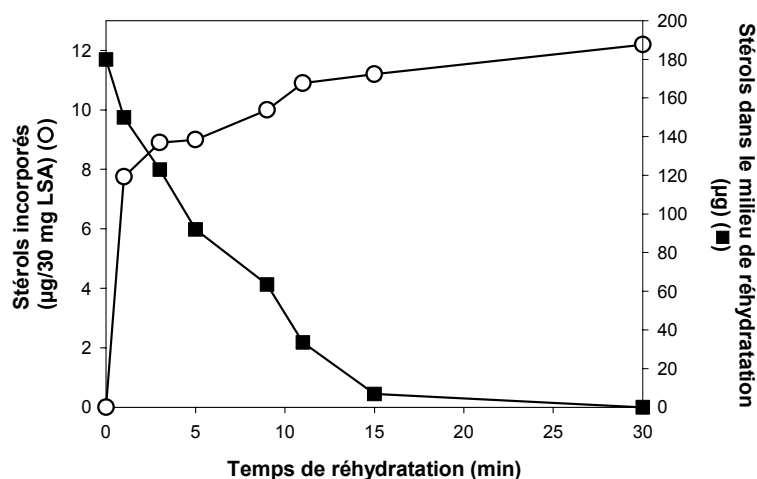


Figura 2: Cinetica d'incorporazione degli steroli misurati con colesterolo [$4\text{-}^{14}\text{C}$], durante la reidratazione di 1 g di lievito secco attivo (ceppo di riferimento) in 10 ml d'acqua con 0,5 g di glucosio, in presenza di una preparazione di steroli solubilizzati (25 mg) a 37°C .

Appare evidente che i Lieviti Secchi Attivi, durante la reidratazione, possono incorporare in modo efficace e rapido gli steroli extracellulari a disposizione, per utilizzarli nella riparazione delle membrane cellulari danneggiate in disidratazione (4).

Effetto qualitativo di diversi steroli sulla crescita e sulla vitalità dei lieviti

Durante le fermentazione alcolica i lieviti devono necessariamente assimilare steroli esogeni per potersi sviluppare. Nel mosto di lievito sono presenti i fitosteroli, la cui natura chimica è leggermente diversa da quella degli steroli normalmente sintetizzati dal lievito in aerobiosi (5). Questi fitosteroli sono essenzialmente localizzati nella buccia dell'uva e vengono normalmente estratti nel corso della macerazione (7). Un recente studio condotto nel nostro laboratorio ha mostrato che la disponibilità di fitosteroli in quantità maggiori di 5 mg/l permetterebbe di sostenere la crescita dei lieviti in condizioni enologiche (figura 3) e quindi di ottenere un inizio fermentazione regolare (5). Tuttavia, proprio a causa della piccola differenza chimica tra fitosteroli e steroli del lievito, quando i primi rappresentano l'unica fonte di steroli, le cellule perdono vitalità molto precocemente (figura 4).

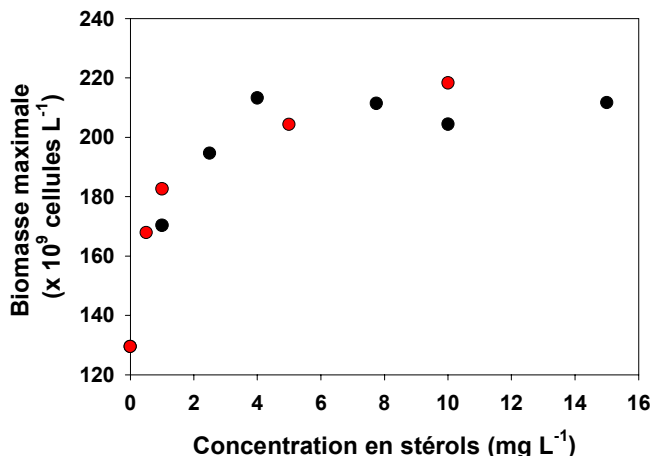


Figura 3 : Evoluzione della popolazione cellulare massima nel corso della fermentazione del ceppo di riferimento in presenza di diversi tenori di fitosteroli da uva (punti rossi) o di steroli di origine blastomicetica (punti neri).

Le corrispondenti velocità di fermentazione in fase stazionaria ne risultano quindi sensibilmente influenzate e possono in condizioni sfavorevoli portare ad arresti di fermentazione (5).

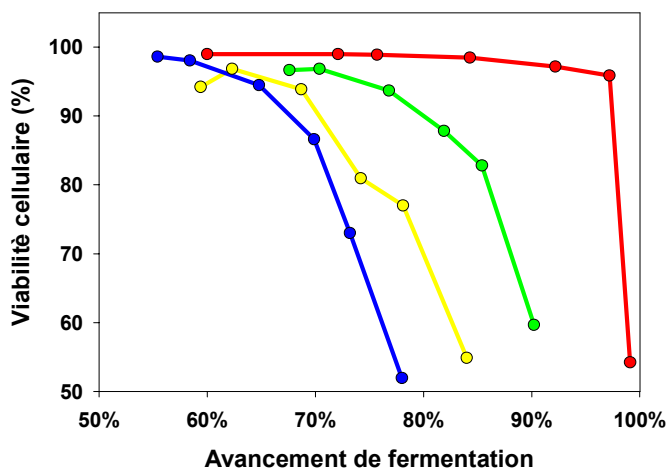


Figura 4 : Evoluzione della vitalità cellulare del ceppo di lievito di riferimento coltivata in presenza di fitosteroli d'uva (1 mg/l, curva blu; 5 mg/l curva gialla; 10 mg/l curva verde) o di steroli di origine blastomicetica (10 mg/l, curva rossa).

Diversi trattamenti prefermentativi, ed in particolare le operazioni di chiarifica normalmente praticate nelle vinificazioni in bianco e rosato (come la sfecciatura, 8), portano alla formazione di flocculi peptici sui quali sono adsorbiti i fitosteroli. Il mezzo diventa quindi carente in steroli assimilabili dal lievito fin dall'inizio. In queste condizioni è necessario aiutare la normale ricostruzione cellulare fin dalla tappa di reidratazione del lievito, permettendo allo stesso di incorporare steroli specifici da lievito.

Effetto, sull'efficacia fermentativa del lievito, dell'incorporazione di steroli solubilizzati di origine blastomicetica, durante la fase di reidratazione dei lieviti secchi attivi

Nel corso dello studio è stato quindi valutato l'effetto dell'aggiunta di steroli di origine blastomicetica alla fase di reidratazione del LSA, che è risultato essere molto evidente. In condizioni di fermentazioni difficili (mezzo contenente 8 mg/l di fitosteroli), il miglioramento ottenuto è dell'ordine di 20-25 ore di fermentazione (figura 5).

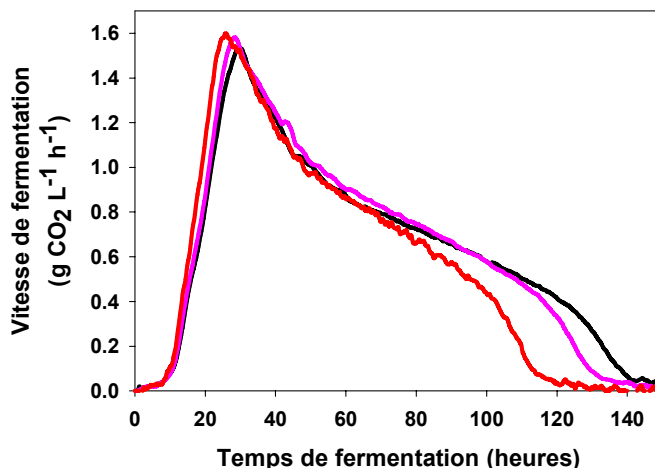


Figura 5 : Effetto di un'aggiunta di steroli da lievito nella fase di reidratazione del ceppo di riferimento. Reidratazione senza aggiunta (curva nera), in presenza di steroli da lievito solubilizzati (12 mg/l, curva rosa; 24 mg/l curva rossa). Le cinetiche di fermentazione sono state seguite a 24°C in un mezzo di fermentazione contenente 8 mg/l di fitosteroli.

L'effetto positivo sulla cinetica di fermentazione dovuto all'aggiunta di steroli solubilizzati di origine blastomicetica in fase di reidratazione è attribuibile ad un aumento molto significativo della vitalità cellulare nella fase stazionaria della fermentazione alcolica (figura 6).

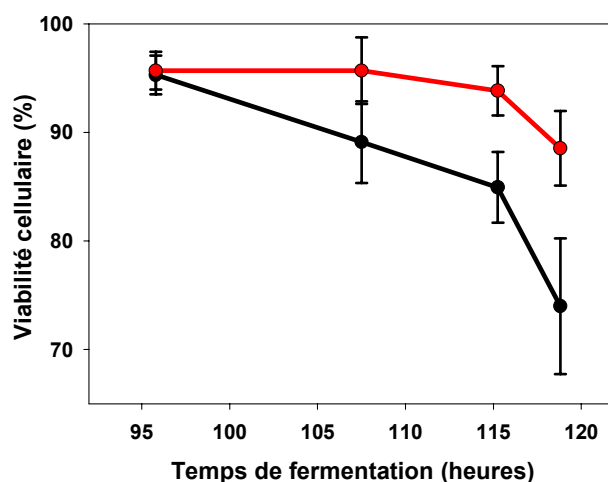


Figura 6 : Effetto di una aggiunta di steroli solubilizzati di origine blastomicetica nella fase di reidratazione del ceppo di riferimento. Reidratazione senza aggiunta (curva nera), in presenza di steroli (24 mg/l), curva rossa). Vitalità cellulare durante la fermentazione a 24 °C di un mezzo di fermentazione contenente 8 mg/l di fitosteroli.

Le differenze nella vitalità cellulare raggiungono il 20% alla fine della fermentazione in diverse condizioni. In questa fase della fermentazione alcolica, il tenore in alcool diventa particolarmente negativo per il metabolismo cellulare. In queste condizioni, le popolazioni di lievito con elevata vitalità cellulare hanno maggiore facilità nel terminare regolarmente le fermentazioni.

Conclusioni

La recente scoperta della capacità dei Lieviti Secchi Attivi di incorporare gli steroli esogeni durante la fase di reidratazione permette di attuare una specifica aggiunta di steroli in questa particolare fase tecnologica. Tuttavia, anche se i lieviti possono assimilare steroli di varia origine, gli steroli derivanti da lievito hanno mostrato una maggiore efficacia. In queste condizioni, l'apporto di steroli specifici sotto forma solubile durante la reidratazione permette di migliorare la struttura della membrana plasmatica, e permette conseguentemente al lievito di meglio assicurare il completamento della fermentazione alcolica, soprattutto in condizioni difficili.

Bibliografia

1. Beker M.J., Rapoport A.I. Conservation of yeasts by rehydration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1987, 35, 127-171.
2. Rapoport A.I. Rejection of areas of damaged cytoplasm by microorganisms in a state of anobiosis. *Microbiology*, 1973, 42, 317-318.
3. Beker M.J., Blumbergs J.E.; Ventina E.J.; Rapoport A.I. Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 19, 347-352.
4. Soubeyrand V., Luparia V., Williams P., Doco T., Vernhet A., Ortiz-Julien A., Salmon J.M. Improvement of the Fermenting Capacity of Active Dry Yeast (ADY) by Solubilized Sterols during Rehydration. *J. Agric. Food Chem.* 2005, sous presse.
5. Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 65, 25-32.
6. Fornairon-Bonnefond C., Desmaretz V., Rosenfeld E., Salmon J.M. Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 93, 176-182.
7. Valero E., Millan M.C., Mauricio J.C., Ortega J.M. Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, 49, 119-124.
8. Cocito C., Delfini, C. Experiments for developing selective clarification techniques: Sterol and fatty acid loss from grape must related to clarification technique. *J. Wine Res.*, 1997, 8, 187-197.