

DOCUMENTO  
TECNICO

L. Bardi

**\*Laura Bardi**  
**\*\*Simona Belviso**  
**A. Biondi Bartolini**  
**\*\*Mario Marzona**

\* Istituto Sperimentale per la  
 Nutrizione delle Piante - Torino

\*\* Dipartimento di Chimica  
 Generale ed Organica Applicata  
 - Università di Torino - Torino

## LA NUTRIZIONE LIPIDICA DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE NELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

La nutrizione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un fattore da sorvegliare attentamente nell'ottica di una corretta gestione della fermentazione alcolica. In questo lavoro si è indagato il ruolo dei lipidi e dell'ossigeno come apporto nutrizionale alle cellule di lievito in fermentazione. Una possibile fonte di tali composti è rappresentata dai lieviti inattivi.

### Introduzione

La corretta gestione della fermentazione alcolica e la prevenzione degli arresti di fermentazione sono problemi sempre più sentiti, soprattutto nella nuova ottica dell'industria enologica, dove niente deve essere lasciato al caso, ed anche i processi biologici necessitano di un attento controllo tecnologico.

Mentre il ruolo della nutrizione azotata è stato ampiamente indagato sotto diversi aspetti soprattutto negli ulti-

mi anni (1, 16, 14, 20, 25, 18, 25, 3), e alcune indagini importanti hanno interessato altri micronutrienti (vitamine e sali minerali per esempio), sicuramente meno è stato fatto sui fattori che consentono il mantenimento dell'attività della membrana citoplasmatica, ovvero sul ruolo dei composti lipidici.

Perché una fermentazione non incorra in problemi di alcun tipo è necessario che non si verifichi alcuna situazione di carenza, e che la fine del processo sia dovuta all'esau-

rimento dell'unico fattore nutritivo che deve divenire limitante, e cioè degli zuccheri. Affinchè questo avvenga, la cellula deve essere in grado di assimilare, nel corso di tutto il processo fermentativo, macro e micronutrienti.

Talvolta, nonostante la disponibilità di fattori nutrizionali nel mosto, le fermentazioni rallentano o si arrestano. Le cause all'origine di questi fenomeni possono essere molteplici (4), ma nonostante le indagini finora con-



dotte, non è al momento possibile prevederli con certezza e porvi sempre rimedio utile. Una delle possibili cause, finora poco indagata con questo obiettivo, è costituita dalla composizione della membrana plasmatica che, in funzione del mantenimento della sua funzionalità, consente alla cellula di proteggersi da eventuali elementi dannosi presenti all'esterno e di assimilare i composti presenti nel mezzo. Andamenti irregolari della fermentazione o condizioni tecnologiche anomale (24) (basse o alte temperature, eccessiva limpidezza dei mosti, uso di mosti concentrati, alte concentrazioni zuccherine) sono frequentemente accompagnati dalla formazione di prodotti secondari indesiderati, come l'acido acetico e gli acidi grassi a media catena, che sono altri intermedi della formazione di acidi grassi e steroli. La sintesi degli steroli e la desaturazione degli acidi grassi saturi richiedono ossigeno, che viene però rapidamente consumato nelle prime fasi della fermentazione, in seguito alle quali si instaura l'anaerobiosi, per effetto della fermentazione stessa. In queste condizioni può verificarsi nelle cellule uno stato di carenza di acidi grassi insaturi e steroli, che può condurre ad un blocco delle divisioni cellulari (7, 8). Da ciò può derivare un rallentamento nel consumo degli zuccheri.

Da queste considerazioni è derivata la necessità di indagare la possibile soluzione al problema delle fermentazioni difficili e dell'insorgenza di difetti qualitativi, fornendo alle cellule in crescita in anaerobiosi, diverse fonti di composti costituenti la membrana cellulare (acidi grassi saturi e insaturi e steroli).

Una possibile fonte di tali composti è rappresentata dagli attivanti a base di scorze di lievito, contenenti alcune parti o la totalità delle membrane cellulari, che di seguito verranno chiamati lieviti inattivi. Prove preliminari hanno dimostrato che l'aggiunta di lieviti inattivi mi-

gliora l'efficienza fermentativa delle cellule, accelera il consumo degli zuccheri e riduce la produzione di acido acetico (dati in corso di pubblicazione). Il lavoro è stato condotto in modo tale da valutare il ruolo della sola frazione lipidica come apporto nutrizionale. È stata inoltre presa in considerazione la somministrazione controllata di ossigeno come "cofattore" nutrizionale indispensabile alla biosintesi lipidica. Lo studio è stato sviluppato con fermentazioni condotte in condizioni fisiologiche di stress metabolico, esclusivamente a carico dei processi di biosintesi lipidica, quindi in assenza di sostanze lipidiche nel terreno di coltura ed in anaerobiosi, ma con nutrizione adeguata sotto il profilo degli apporti in azoto, vitamine e sali minerali.

## Le due fasi di lavoro

La ricerca si è articolata in due fasi di lavoro.

Nella Fase 1 le fermentazioni sono state condotte in laboratorio, in condizioni controllate, utilizzando un terreno nutritivo sintetico a composizione nota, privo di composti lipidici ma ricco in azoto, in modo da minimizzare l'effetto dell'apporto nutrizionale della frazione azotata dei lieviti inattivi. L'ossigeno è stato erogato utilizzando un micro-ossigenatore.

Sono state poste a confronto quattro tesi:

1. fermentazione con apporto di lieviti inattivi, tesi "lieviti inattivi"
2. fermentazione con apporto di ossigeno, tesi "ossigeno"
3. fermentazione con apporto simultaneo di lieviti inattivi e ossigeno, tesi "lieviti inattivi e ossigeno"
4. fermentazione con apporto di lieviti inattivi e ossigeno somministrati in due step successivi, tesi "2 step".

In ognuna delle fermentazioni si sono analizzati:

1. la cinetica di crescita cellulare, da cui sono stati

dedotti il numero di divisioni cellulari e la biomassa complessivamente prodotta;

2. il consumo degli zuccheri (glucosio e fruttosio);

3. la produzione di etanolo;

4. la composizione della frazione lipidica cellulare.

Nella Fase 2 sono state condotte fermentazioni su scala pilota, ponendo a confronto tre tesi:

1) Tesi A: fermentazione di controllo

2) Tesi B: fermentazione con nutrizione sperimentale a base di lieviti inattivi

3) Tesi C: fermentazione con macro-ossigenazione.

Le prove sono state condotte su mosto Chardonnay nella vendemmia 2002 presso la cantina "La Montagnetta" (Villanova d'Asti, Asti).

## Fermentazioni su scala di laboratorio

**Condizioni di fermentazione.** Le fermentazioni sono state condotte in batch in un bioreattore BM3000 (BioIndustrie Mantovane srl). Il substrato utilizzato in tutte le tesi era composto da YNB modificato in modo da simulare le condizioni di fermentazioni enologiche, mediante aggiunta di glucosio 12%, fruttosio 12%, acido tartarico 0,3%, acido malico 0,2% e acido citrico 2%. Il pH è stato portato a 3,2 con aggiunta di soda 4 M e si è mantenuto costante nella fermentazione per l'effetto tampone creato dalla presenza di acido citrico e di sodio citrato (3%). Tale terreno di coltura, comunemente utilizzato negli studi fisiologici su *S. cerevisiae*, è stato scelto perché, essendo a composizione nota e totalmente privo di composti lipidici, consente di valutare il comportamento fisiologico del lievito senza l'influenza delle variabili imputabili alla diversa composizione dei mosti. Le fermentazioni sono state condotte a 20° C e sotto agitazione (700 rpm).

Per l'inoculo è stato utilizzato un preparato commerciale di lievito secco attivo per uso enologico (ceppo

L2056), riattivato secondo il protocollo indicato dalla ditta fornitrice. Dalla sospensione cellulare così ottenuta, dopo averne determinato la concentrazione mediante conteggio con camera di Bürker e con colorazione vitale al blu di metilene (6), si è prelevata l'aliquota necessaria per ottenere una concentrazione di partenza, nella giara di fermentazione, pari a  $5 \times 10^5$  cellule/mL.

I trattamenti (aggiunte di lieviti inattivi e/o di ossigeno) sono stati effettuati in corrispondenza delle seguenti fasi della fermentazione:

1. In corrispondenza dell'inoculo (giorno 0);

2. Quando la concentrazione di glucosio nel terreno di coltura era un terzo della quantità presente al giorno 0 (giorno 5);

3. Quando la concentrazione di glucosio nel mezzo di coltura era la metà di quella di partenza (giorno 6 nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno", giorno 7 nella tesi "lieviti inattivi" e nella tesi "ossigeno").

Dove previsto, i lieviti inattivi sono stati aggiunti in dose di 200 mg/L mentre l'ossigeno è stato somministrato in dose di 1,4 mL/L.

Nella tesi "2 step" sono stati aggiunti 200 mg/L di lieviti inattivi in corrispondenza dell'inoculo (giorno 0); l'aggiunta di ossigeno, in dosi uguali a quelle utilizzate nelle tesi precedenti, è stata effettuata quando un terzo del glucosio inizialmente presente nel mezzo di crescita era stato consumato (giorno 5).

Ogni fermentazione è stata ripetuta due volte. Dal momento che i risultati ottenuti davano origine a curve sovrapponibili in ogni cinetica, per ciascuna tesi sono stati riportati i risultati di una sola ripetizione.

## Determinazione delle cinetiche di crescita cellulare.

La concentrazione cellulare è stata determinata mediante un conteggio al microscopio ottico in campo chiaro (400 X), utilizzando la camera contaglobuli di Bürker



**Tab. 1 - Cinetiche di crescita cellulare e produzione di biomassa**

Tesi	Numero di generazioni	Biomassa prodotta (cellule/mL)	Fase logaritmica (giorni)
Lieviti inattivi	8,3	1,9 x 10 <sup>8</sup>	4
Ossigeno	9,4	2,45 x 10 <sup>8</sup>	4
Lieviti inattivi e ossigeno	8	1,88 x 10 <sup>8</sup>	3
2 step	9,3	1,9 x 10 <sup>8</sup>	7

Nella tesi "lieviti inattivi" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 7 della fermentazione. Nella tesi "ossigeno" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 7 della fermentazione. Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 6 della fermentazione. Nella tesi "2 step" sono state effettuate nei giorni 0 (lieviti inattivi) e 5 (ossigeno) della fermentazione

**Tab. 2 - Indici di insaturazione**

	Inizio fase di crescita	Fine fase di crescita
Tesi lieviti inattivi	76,4%	81%
Tesi ossigeno	74%	81,4%
Tesi lieviti inattivi e ossigeno	75,9%	74,9%
Tesi 2 step	65,7%	76,7%

I dati sono stati ottenuti dal rapporto percentuale fra la somma degli acidi grassi insaturi C16:1+C18:1 e la somma dei quattro acidi grassi C16:0, C16:1, C18:0 e C18:1. Nella tesi "lieviti inattivi" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 7 della fermentazione. Nella tesi "ossigeno" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 7 della fermentazione. Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" le aggiunte sono state effettuate nei giorni 0, 5 e 6 della fermentazione. Nella tesi "2 step" sono state effettuate nei giorni 0 (lieviti inattivi) e 5 (ossigeno) della fermentazione.

con colorazione vitale al blu di metilene.

**Determinazione della concentrazione di glucosio e fruttosio.** La determinazione della concentrazione degli zuccheri è stata effettuata per via enzimatica utilizzando gli appositi kit (Boehringer Mannheim/R-Biopharm) e uno spettrofotometro UV/Visibile a singolo raggio (Spectronic 20 Genesys TM).

**Estrazione dei lipidi cellulari.** I lipidi cellulari sono stati estratti previa liofilizzazione del campione di cellule.

Dopo aver polverizzato le cellule liofilizzate in un mortaio, se ne è pesata una determinata quantità in un tubo Falcon da 50 mL. Si sono adizionati 2,2 mL di dimetilsolfossido (DMSO), 200 µL di soluzione di acido 4-(idrossimercuri) benzoico in DMSO e 100 µL di soluzione di 2,6-di-ter-butil-4-metilfenolo in DMSO; quindi si è mantenuta la sospensione in un bagno d'acqua alla temperatura di 100°C per un'ora. Dopo aver lasciato raffreddare la sospensione a tempera-

tura ambiente, si è aggiunta una miscela di cloroformio e metanolo 1:1 (6,65 mL : 6,65 mL). Si è agitata lentamente la provetta per 3 minuti in modo da ottenere la formazione di una fase singola priva di emulsione. Si è lasciata la sospensione a riposo per una notte a 4°C. Dopo aver aggiunto 6,7 mL di cloroformio si è nuovamente agitata la provetta per 3 minuti. Si sono introdotti 2,5 mL di acqua e si è proceduto ad agitare come descritto in precedenza. Dopo centrifugazione si è asportata la fase superiore contenente l'acqua e il DMSO. La fase organica, costituita dal metanolo e dal cloroformio e contenente tutti i lipidi, è stata lavata 3 volte con 4,8 mL di KCl 2M. Dopo ogni lavaggio si è eseguita una centrifugazione e si è eliminata la fase acquosa.

L'estratto lipidico è stato portato a secco al Rotavapor e ridisciolti in 5 mL di cloroformio portando a volume in un matraccio.

**Analisi degli acidi grassi a lunga catena.** Gli acidi grassi sono stati analizzati in gascromatografia previa me-

tilazione secondo Christie (30). Si è utilizzato un gascromatografo digitale DANI GC 1000 DPC, equipaggiato con colonna capillare OV1, 10 m di lunghezza, diametro interno di 0,53 mm, spessore del film di 2,65 µm e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), nelle seguenti condizioni: temperatura dell'iniettore 290°C, temperatura iniziale del forno 80°C, temperatura finale di 280°C raggiunta con i seguenti gradienti di temperatura: da 80° a 120°C a 10°C/minuto, da 120° a 220°C a 2°C/minuto e da 220 a 280°C a 10°C/minuto, temperatura finale di 280°C per 10 minuti; carrier gas azoto; volume di iniezione 2 µL; l'analisi è stata condotta in splitless.

**Determinazione dell'ergosterolo.** L'estratto lipidico cellulare è stato saponificato secondo Taylor et al. (27). La frazione insaponificabile è stata estratta per 3 volte con 15 mL di dietil etere, portata a secco al Rotavapor e ridisciolti in un volume noto di isopropanolo.

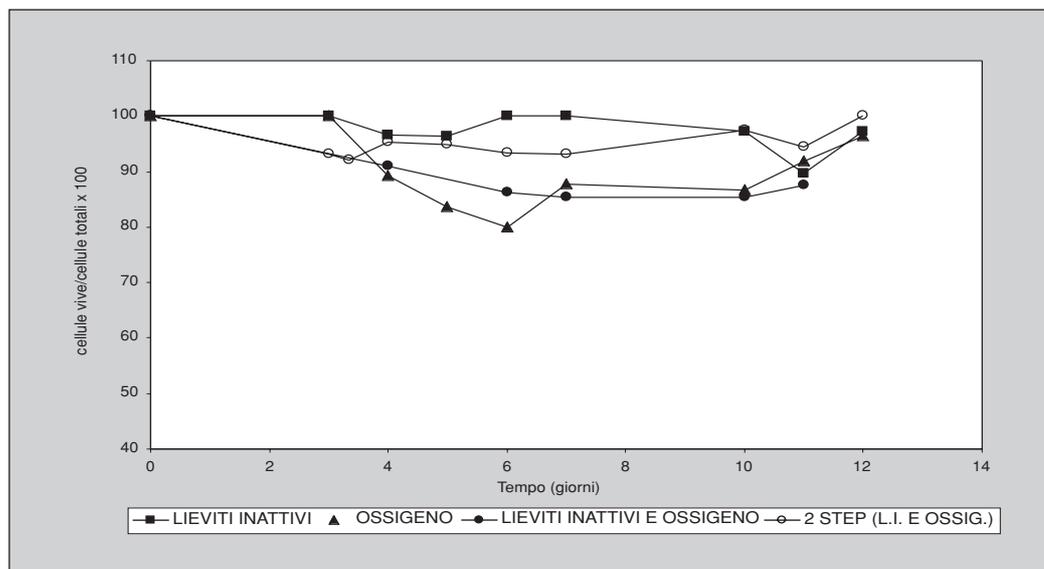
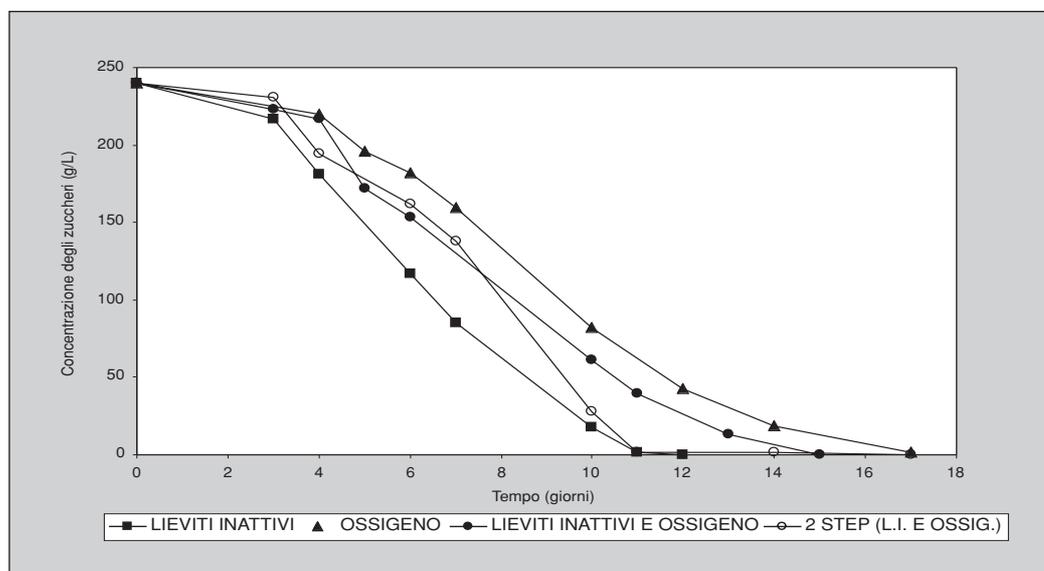
La determinazione dell'ergosterolo è stata effettuata per via enzimatica, utilizzando l'apposito kit Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

## Vinificazioni su scala pilota

Una massa di uva Char-donnay è stata pigiata, omogeneizzata e solfitata secondo le normali pratiche di cantina. Il mosto è stato quindi pressato e inviato alla decantazione statica con l'aggiunta di 1 g/hL di enzima pectolitico. La concentrazione zuccherina della massa omogenea risultava pari a 208,2 g/L di zuccheri riduttori (corrispondenti ad un grado alcolico potenziale di circa 12,49°V/V). La torbidità del mosto è stata mantenuta a 90 NTU.

La massa è stata inoculata con 20 g/hL di lievito selezionato in forma secca (ceppo M69) seguendo il protocollo di reidratazione e acclimatazione alla temperatura



**Fig. 1 - Vitalità cellulare****Fig. 2a - Consumo degli zuccheri totali**

di fermentazione, indicato dalla ditta fornitrice.

Il mosto è stato quindi addizionato di 10 g/hL di sali ammoniacali (ammonio solfato e ammonio fosfato in rapporto 1:1) e di 60 mg/hL di tiamina. La massa è stata omogeneizzata e distribuita nelle tre vasche, A, B e C, ciascuna riempita con 4,4 hL di mosto inoculato.

Dopo il riempimento sono stati eseguiti i primi trattamenti nelle vasche B e C. Nella vasca B si sono aggiunti 20 g/hL di lieviti inattivi; nella vasca C si è effettuata l'aggiunta di 1 mL/L di ossigeno.

Il secondo trattamento è stato effettuato quando un terzo degli zuccheri totali inizialmente presenti era stato consumato. Sono stati aggiunti:

- Tesi A: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico;

- Tesi B: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico; 20 g/hL di lieviti inattivi;

- Tesi C: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico; 1 mL/L di ossigeno.

Il terzo trattamento, uguale al secondo, è stato effettuato all'ottavo giorno di fermen-

tazione:

- Tesi A: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico;

- Tesi B: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico; 20 g/hL di lieviti inattivi;

- Tesi C: 5 g/hL di solfato d'ammonio e 5 g/hL di fosfato biammonico; 1 mL/L di ossigeno.

Quotidianamente da ognuna delle tre vasche si è prelevato un campione, alla profondità di un metro dal fondo della vasca, sul quale sono stati analizzati:

1. la cinetica di crescita cellulare, da cui sono stati dedotti il numero di divisioni cellulari e la biomassa complessivamente prodotta;

2. il consumo degli zuccheri (glucosio e fruttosio);

3. la produzione di acido acetico;

4. la produzione di etanolo;

5. la composizione della frazione lipidica cellulare;

6. la produzione di acetaldeide.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate come descritto per la fase 1.

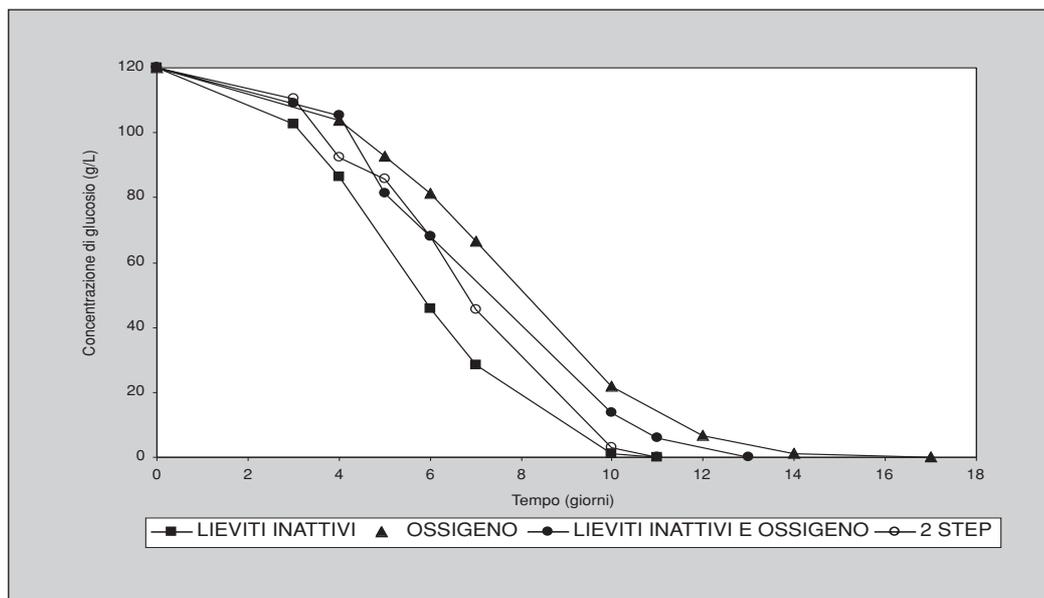
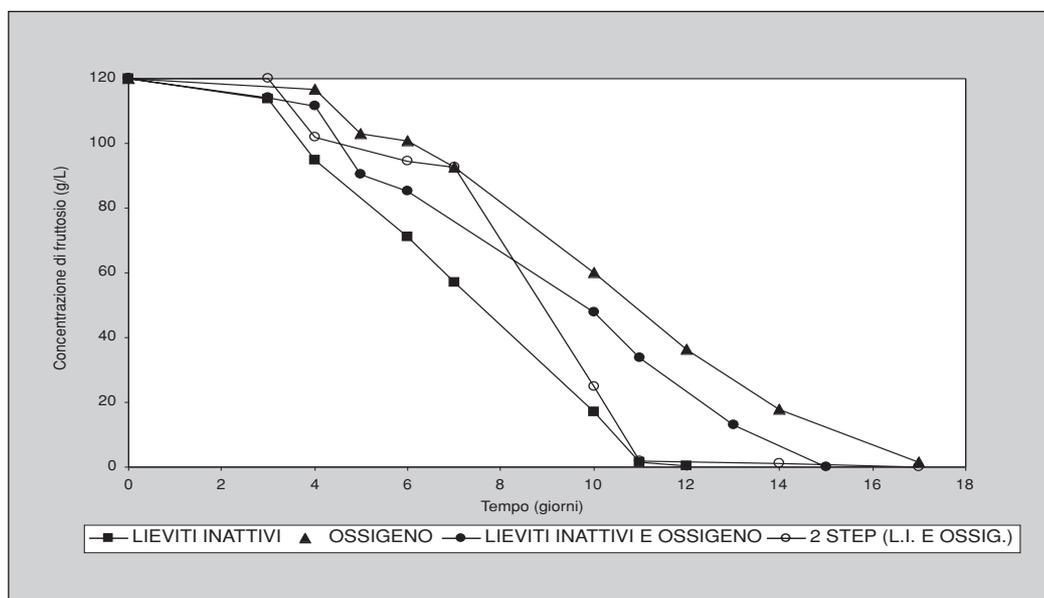
L'evoluzione della concentrazione di acetaldeide è stata determinata per via spettrofotometrica utilizzando l'apposito kit (Boehringer Mannheim/R-Biopharm).

## Risultati della fase 1

**Cinetiche di crescita (Tab. 1).** Nella tesi "lieviti inattivi", dopo il primo trattamento al giorno 0, le cellule hanno dato origine a 5 divisioni cellulari complete nei primi tre giorni della fermentazione. A partire dal terzo giorno è iniziata la fase di crescita logaritmica terminata il giorno 7 con una concentrazione cellulare pari a  $1,9 \times 10^8$  cellule/mL. Complessivamente le cellule hanno dato origine a 8,3 divisioni cellulari.

Nella tesi "ossigeno", la fase di latenza è durata tre giorni. La fase di crescita logaritmica è iniziata il giorno



**Fig. 2b - Consumo di glucosio****Fig. 2c - Consumo di fruttosio**

3 e terminata il giorno 7, quando era stata raggiunta, in seguito al secondo trattamento con ossigeno, la concentrazione cellulare massima ( $2,45 \times 10^8$  cellule/mL); complessivamente si sono verificate 9,4 divisioni cellulari. La quantità di biomassa prodotta è risultata maggiore rispetto a quella delle altre tesi.

Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" la fase di latenza ha avuto una durata di tre giorni. Dopo il secondo trattamento le cellule si sono moltiplicate più rapidamente rispetto alla tesi in cui sono stati aggiunti solo i lieviti

inattivi. La fase di crescita logaritmica è risultata più veloce anche rispetto alla tesi in cui è stato aggiunto solo ossigeno, ma la produzione di biomassa in fase stazionaria si è rivelata nettamente inferiore. Complessivamente le cellule hanno dato origine a 8 divisioni cellulari.

Nella tesi "2 step" l'andamento della cinetica di crescita cellulare è stato uguale a quello della tesi "lieviti inattivi" nei primi quattro giorni della fermentazione; dal quarto al quinto giorno la produzione di biomassa è rallentata; in seguito al trat-

tamento con ossigeno al quinto giorno, le cellule hanno ripreso a crescere lentamente raggiungendo il plateau al decimo giorno ( $1,9 \times 10^8$  cellule/mL). Complessivamente le cellule hanno originato 9,3 divisioni cellulari.

**Vitalità cellulare (Fig. 1).** Nella tesi "lieviti inattivi" la vitalità delle cellule è rimasta costantemente al di sopra del 96%. Nella tesi "ossigeno" si è raggiunto il minimo della percentuale di vitalità al sesto giorno (80%). In seguito si è verificato un aumento graduale di questo parametro, che si è assestato al 96% al giorno 12.

Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno", nella percentuale di cellule vive, si è osservata una lieve ma graduale diminuzione fino al settimo giorno della fermentazione. L'ultimo trattamento ha consentito infine di mantenere il livello di vitalità tra l'85% e l'87% fino al termine della fermentazione.

Nella tesi "2 step" la vitalità cellulare è stata piuttosto elevata nel corso della fermentazione. Si è toccato un minimo pari al 92% il giorno 3. L'ultimo giorno della fermentazione le cellule erano tutte vive.

**Consumo degli zuccheri (Fig. 2).** Nella tesi "lieviti inattivi" il glucosio è stato consumato rapidamente dal terreno di coltura in dieci giorni (Fig. 2b).

Nella tesi "ossigeno" soltanto dopo 2 settimane tutto il glucosio era stato consumato dal mezzo di crescita (Fig. 2b), mentre si sono dovuti attendere ancora 3 giorni per completare il consumo del fruttosio (Fig. 2c).

Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" il consumo del glucosio è risultato più veloce rispetto alla tesi in cui è stato fornito solo ossigeno, e più lento rispetto alla tesi in cui sono stati somministrati solo i lieviti inattivi (Fig. 2b).

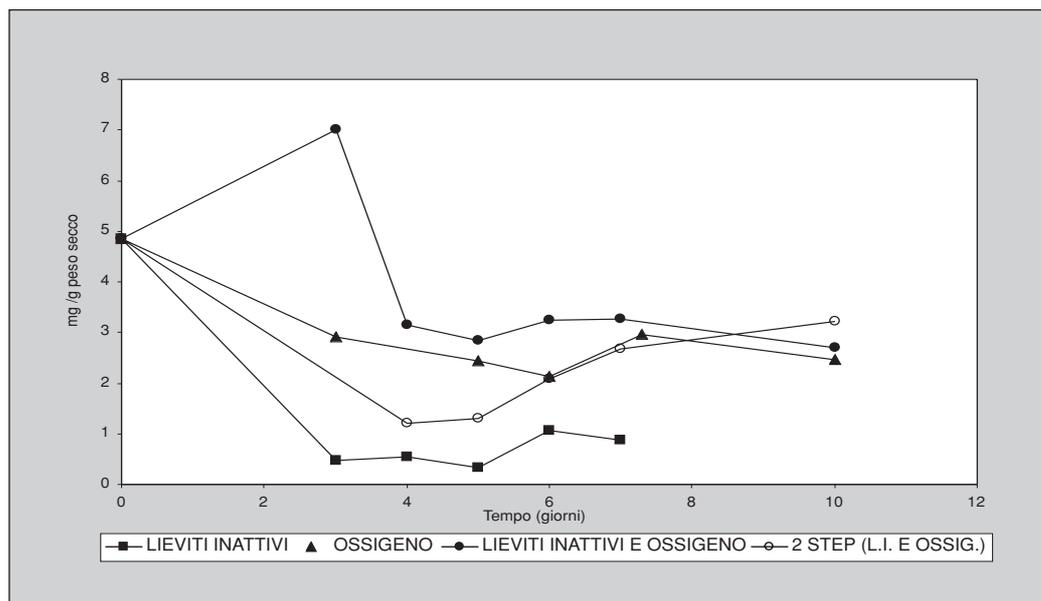
Nella tesi "2 step", come nella tesi "lieviti inattivi", il



**Tab. 3 - Cinetiche di crescita cellulare e biomassa prodotta**

Tesi	Numero di generazioni	Biomassa prodotta (cellule/mL)	Fase logaritmica (giorni)
Tesi A (test)	4,2	1,5 x 10 <sup>8</sup>	2
Tesi B (lieviti inattivi)	4,4	1,8 x 10 <sup>8</sup>	2
Tesi C (ossigeno)	4,36	1,75 x 10 <sup>8</sup>	2

Nelle vasche B e C i trattamenti sono stati effettuati nei giorni 0, 2 e 8.

**Fig. 3 - Contenuto cellulare in ergosterolo**

glucosio è stato assimilato completamente dal mezzo di crescita in dieci giorni; nel corso però della fermentazione il trend di consumo del glucosio è risultato più graduale rispetto alla tesi in cui sono stati forniti solo i lieviti inattivi.

Il trattamento effettuato nella tesi "lieviti inattivi" ha determinato un rapido consumo del fruttosio, che è scomparso dal mezzo di fermentazione in undici giorni (Fig. 2c).

Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" il trend di consumo del fruttosio si è posto, come per il glucosio, in una situazione intermedia rispetto alla tesi "lieviti inattivi" e alla tesi "lieviti ossigeno".

Nella tesi "2 step" la concentrazione di fruttosio non è diminuita in modo significativo nell'arco dei primi cinque giorni della fermentazione; il trattamento con ossigeno al quinto giorno ha determinato nell'immediato

un rallentamento del consumo di questo zucchero, ma a partire dal giorno successivo all'aggiunta di ossigeno e nei quattro giorni seguenti, il fruttosio è stato completamente assimilato (Fig. 2c).

**Contenuto cellulare in ergosterolo (Fig. 3).** Le cellule utilizzate per l'inoculo in ogni fermentazione avevano un contenuto in ergosterolo pari a 4,86 mg/g di cellule liofilizzate.

Nella tesi in cui sono stati aggiunti solo i lieviti inattivi si è verificata una drastica diminuzione del contenuto cellulare in ergosterolo nei primi tre giorni della fermentazione. Nei giorni successivi l'ergosterolo delle cellule non è aumentato in seguito ai trattamenti effettuati, ma si è attestato intorno ad un valore minimo.

Sia nella tesi in cui si è somministrato ossigeno, che in quella in cui sono stati forniti lieviti inattivi e ossi-

geno in contemporanea, il contenuto in ergosterolo delle cellule è risultato costantemente più elevato rispetto alla tesi precedente. È stato evidenziato in particolare un significativo arricchimento in ergosterolo nelle cellule trattate con i lieviti inattivi e l'ossigeno durante la fase di latenza. Il valore minimo è risultato superiore rispetto alle tesi precedenti.

Nella tesi "2 step" l'aggiunta dei lieviti inattivi al giorno 0 ha stimolato le divisioni cellulari con conseguente diminuzione del contenuto cellulare in ergosterolo nei primi giorni di fermentazione. L'aggiunta di ossigeno al giorno 5, in corrispondenza del quale era stato raggiunto il contenuto cellulare minimo in ergosterolo, ha determinato un aumento significativo di questo composto nelle cellule.

**Indici di insaturazione degli acidi grassi cellulari a lunga catena (LCFA) (Tab. 2).** Nella Tab. 2 sono stati riportati gli indici di insaturazione degli acidi grassi cellulari a lunga catena. Gli indici di insaturazione sono stati definiti come rapporti tra la somma degli acidi grassi insaturi (acido palmitoleico C16:1 e acido oleico C18:1) e la somma dei quattro acidi grassi presenti nelle membrane di *Saccharomyces cerevisiae* (acido palmitico C16:0, acido palmitoleico C16:1, acido stearico C18:0 e acido oleico C18:1). Per ciascuna tesi sono stati riportati i dati ottenuti in corrispondenza dell'inizio della fase di crescita logaritmica e della fine delle divisioni cellulari.

In tutte le tesi analizzate è stata evidenziata una preva-



**Tab. 4 - Produzione di acido acetico e acetaldeide**

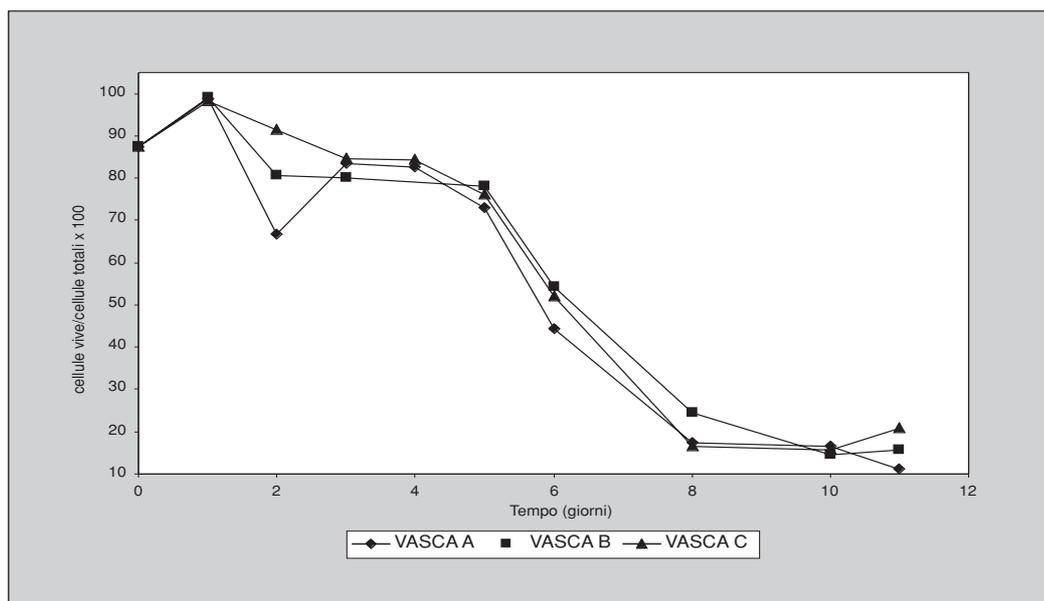
g/L di acido acetico a fine fermentazione	
Vasca A	0,25
Vasca B	0,25
Vasca C	0,27

Nelle vasche B e C i trattamenti rispettivamente con lieviti inattivi e ossigeno sono stati effettuati nei giorni 0, 2 e 8.

**Tab. 5 - Indici di insaturazione**

	Inizio fase di crescita	Fine fase di crescita
Tesi A	61,5%	30,4%
Tesi B	54%	37%
Tesi C	47,5%	28,8%

Rapporto percentuale fra la somma degli acidi grassi insaturi e gli acidi grassi totali.

**Fig. 4 - Vitalità cellulare**

lenza degli acidi grassi insaturi, C16:1 e C18:1, nella composizione della frazione lipidica delle membrane cellulari.

Nella tesi "lieviti inattivi" si è registrato un incremento nel valore dell'indice di insaturazione del 4,6%; tale incremento è risultato maggiore nelle cellule trattate con solo ossigeno; l'indice di insaturazione, infatti, è aumentato del 7,4%.

Nella tesi "lieviti inattivi e ossigeno" in cui sono stati forniti contemporaneamente lieviti inattivi e ossigeno non si sono rilevate differenze significative tra l'inizio e la fine della fermentazione.

Nella tesi "2 step" in cui si sono forniti prima i lieviti inattivi e in un secondo tempo l'ossigeno, l'aumento della frazione insatura degli acidi grassi è risultato ancora più consistente della tesi "ossigeno"; infatti l'indice di insaturazione è aumentato dell'11%.

## Risultati della fase 2

**Cinetiche di crescita cellulare (Tab. 3).** In tutte le tesi l'avvio della fermentazione è stato molto rapido e non si è osservata una fase di latenza.

Nella Tesi A la massima concentrazione cellulare è stata raggiunta al secondo giorno ( $1,5 \times 10^8$  cellule/mL). Complessivamente le cellule hanno dato origine a 4,2 divisioni cellulari.

Nella Tesi B l'aggiunta dei lieviti inattivi al giorno 0 ha prolungato la fase di crescita logaritmica e, al secondo giorno di fermentazione, si è arrivati ad un plateau di concentrazione pari a  $1,8 \times 10^8$  cellule/mL con 4,4 divisioni cellulari complessive. Le aggiunte successive non hanno prodotto effetti evidenti sulla produzione di biomassa totale.

Nella Tesi C l'aggiunta di

ossigeno al giorno 0 ha prodotto lo stesso effetto di allungamento della fase di crescita logaritmica evidenziato nella tesi precedente. Si è raggiunta una concentrazione cellulare massima al secondo giorno pari a  $1,75 \times 10^8$  cellule/mL e il numero di divisioni cellulari totali è risultato essere di 4,36. Le aggiunte seguenti non hanno determinato effetti sulla produzione totale di biomassa.

**Vitalità cellulare (Fig. 4).** La vitalità delle cellule è diminuita nel corso delle tre fermentazioni. L'aggiunta di ossigeno (Tesi C) ha consentito di mantenere un livello di vitalità cellulare più elevato rispetto alle altre tesi durante i primi giorni della fermentazione. Nella Tesi B le cellule hanno acquisito vitalità maggiore verso il termine della fermentazione.

**Consumo degli zuccheri (Fig. 5).** Nella Tesi A il consumo degli zuccheri è risultato più rapido nei primi giorni per poi rallentare (Fig. 5c). La velocità di fermentazione si è mantenuta più costante nel caso del trattamento con lieviti inattivi (Tesi B), mentre l'apporto di ossigeno ha dato origine ad un comportamento intermedio (Tesi C). Queste differenze si sono rivelate particolarmente evidenti sul consumo del fruttosio la cui velocità, dopo il quinto giorno della fermentazione, è risultata notevolmente maggiore nella vasca in cui sono stati aggiunti i lieviti inattivi (Fig. 5b). Nella tesi C, in cui è stato somministrato l'ossigeno, la velocità di consumo del fruttosio è andata diminuendo a partire dal quinto giorno della fermentazione, pur risultando



tando comunque più rapida rispetto al testimone (Fig. 5b).

**Produzione di acido acetico (Tab. 4).** La produzione di acido acetico finale è risultata contenuta in tutte le tesi.

Nella Tesi A la concentrazione di acido acetico nel mosto è rimasta costante tra il giorno 1 ed il giorno 3. A partire dal giorno 4 è lentamente aumentata e il giorno 11 ha raggiunto il valore più alto (0,25 g/L).

Nella Tesi B l'andamento è risultato meno regolare con un massimo di concentrazione al giorno 8 (0,32 g/L). Dopo l'ultimo trattamento, il tenore in acido acetico del mosto è diminuito riportandosi sui valori riscontrati nel controllo.

Nella Tesi C l'acido acetico è aumentato dal giorno 2 al giorno 6, dove ha raggiunto il valore di concentrazione più elevato (0,27 g/L).

**Contenuto cellulare in ergosterolo (Fig. 6).** In tutte le tesi il tenore cellulare in ergosterolo è diminuito regolarmente. Il giorno 10 nelle cellule trattate con lieviti inattivi (Tesi B) l'ergosterolo risultava più elevato rispetto al testimone. Nella Tesi C l'ergosterolo delle cellule è sceso a un livello più basso nel corso del primo giorno di fermentazione rispetto alle tesi precedenti, ma in seguito ai trattamenti con ossigeno il suo contenuto minimo si è assestato sugli stessi valori del controllo.

**Indici di insaturazione degli acidi grassi cellulari a lunga catena (LCFA) (Tab. 5).** Per ciascuna tesi sono stati riportati i dati ottenuti in corrispondenza dell'inizio della fase di crescita logaritmica e della fine delle divisioni cellulari.

Nella Tesi A si è verificato un aumento della frazione satura degli acidi grassi. Nella Tesi B l'aggiunta dei lieviti inattivi ha permesso di contenere l'abbassamento del tenore di acidi grassi insaturi. Infatti la diminuzione percentuale è risultata inferiore alla

tesi precedente (17% invece di 31,1%). Anche nella Tesi C il trattamento, che prevedeva l'aggiunta di ossigeno, ha contribuito a diminuire l'entità dell'abbassamento del valore del rapporto di insaturazione, che era del 18,7%, rispetto al testimone.

## Discussione della ricerca

I risultati ottenuti nelle prove di laboratorio hanno evidenziato che l'aggiunta dei lieviti inattivi ha indotto un numero di divisioni cellulari maggiore all'inizio della fermentazione; l'ossigeno, invece, ha determinato un notevole aumento della biomassa a fine fermentazione. I lieviti inattivi hanno inoltre permesso di mantenere un tasso di vitalità cellulare piuttosto alto nel corso di tutta la fermentazione. Con l'ossigeno invece la vitalità delle cellule è aumentata soltanto dopo un giorno dal trattamento: quest'andamento che è stato riscontrato costantemente in tutte le tesi di laboratorio in cui è stato somministrato l'ossigeno, evidenzia un possibile effetto di induzione di staticità, se non addirittura di tossicità, sul metabolismo cellulare del gas, quando venga dosato per un breve periodo di tempo e in un volume di liquido ridotto.

Il consumo degli zuccheri, e in modo particolare del fruttosio, è risultato rapido sia nella tesi in cui sono stati aggiunti solo i lieviti inattivi che nella tesi dove lieviti inattivi e ossigeno sono stati somministrati in due step successivi.

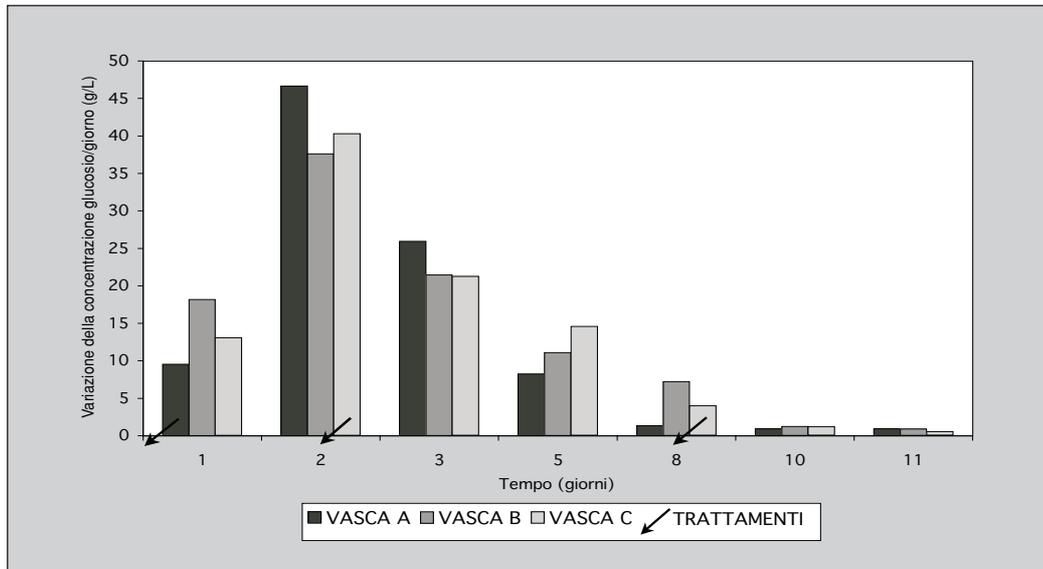
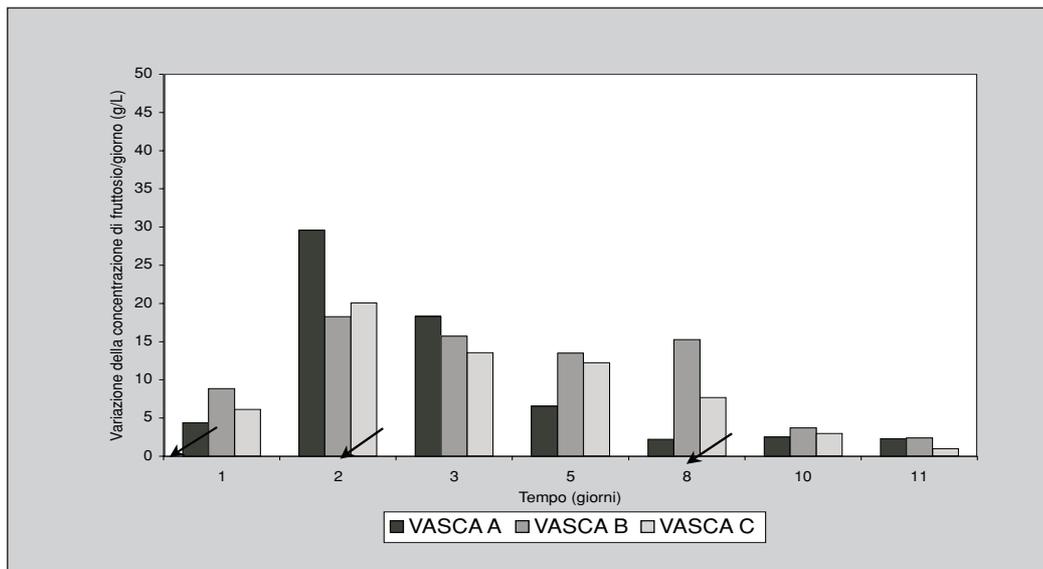
L'aggiunta di ossigeno nelle prove di laboratorio ha dato apparentemente i risultati meno favorevoli. Malgrado l'arricchimento delle cellule in ergosterolo e la maggiore produzione di biomassa rispetto alle altre tesi, non si è verificato un più rapido consumo degli zuccheri, nonostante l'aumento della richiesta energetica, dovuto a un numero maggiore di divisioni cellulari. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che l'ossi-

geno potrebbe indurre nei lieviti, pur in presenza di concentrazioni di glucosio che normalmente inibiscono l'attività mitocondriale, una certa attività respiratoria. Di conseguenza gli zuccheri sarebbero consumati più lentamente, essendo la resa energetica della respirazione superiore a quella della fermentazione. Questo fenomeno potrebbe avere un'ancora maggiore rilevanza nella parte finale della fermentazione, quando il contenuto in glucosio si trova sotto la soglia del 2%. Ciò malgrado, la produzione complessiva di etanolo non è risultata inferiore, nella tesi "ossigeno", al termine del ciclo fermentativo (dati non pubblicati).

L'associazione dei trattamenti con cellule di lievito sottoposte a trattamenti di devitalizzazione all'inizio della fermentazione con l'uso di ossigeno in uno stadio già avanzato della fermentazione (tesi 2 step), ha dato origine ad un consumo degli zuccheri più rapido rispetto all'utilizzo del solo ossigeno, completando la fermentazione negli stessi tempi della tesi in cui sono stati usati solo i lieviti inattivi.

Il contenuto in ergosterolo delle cellule trattate con lieviti inattivi è diminuito parallelamente alle divisioni cellulari, attestandosi su un valore minimo al loro termine. È opinione comunemente accettata che un elevato contenuto in ergosterolo delle cellule si accompagni ad una buona funzionalità del metabolismo cellulare ed una buona efficienza fermentativa (23). Tuttavia, in seguito all'aggiunta di lieviti inattivi, pur essendo stato rilevato un maggiore vigore fermentativo, non si è osservato un arricchimento in ergosterolo delle cellule, ma, al contrario, una graduale diminuzione di questo composto col procedere delle divisioni cellulari; questa diminuzione si è assestata, al termine delle divisioni cellulari, in corrispondenza di un valore minimo che potrebbe quindi corrispondere al minimo compatibile con la funzionalità della cellula. Si potrebbe



**Fig. 5a - Velocità di fermentazione - Glucosio****Fig. 5b - Velocità di fermentazione - Fruttosio**

pertanto dedurre che l'ergosterolo possa essere stato il fattore limitante che ha dato origine all'arresto delle divisioni cellulari, senza tuttavia precludere l'attività fermentativa e la vitalità della cellula in fase stazionaria. In tutte le tesi in cui è stato somministrato l'ossigeno, il contenuto cellulare in ergosterolo delle cellule è risultato più elevato anche al termine delle divisioni cellulari.

Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi a lunga catena delle membrane delle cellule di lievito, i risultati evidenziano che in tutte le tesi, ad eccezione di

quella in cui lieviti inattivi e ossigeno sono stati somministrati contemporaneamente e per la quale i risultati non sono cambiati in seguito ai trattamenti effettuati, le cellule si sono arricchite in acidi grassi insaturi; l'aumento più consistente della frazione insatura degli acidi grassi si è verificato nelle cellule trattate prima con i lieviti inattivi e in seguito con ossigeno (tesi "2 step"). L'arricchimento in acidi grassi insaturi delle membrane sembrerebbe quindi seguire un andamento diverso ed indipendente rispetto all'ergosterolo.

Nelle prove di cantina l'ag-

giunta dei lieviti inattivi ha indotto un aumento della produzione di biomassa e ha accelerato il consumo degli zuccheri, in particolare del fruttosio. L'aggiunta di ossigeno ha consentito di mantenere più alto il tasso di vitalità cellulare, soprattutto nella prima parte della fermentazione. L'acido acetico è risultato basso e senza differenze significative fra le varie tesi.

Sotto il profilo della composizione qualitativa della frazione lipidica cellulare, si è osservato che nel corso della fermentazione il contenuto delle cellule in ergosterolo e in acidi grassi insaturi diminuiva in tutte le tesi. A differenza delle prove svolte in laboratorio è da sottolineare il fatto che in cantina, già al secondo giorno di fermentazione, in tutte le vasche è stata riscontrata una carenza di sostanze azotate (messa in evidenza dalla produzione di idrogeno solforato). Come conseguenza si può ipotizzare che, a causa di una riduzione della sintesi proteica, anche la produzione delle proteine necessarie sia all'uptake dei nutrienti che alla biosintesi dei composti lipidici, sia stata ridotta. In particolare infatti l'ergosterolo scendeva anche nella tesi C, sebbene in modo meno evidente rispetto alle altre tesi, dove l'ossigeno avrebbe dovuto invece favorirne la biosintesi. L'aggiunta dei lieviti inattivi sembra comunque aver consentito un'assimilazione diretta di ergosterolo e acidi grassi insaturi (UFA) la cui diminuzione è risultata meno accentuata rispetto alle altre tesi.

## Considerazioni conclusive

I risultati hanno messo in evidenza l'importanza del ruolo nutrizionale della frazione lipidica contenuta nelle strutture cellulari dei lieviti inattivi. L'aggiunta di strutture cellulari del lievito nel corso delle fermentazioni enologiche può pertanto migliorare l'efficienza fermentativa e ridurre i rischi di arresti prematuri di fermenta-



zione. Ciò può anche spiegare l'effetto positivo sulla ripresa di fermentazioni stentate talvolta ottenuto con l'utilizzo di scorze di lievito, che possono contenere una frazione significativa di membrane cellulari.

Nelle condizioni prese in esame, la somministrazione di ossigeno ha dato origine ad un non così significativo aumento dell'attività fermentativa, anche se la frazione lipidica cellulare è risultata arricchita in ergosterolo. È opportuno sottolineare come l'uso di questo gas debba essere prudente in condizioni enologiche, e richieda tecnologie avanzate di dosaggio e somministrazione, messe a punto in modo tale da consentire al produttore di sfruttare i vantaggi dell'ossigeno senza doversi curare di eventuali rischi.

Nell'ottica di una strategia di gestione della nutrizione di *S. cerevisiae* in fermentazione, si può pertanto concludere che l'apporto di ossigeno, pur migliorando la vitalità delle cellule, potrebbe non essere sufficiente a compensare la carenza in steroli e acidi grassi insaturi delle membrane, che necessitano di un apporto nutrizionale esogeno. L'apporto di lieviti inattivi risulta bilanciato nel sostenere il fabbisogno di sostanze azotate e lipidiche (acidi grassi saturi, insaturi e steroli) e soprattutto può essere di aiuto anche nelle fermentazioni associate a tecniche enologiche che non prevedono (come l'iper-riduzione per esempio) o non consentono, di dosare ossigeno in modo corretto. ■

*Parole chiave:* fermentazione alcolica, *S. cerevisiae*, lieviti inattivi, acidi grassi, ergosterolo, ossigeno.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia la *Intec S.r.l. di San Giovanni Lupatoto (VR)* per aver sostenuto interamente i costi di finanziamento della ricerca.

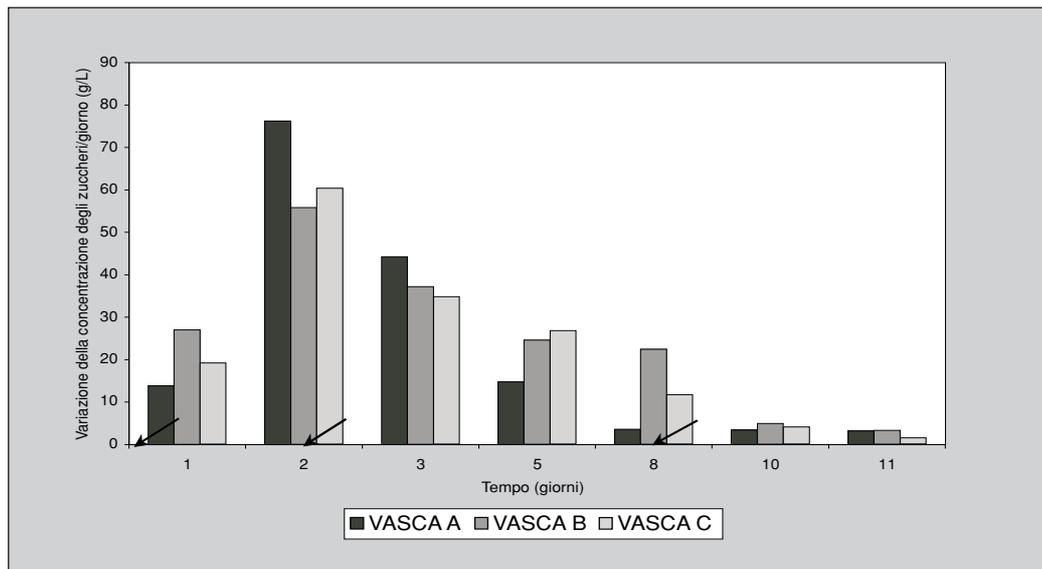
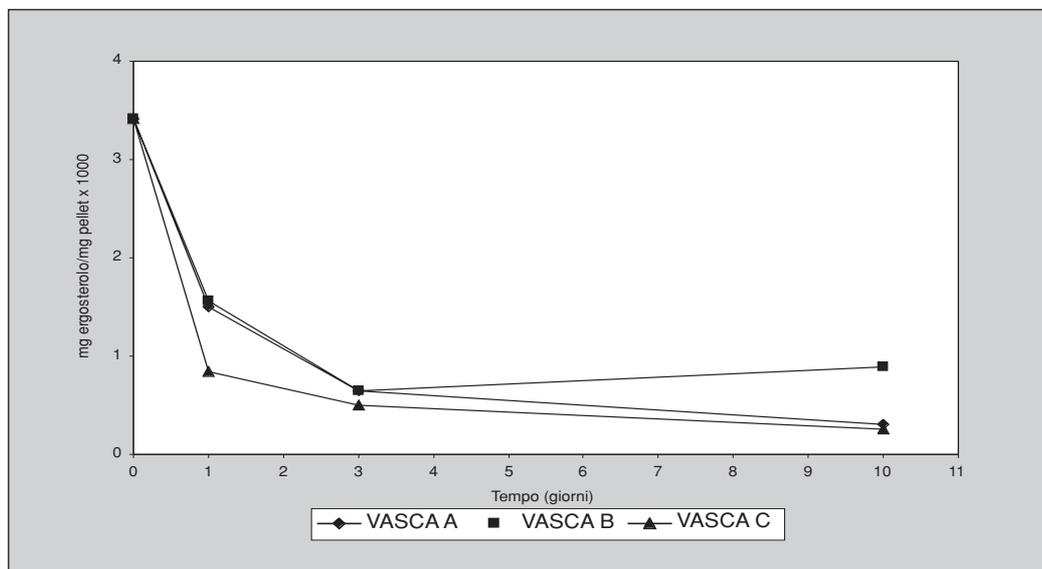
Un ringraziamento al dottor *Mario Redoglia* e alla cantina "*La Montagnetta*"

del signor *Mimmo Capello* per la collaborazione prestata nello svolgimento delle prove di cantina della fase 2.

## Bibliografia

1. Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C., Gustaffson, L. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9):3187-95.
2. Benckekrown, K. and Bonaly, R. 1992. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in presence of surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 673-678.
3. Biondi Bartolini, A. 2001. La gestione nutrizionale di *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentazione alcolica. Verifica di una nuova strategia nutrizionale: la risposta di alcuni ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* a differenti strategie nutritive. *Enoforum SIVE*, Montesilvano (Pescara), Italy, 12-14 maggio 2001.
4. Bisson, L. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1):107-119.
5. Bloomfield, D.K., Bloch, K. 1960. The formation of D9 unsaturated fatty acids. *Biol. Chem.* 235:337-345.
6. Borzani, W. and Vairo, M. 1958. Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells. *J. Bacteriol.* 76:251-255.
7. Bardi L., Cocito C., Marzona M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *Int. J. of Food Microbiology.* 47: 133-140.
8. Bardi L. Crivelli C., Marzona M. 1998. Esterase activity and release of ethyl esters of medium chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Canadian J. of Microbiology.* 44: 1171-1176.
9. Delfini, C., Bardi, L., Cocito, C., Conterno, L., Dell'oro, V., Ravaglia, S. 1993. Concentration en oxygène, en acides aminés, en acides gras et en sterols libres du moût et composition aromatique du vin. *Actes Symposium International "Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins"*, Montpellier, 9-10 février, 1993.
10. Hammond, J.R.M. 1993. Brewer's yeasts. In *The yeasts, Vol V: Yeast technology*. Edited by Rose A.H. & Harrison J.S.. Academic Press Limited, London, p 620.
11. Henry, S.A. 1982. Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic study. In *Molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: Metabolism and gene expression*, Edited by J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 101-158.
12. Jeffcoat, R. and James, A.T. 1984. The regulation of desaturation and elongation of fatty acids in mammals. In *Fatty acid metabolism and its regulation*. Edited by S. Numa, Elsevier, Amsterdam, pp. 85-112.
13. Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., Ribereau-Gayon, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acid produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1246-1249.
14. Larsson, C., von Stockar, U., Marison, I., Gustaffson, L. 1993. Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon- and nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 175(15): 4809-16.
15. Lewis, T.L., Keesler, G.A., Fenner, G.P., Parks, L.W. 1988. Pleiotropic mutations in *Saccharomyces cerevisiae* affecting sterol uptake and metabolism. *Yeast* 4:93-106.
16. Liden, G., Persson, A., Gustaffson, L., Niklasson, C. 1995. Energetics and product formation by *Saccharomyces*



**Fig. 5c - Velocità di fermentazione - Zuccheri totali****Fig. 6 - Contenuto cellulare in ergosterolo**

cerevisiae grown in anaerobic chemostats under nitrogen limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(6):1034-8.

17. Low, C., Rodriguez, R.J., Parks, L.W. 1985. Modulation of yeast plasma membrane composition of a yeast sterol auxotroph as a function of exogenous sterol. *Arch. Biochem. Biophys.* 240:530-8.

18. Manginot, C., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M. 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enz. Microb. Technol.*, 23(7-8): 511-7.

19. Mauricio, J.C., Guijo, S. and Ortega J.M. 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 301-308.

20. Monteiro, F.F. and Bisson, L.F. 1991. Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1):47-57.

21. Nicolini, G., Versini, G., Corradini, L., Grandi, C. 1998. Tenore azotato nei mosti e nei vini. *Vignevini* 25(9): 50-52.

Peddie, H.A.B. 1990. Ester formation in brewery fermentations. *J. Inst. Brew.* 96:327-331.

22. Quinn, P.J., Joo, F. and Vigh, L. 1989. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 53: 71-103.

23. Ratledge, C., and Evans, C.T. 1989. Lipids and their metabolism. In *The yeasts, Vol III: Metabolism and Physiology of Yeasts*. Edited by A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press Limited, London, pp. 367-455.

24. Rosi, I. and Bertucciolli, M. 1992. Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines. *J. Inst. Brew.* 98: 305-314.

25. Sablayrolles, J.M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.L., and Barre, P. 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82(4): 377-381.

26. Salmon, J.M. 1989. Effect of sugar transportation inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck oenological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:9535-9538.

27. Taylor, G.T., Thurston, P.A., Kirsop, B.H. 1979. The influence of lipids derived from malt spent grains on yeast metabolism and fermentation. *J. Inst. Brew.* 85:219-227.

28. Thurston, P.A., Taylor, R. and Ahvenainen, J. 1981. Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *J. Inst. Brew.* 87: 92-95.

29. Wakil, S.J., Stoops, J.K. and Joshi, V. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 537-579.

30. Christie, W.W., 1982. A simple procedure for rapid transmethylase of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 7: 1072-5.

