

INFLUENCE OF SOME ADDITIVES ON THE REHYDRATION OF ACTIVE DRY YEAST AND CORRELATION WITH THE SUBSEQUENT FERMENTATIVE PERFORMANCE DURING THE ALCOHOLIC FERMENTATION

E.Vaudano⁽¹⁾, O. Noti⁽¹⁾, E. Garcia-Moruno⁽¹⁾

⁽¹⁾CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia
Via P.Micca, 35 14100 ASTI ITALY
biologia.molecolare@isenologia.it

ABSTRACT

In this work, the effect of some additives on the rehydration process of three ADY strains, was tested. To monitor the response to the additives, we have observed the level of viability, measured with an epifluorescence methodology, at the end of rehydration experiments, and the fermentative performance considering the CO₂ loss and total cell/mL at 48 h from the inoculums in a synthetic must. The results showed the correlation between viability and the presence of magnesium ions in the rehydration media, but this enhancement of viability was not associated with a better performance in fermentation, which is, at contrary, significantly reduced. Among the additives tested, only the yeast hulls and ammonium seems to have positive effect. The influence of this additive was confirmed in fermentative trials using a natural grape must.

RIASSUNTO

In questo lavoro è stato saggiato l'effetto di alcuni additivi sul processo di reidratazione di tre ceppi di LSA (Lievito Secco Attivo). Oltre alla vitalità a fine reidratazione, misurata per epifluorescenza, sono state prese in considerazione anche le performance fermentative dopo l'inoculo in mosto sintetico, osservate attraverso lo sviluppo di CO₂ e crescita cellulare a 48 ore. I risultati hanno messo in luce la correlazione tra la presenza di Magnesio e la vitalità delle cellule al termine della reidratazione anche se questa non è risultata relazionata ad una migliore performance fermentativa del lievito in fermentazione. In sintesi il Mg ha una azione sicuramente positiva sulla vitalità del reidratato ma questa non si traduce in una migliore performance fermentativa che, invece, viene più o meno significativamente inibita. Considerando gli indici fermentativi, l'utilizzo delle scorze di lievito e dell'ammonio sembra avere effetti positivi. Prove successive in scala maggiore su mosto naturale d'uva hanno confermato l'azione positiva di questi additivi addizionati in reidratazione sull'andamento della fermentazione.

INTRODUZIONE

Dalla loro introduzione nei primi anni '70 le colture di lieviti selezionati utilizzabili come starter nella fermentazione alcolica sono andate sempre di più affermandosi grazie alla capacità di garantire l'omogeneità del prodotto in successive annate ed alla possibilità di ottenere determinate caratteristiche organolettiche nel vino. L'utilizzo di lieviti selezionati nella forma di lieviti secchi attivi (LSA) è diventata, quindi, una pratica ampiamente diffusa in enologia.

Di solito in cantina l'LSA viene reidratato prima dell'inoculo sospendendolo in mezzi acquosi contenenti o meno saccarosio ad una temperatura di 35-40° per un tempo variabile; la risposta dei ceppi a questa fase di risveglio concorre a determinarne la vitalità al momento dell'inoculo nel mosto e può influenzare le capacità fermentative e le capacità competitive in

fermentazione. Nonostante l'importanza di questa fase, fino ad oggi sono pochi i lavori volti a spiegare ciò che avviene durante la reidratazione sia dal punto di vista metabolico che a livello molecolare.

Vari fattori sembrano influenzare la vitalità di *Saccharomyces cerevisiae* durante la reidratazione. Insieme alle modalità di produzione, in particolare l'operazione di essiccazione (Eleutherio *et al.*, 1993), sono parametri importanti la concentrazione di trealosio intracellulare nell'LSA (Van Dijck *et al.*, 1995, Zikmanis *et al.*, 1988), la durata del periodo di reidratazione, la temperatura di reidratazione (Tracey *et al.*, 1986; Kraus *et al.*, 1981, Poirier *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 1992; Llauradó *et al.*, 2005), il pH del mezzo (Zikmanis *et al.*, 1988), la presenza di sostanze nutritive e minerali nel mezzo di reidratazione quali il magnesio (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2007) e la disponibilità di ergosterolo (Soubeyrand *et al.*, 2005). Questi fattori presumibilmente influenzano la struttura stessa delle membrane alterandone la permeabilità e determinando quindi cambiamenti nel flusso di molecole e ioni, determinando la maggiore o minore vitalità del reidratato (Rapoport *et al.*, 1995, 1982; Poirier *et al.*, 1999; Attfield *et al.*, 1997). Il presente lavoro mira a testare alcune sostanze nel mezzo di reidratazione del LSA sia per quanto riguarda la vitalità del reidratato sia nei confronti del comportamento fermentativo del lievito una volta inoculato nel mosto.

MATERIALI E METODI

Ceppi di lievito e condizioni di reidratazione e fermentazione

Le prove sono state effettuate utilizzando tre ceppi commerciali: Fermivin, Fermiblanco, Cépago Chardonnay prodotti dalla Oenobrand (Montpellier, Francia).

Le prove di reidratazione sono state condotte nel seguente modo: 1 grammo di lievito secco attivo è stato sospeso in 10 mL di terreno di reidratazione preventivamente sterilizzato posto in Falcon da 50 ml, preventivamente portato al 40°C. La sospensione è stata agitata per 10 secondi con il vortex e posta in termostato a 40°C. Dopo 30 min di incubazione il reidratato è stato di nuovo vortexato per 10 sec e sottoposto alle successive analisi.

Disegno sperimentale

L'effetto della composizione del mezzo di reidratazione è stato definito attraverso un disegno sperimentale usando il software Modde (Umetrics, Kinnelon, USA). Il disegno sperimentale adottato è stato il Fractional Factorial Design (Screening design) con 3 punti centrali. Le variabili indipendenti studiate (fattori) sono stati: ammonio fornito tramite un mix di ammonio solfato e ammonio solfato in intervallo di concentrazione compreso tra 0 e 6 mM (0-500 mg/l); scorze di lievito in un intervallo compreso tra 0 e 1000 mg/L (Yea); ergosterolo (0-200 mg/l) disperso sotto forma di sospensione alcolica (Erg); acido ascorbico (0-500 mg/L) /VitC); magnesio, (0-25 mM) distribuito come solfato di magnesio (Mg).

Le risposte (response) osservate sono state: vitalità del reidratato (%), etanolo prodotto dopo 48 ore (% vol), cellule totali dopo 48 ore (cell/mL).

Analisi

La vitalità del reidratato è stata determinata per epifluorescenza attraverso lo strumento Nucleocounter (Chemometec, Gydevang, Denmark) distribuita dalla Gibertini Elettronica srl in Italia. Lo strumento permette la rapida determinazione delle cellule totali e non vitali attraverso il segnale generato da un fluorocromoforo, ioduro di propidio che penetra nelle cellule non vitali e si lega al DNA. La vitalità è stata determinata attraverso una doppia lettura, una prima lettura delle cellule non vitali presenti nella sospensione e una seconda determinazione delle cellule totali attraverso l'uso di una soluzione che disattiva, e quindi rende accessibili al colorante, tutte le cellule.

L'etanolo prodotto e le cellule totali presenti dopo 48 ore di fermentazione sono state determinate dopo l'inoculo del reidratato in mosto sintetico MNS2 così composto: saccarosio 200 g/L, estratto lievito 3 g/L, estratto malto 3 g/L; solfato ammonico 1 g/L; fosfato ammonico 1 g/L; acido tartarico 3,5 g/L e Yeast Nitrogen base (senza solfato d'ammonio e aminoacidi) 1,7 g/L.

L'inoculo è stato condotto in ragione di 10×10^6 cell/mL, compatibile con l'inoculo effettuato in una fermentazione industriale, in beute da 300 mL riempite con 200 mL di mosto sintetico e poste in termostato a 20 °C. La prova è stata eseguita in triplo.

Dopo 48 ore di fermentazione sono state determinati il tenore alcolico calcolato attraverso la perdita di peso derivante dallo sviluppo di CO₂ e il numero di cellule totali determinate per via spettrofotometrica a 600 nm.

Prove di fermentazione in scala 2 litri

La fermentazione in scala 2 litri è stata allestita utilizzando mosto naturale di Chardonnay posto in beute da tre litri tappate con valvola di Müller. Il mosto presentava le seguenti caratteristiche: zuccheri 190 g/L, APA (azoto prontamente assimilabile) 200 mg/L, pH 3.55. L'inoculo del reidratato è stato eseguito in ragione di 10×10^6 cell/mL e la fermentazione è stata condotta a 16°C temperatura normalmente utilizzata nella vinificazione in bianco

La cinetica di fermentazione è stata seguita secondo quanto riportato da Sablayrolles et al. (1987) osservando la perdita di peso generata dall'emissione di CO₂ ogni 15 min attraverso un sistema automatizzato. I dati analizzati al calcolatore hanno permesso di ottenere lo sviluppo di CO₂/L e CO₂/L/ora. I parametri sono stati determinati durante 400 ore di fermentazione. Le prove sono state eseguite in doppio.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'utilizzo del lievito secco attivo in vinificazione, la fase di reidratazione è un passaggio relativamente trascurato in favore di un inoculo diretto del lievito secco, o di una semplice reidratazione in acqua. Eppure il lievito sotto forma essiccata deve riprendere, durante questo breve periodo, le sue funzionalità sia metaboliche che riproduttive ed è intuibile come il ripristino di queste funzioni influisca dopo l'inoculo nel mosto, sul più o meno corretto andamento fermentativo. Nel nostro lavoro abbiamo verificato l'influenza di alcuni additivi, tra cui alcuni normalmente utilizzati in ambito enologico, sulla reidratazione del LSA. Negli esperimenti di reidratazione abbiamo considerato come variabili fisse la temperatura di 40°C, il tempo di incubazione di 30 min e la presenza di una concentrazione di saccarosio pari al 5%, frutto di precedenti esperimenti di ottimizzazione del processo (dati non pubblicati).

Disegno sperimentale

Il risultati del disegno sperimentale di screening sono rappresentati in fig. 1 come effetti dei vari additivi.

Procedendo all'analisi dei dati per singolo ceppo utilizzato, per il ceppo Fermivin si sono osservate effetti significativamente positivi di ammonio e scorze di lievito sulla produzione di alcool e sul numero di cellule a 48 ore mentre influenzano in modo significativamente negativo la presenza di Erg e Mg. Sulla vitalità al termine della reidratazione agisce in modo significativo soltanto il Mg mentre gli altri additivi non sembrano influenzare questo parametro.

Per il ceppo Fermiblanc ha un effetto significativamente positivo l'aggiunta di ergosterolo e sulla produzione di etanolo calcolata come produzione di anidride carbonica e sul numero di cellule a 48 ore. Anche qui solo l'aggiunta di Mg ha un effetto positivo sulla vitalità mentre ha un effetto significativamente negativo sulla produzione di alcool e tendenzialmente

negativo sulle cellule a 48 ore. Gli altri fattori studiati non sembrano avere un effetto significativo.

Il ceppo Cépape Chardonnay mostra anch'esso il Mg come unico fattore influenzante la vitalità del reidratato. Non esistono effetti significativi degli additivi utilizzati sulle cellule a 48 ore di fermentazione mentre esiste un effetto negativo di Erg sulla produzione di etanolo.

Nel complesso, i dati mostrati indicano una certa disomogeneità nei riguardi degli effetti degli additivi sui due parametri fermentativi, cellule ed etanolo a 48 ore. Nei riguardi dell'ergosterolo il ceppo Fermiblanco si comporta in modo inverso rispetto agli altri due ceppi analizzati, in quanto sembra esserci un effetto positivo del composto.

Un dato interessante che viene osservato in tutti e tre i ceppi è che il magnesio è in grado di avere un effetto significativamente positivo sulla vitalità dopo reidratazione ma tende ad avere un effetto inibente sulle performance fermentativa.

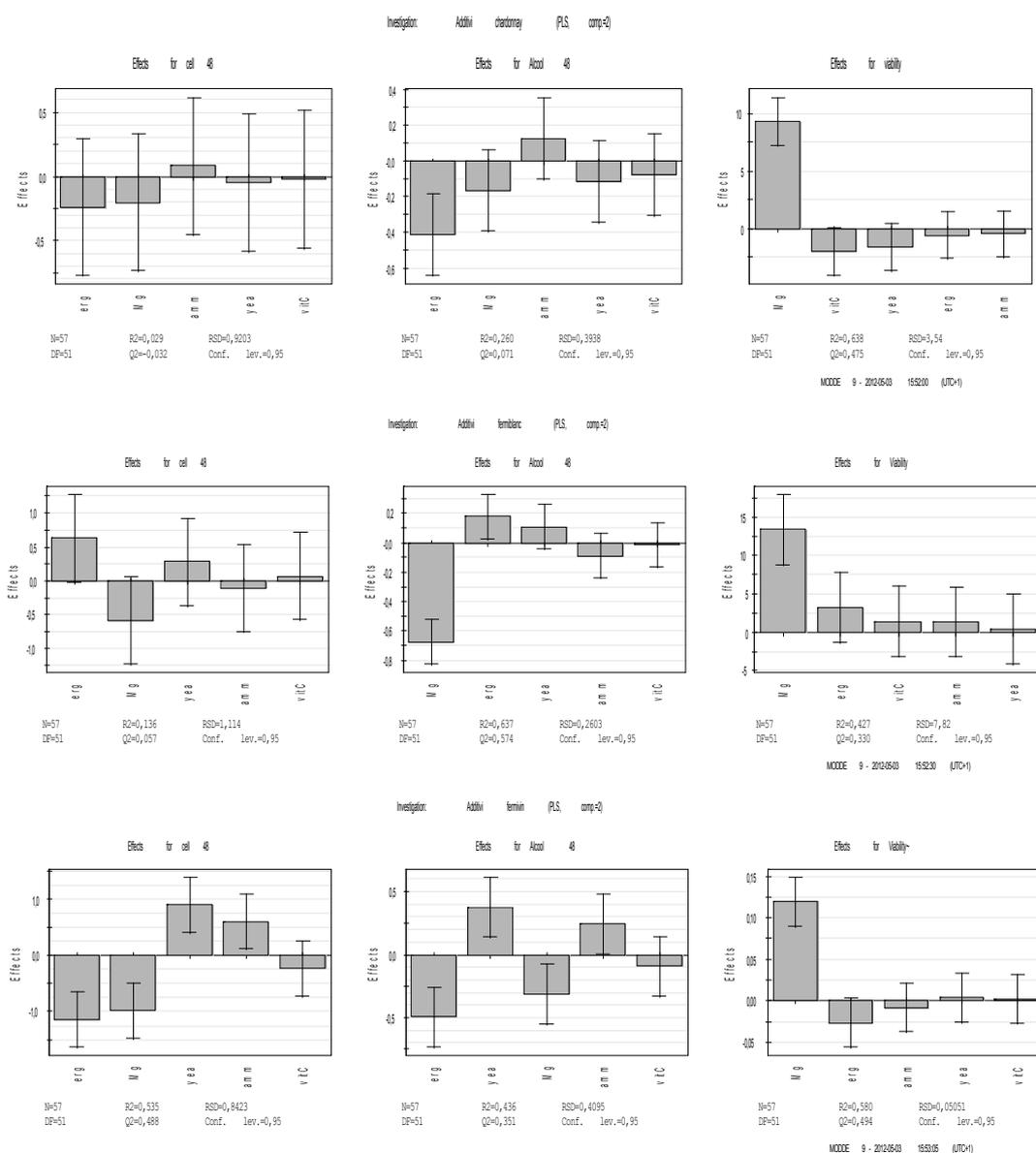


Fig. 1 Effetti degli additivi sui parametri: cellule/mL e produzione di etanolo (% vol.) a 48 ore dall'inoculo e vitalità a fine reidratazione.

Queste osservazioni sono confermate esaminando i dati complessivi con analisi PCA. È infatti possibile osservare una correlazione stretta tra la presenza di Mg nel mezzo di reidratazione sul quadrante superiore destro del grafico, ma questo non è correlato, anzi appare inversamente correlato sulla F1, la componente principale che spiega la maggiore variabilità, con le variabili fermentative che sembrano invece legate alla presenza di scorze di lievito nel mezzo.

In sintesi il Mg ha una azione sicuramente positiva sulla vitalità del reidratato già riscontrata da altri autori (Rodriguez-Porrata et al., 2007 e Trofimova et al., 2010) sulle cellule in reidratazione ma questa, nei nostri esperimenti, non si traduce in una migliore performance fermentativa che, viceversa, sembra significativamente inibita. Questo dato sembra confermare quanto rilevato da alcuni autori circa la non correlazione tra la vitalità del reidratato e le successive performance fermentative, che sembrano legate piuttosto al livello di attività metabolica o dalla presenza di alcuni metaboliti indicatori di stress quali il trealosio generati durante la fase di essiccazione (Kobayashi et al., 2007, Jenkins et al 2011).

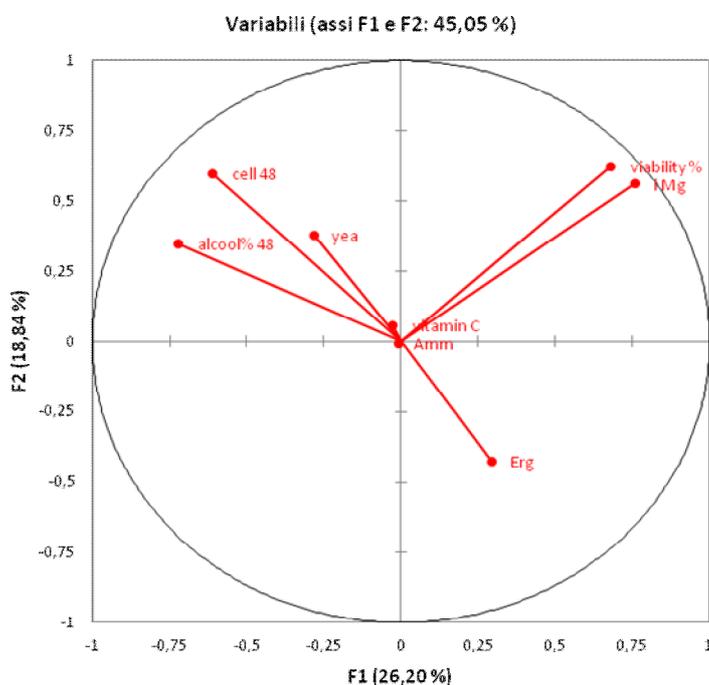


Fig. 2 Analisi PCA de i dati ottenuti dalle prove di reidratazione con i tre ceppi

Prove di fermentazione

Per confermare durante tutta la fermentazione ed in condizioni reali quanto osservato con i test fermentativi in mezzo sintetico, sono state allestite alcune prove fermentative in scala maggiore utilizzando un mosto naturale di uva *Chardonnay* e seguendo la cinetica di sviluppo della CO_2 fino alla fine della fermentazione. Mantenendo costanti le condizioni di temperatura di reidratazione a $40^\circ C$ il tempo di reidratazione di 30 min e la concentrazione di saccarosio del 5%, sono state testate l'aggiunta di scorze di lievito e di sali di ammonio, gli unici additivi, tra quelli saggiati in reidratazione, che sembrano in grado di avere effetti positivi sulla successiva fermentazione. Come testimone è stata considerata una reidratazione in acqua con 50 g/L di saccarosio mentre gli altri due terreni testati sono stati: Amm, composto da 50 g/L di saccarosio + 1.2 mM di ammonio fornito come sale ammonico (100 mg/L); Yea: 50 g/L di saccarosio + 1.0 g/L di scorze di lievito.

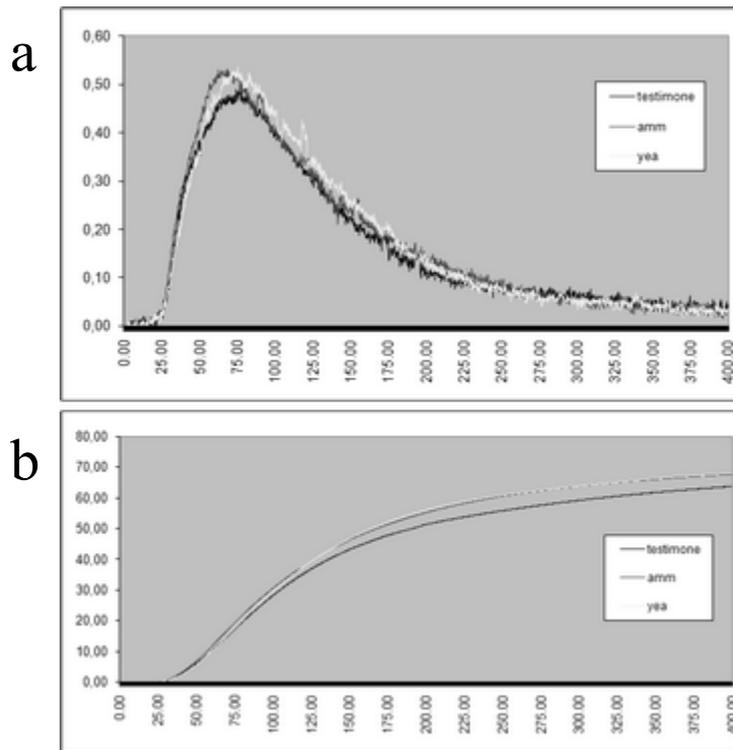


Fig. 3 Curve di fermentazione nelle prove in scala pilota per il ceppo *Fermivin*. a: differenziale di produzione di CO₂ (g/L/h); b CO₂ prodotta (g/L).

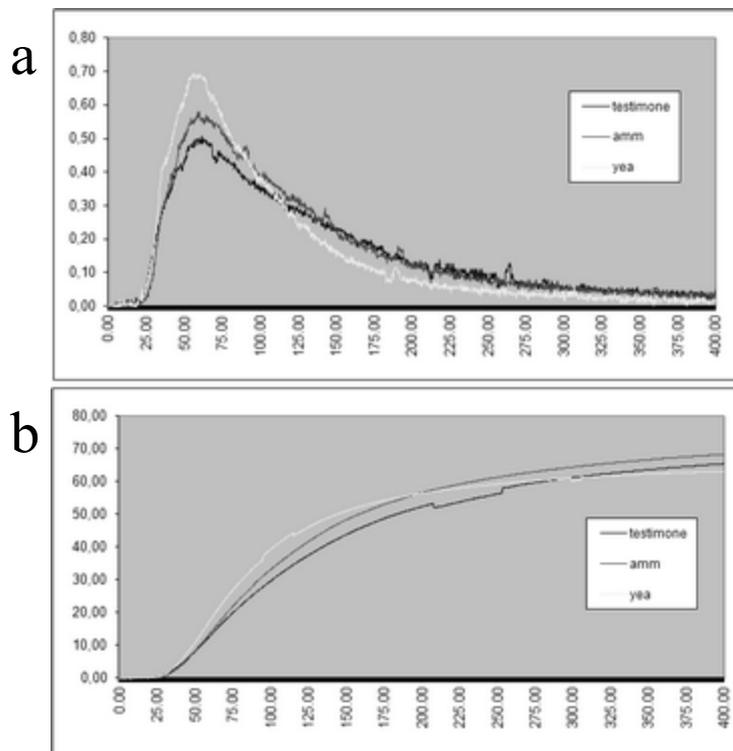


Fig. 4 Curve di fermentazione nelle prove in scala pilota per il ceppo *Cèpage Chardonnay*. a: differenziale di produzione di CO₂ (g/L/h); b CO₂ prodotta (g/L).

Sono stati esaminati i comportamenti di 2 ceppi : Fermivin e Cèpage Chardonnay.

Dai risultati visibili nelle fig. 3 e 4 si deduce, anche in questo caso, come la condizione di reidratazione influenzi l'andamento della fermentazione una volta che il reidratato è stato inoculato, con differenze visibili sia nell'emissione di CO₂ assoluta sia nel differenziale di emissione di CO₂ per litro per ora. Per ambedue i ceppi si nota come la vigoria fermentativa massima espressa con il picco di produzione oraria di CO₂ si raggiunga per tutte e tre le prove di reidratazione circa allo stesso momento. Nel caso del ceppo Cépage Chardonnay questo picco, posizionandosi a circa 63 ore, risulta anticipato rispetto a Fermivin che quindi si rivela un ceppo con uno sviluppo più lento con il massimo di attività fermentativa intorno a 75 ore. Nell'ambito di ogni ceppo la prova testimone mostra performance fermentative inferiori rispetto alle due prove con scorze di lievito (Yea) e ammonio (Amm). Con il ceppo Fermivin le due prove con gli additivi si equivalgono. Lo sviluppo totale di CO₂, correlato al consumo di zuccheri ed alla produzione di etanolo, risulta costantemente superiore nelle due prove rispetto al testimone terminando quindi in modo anticipato la fermentazione.

Nelle prove con il ceppo Cépage Chardonnay le tesi con gli attivanti mostrano dei massimi fermentativi notevolmente più elevati rispetto al testimone, in particolare quando la reidratazione viene fatta in presenza di scorze di lievito.

Osservando i dati della produzione totale di CO₂ si nota, tuttavia, un rallentamento della fermentazione in questa tesi, mentre il decorso della fermentazione per la tesi in cui il lievito è stato reidratato con ammonio, risulta più regolare, senza rallentamenti.

CONCLUSIONI

Questo studio ha confermato come le condizioni in cui viene eseguita la reidratazione possano influenzare la successiva fermentazione. In particolare è stata rilevata una azione delle scorze di lievito e di sali di ammonio nel mezzo di reidratazione. Una osservazione interessante riguardante l'aggiunta di Mg durante la reidratazione è che questo, pur avendo una azione positiva sulla vitalità, esercita una azione inibente nel successivo comportamento del lievito in fermentazione, ponendo degli interrogativi riguardanti la correlazione tra stato metabolico della cellula in reidratazione e il suo successivo comportamento in fermentazione.

BIBLIOGRAFIA

- Attfield, P.V. 1997. Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15: 1351-1357.
- Eleutherio, E.C.A., Araujo, P.S., Panek, A.D., 1993. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156, 263-266.
- Jenkins, Dm, Powell, Cd, Fischborn, T Smart, KA, 2011. Rehydration of active dry brewing yeast and its effect on cell viability. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 117: 377-382
- Kobayashi, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 2007. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103: 451-456.
- Poirier, I., Marechal, P.A., Richard, S., Gervais, P., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 87-92.
- Rapoport, A.I., Khrustaleva, G.M., Chamanis, G.Ia., Beker M.E., 1995. Yeast anhydrobiosis: permeability of the cytoplasmic membrane. *Mikrobiologija*, 64, 275-278.
- Rapoport, A.I., Markovskij, A.B., Beker, M.E., 1982. Increased permeability of the intracellular membranes in the dehydration and rehydration of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Mikrobiologija*, 51: 901-904.
- Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, Rozès, N., Mas, A., Cordero Otero, R., 2008.

Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 116-122

Soubeyrand, V., Luparia, V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., Salmon J.M., 2005. Formation of micelle containing solubilized sterols during rehydration and active dry yeasts improves their fermenting capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8025-8032

Sablayrolles JM, Barre P, Grenier P (1987) Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnology Techniques*, 1: 181–184.

Trofimova, Y., Walker, G. & Rapoport, A. (2010). Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration-rehydration. *FEMS Microbiology Letters*, 308: 55-61.

Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M., 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 109-115.

Zikmanis, P.B., Auzan, S.I., Kruche, R.V., Zikmane, M.A., Auzinia, L.P., 1984. Rehydration conditions for dehydrated *Saccharomyces cerevisiae* yeasts and cell viability. *Mikrobiologija*, 53: 208-212.

Zikmanis, P.B., Kruche, R.V., Auzinia, L.P., Margevicha, M.V., Beker, M.E, 1988. Distribution of trehalose between the cells and the rehydration medium in dehydrated *Saccharomyces cerevisiae*. *Mikrobiologija*, 57: 491-493.