

# Lieviti



- Non esiste una definizione univoca e precisa di lievito. In realtà le tipiche caratteristiche utilizzate per definire un lievito (ad esempio: microrganismi eucarioti unicellulari caratterizzati da suddivisione per gemmazione e capaci di dar luogo a fermentazione alcolica) non caratterizzano un ben preciso gruppo di specie.
- Esistono, infatti, alcune specie capaci di dare veri e propri miceli o pseudomiceli e altre che si dividono per fissione (ad es. *Schizosaccharomyces* sp.) e molti che non sono fermentanti (*Sporobolmyces* sp., *Lipomyces* sp., alcune *Pichia* sp.).
- La grandezza delle cellule varia da 5 a 30  $\mu\text{m}$  in lunghezza e 1-5  $\mu\text{m}$  di larghezza, essendo spesso ovoidali.
- I lieviti, da un punto di vista applicativo, spesso associano i vantaggi tipici dei procarioti (rapida crescita, genoma relativamente piccolo) con alcuni tipici degli eucarioti (espressione dei geni, modificazioni postranslazionali di proteine e loro secrezione).

La parete cellulare è principalmente costituita da polisaccaridi (mannano e glicani ramificati) e nel loro protoplasma (sede delle principali vie glicolitiche) esistono importanti strutture che hanno spesso importanti ruoli metabolici:

- nucleo con membrana ⇒ contiene la maggior parte del DNA
- mitocondri ⇒ ciclo di Krebs e respirazione
- ribosomi ⇒ sintesi proteica
- reticolo endoplasmatico ⇒ glicosilazione di proteine
- vacuoli ⇒ proteolisi
- perossisomi ⇒  $\beta$ -ossidazione di acidi grassi, ciclo del gliossilato

**Si può quindi dire che i lieviti sono una categoria *non-tassonomica* di funghi definita secondo criteri morfologici e fisiologici e più di 400 specie sono state fino ad oggi classificate**

Lieviti di maggior interesse biotecnologico sono ascomiceti o anamorfici (imperfetti, mancano di un ciclo sessuale).

**Alcuni lieviti (Ascomiceti) d'interesse biotecnologico**

<b>Genere</b>	<b>Specie (1990)</b>	<b>Asco</b>	<b>Origine</b>	<b>Caratteristiche</b>
<i>Dekkera</i>	2	Elongato	Nello stomaco e le feci dei conigli	Debolmente fermentanti
<i>Hansenula</i>	30	Elongato		Alcune specie non fermentano. Pseudoife e ife presenti
<i>Kluyveromyces</i>	12	Sferico fino ad elongato	Dal suolo, acqua, frutta, prodotti caseari, materiale vegetale di scarto	Fermentanti
<i>Lipomyces</i>	4	Ellissoidale fino ad elongato, spesso coniugati	Dal suolo	Non fermentanti
<i>Pachysolen</i>	1	Emisferico	Da liquori di botte	Fermentanti (anche xilosio)
<i>Pichia</i>	90	Sferico, ellissoidale	Dal suolo, alberi, frutta, acqua, insetti. <i>Hansenula</i> con spore a forma di cappello sono ora incluse	Alcune specie fermentano
<i>Saccharomyces</i>	9	Da sferico ad ellissoidale	Dal suolo, frutta, cibo, bevande	Fortemente fermentanti
<i>Schizosaccharomyces</i>	4	Allungato	Da frutta o succhi di frutta, vino	Fortemente fermentanti
<i>Yarrowia</i>	1	Da sferico ad ellissoidale	Dal suolo, residui industriali	Non fermentanti

- Ci si riferisce spesso a *Saccharomyces cerevisiae* come "tipico" lievito, essendo la specie più nota e di maggior importanza biotecnologica; è in uso definire gli altri lieviti come “**lieviti non convenzionali**”
- *Saccharomyces cerevisiae* è utilizzato intensamente tanto per applicazioni della biotecnologia tradizionale, che per applicazioni della biotecnologia moderna.
- *Saccharomyces cerevisiae* è unicellulare, metabolizza diversi carboidrati dando luogo a fermentazione alcolica e si riproduce per *gemmazione*.

## Applicazioni tradizionali e moderne di *Saccharomyces cerevisiae*

Impiego	Esempi
fermentazioni tradizionali	alcol, vino, birra, pane
proteine eterologhe di origine umana	insulina, interferone gamma, interleuchine, eritropoietina, lisozima, etc.
proteine eterologhe di origine animale	$\beta$ -caseina bovina, mioglobina, $\alpha$ -lattalbumina caprina etc.
proteine eterologhe di origine virale	HIV-1-transcrittasi inversa, virus del sarcoma di Rous etc.
proteine eterologhe di origine eucariotica varia	somatostatina, amilasi dell'orzo
proteine eterologhe di origine fungina	cellulasi ( <i>T. resei</i> ), $\alpha$ -amilasi, proteasi alcalina ( <i>A. oryzae</i> ), rennina ( <i>Mucor</i> ), etc.
proteine eterologhe di origine batterica	$\alpha$ -amilasi, $\beta$ -galattosidasi etc.
biotrasformazioni	riduzioni di carbonili e doppi legami, formazione di legami C-C

## Lieviti non-convenzionali sono ampiamente utilizzati per scopo applicativi, ad esempio:

Lievito	Applicazioni
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Proteine eterologhe (chimosina, siero albumina umana)
<i>Pichia pastoris</i>	Proteine eterologhe (lisozima umano, IGF-1), lievito metilotrofico
<i>Hansenula (Pichia) polymorpha</i>	Proteine eterologhe (siero albumina umana, lipasi umana)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Proteine eterologhe (antitripsina, antitrombina)
<i>Candida (Yarrowia)</i>	Produzione di biomasse (SCP) per crescita su zuccheri, alcoli e alcani
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Proteine eterologhe (prechimosina, interferone porcino)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Fermentazione alcolica in crescita su xilosio
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Produttore di amilasi
<i>Picchia guillermondii</i>	Produzione di riboflavina

- Si trovano soprattutto su substrati naturali ricchi di zuccheri (ad esempio frutta) o associati ad altre sezioni di specie vegetali.
- Poche specie sono patogene opportuniste per l'uomo (ad esempio *Candida albicans*, *Cryptococcus*).
- Per il loro isolamento si può sfruttare la crescita in un intervallo di pH ampio e a valori anche acidi (fino a pH 3,5). Tipici terreni sono composti da glucosio (1%), estratto di malto (0,3%), peptone (0,5%), estratto di lievito (0,3%) a pH leggermente acidi (4,5-5,5).
- I lieviti in generale non possiedono amilasi: per *S. cerevisiae* sono utilizzati melassi, mentre *K. lactis* può vantaggiosamente utilizzare siero da latte.

## Metabolismo

- degradano il glucosio utilizzando quasi sempre sia la via EMP che la via HMP
- in funzione del rapporto con l'ossigeno si dividono in aerobi obbligati o facoltativi

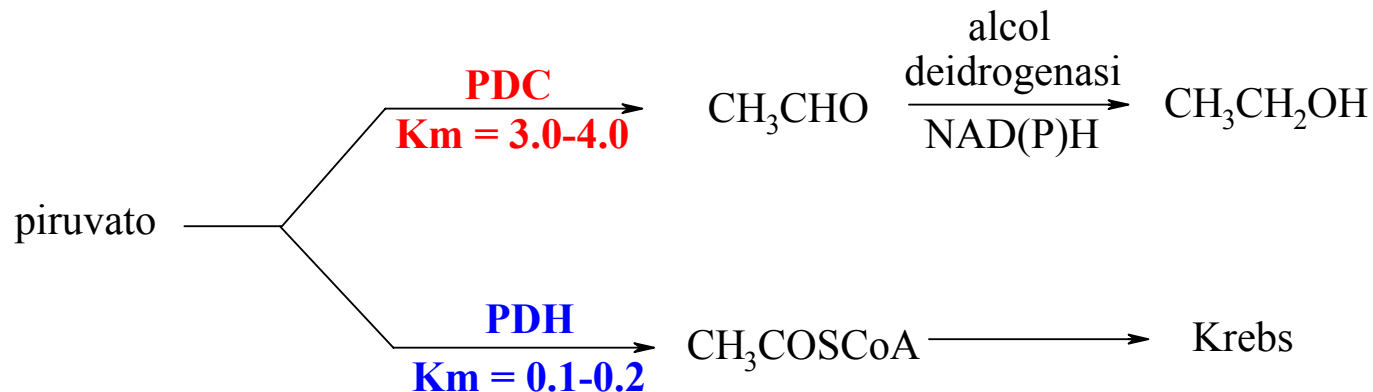
	<b>Generi</b>
<b>AEROBI OBBLIGATI:</b> non utilizzano glucosio in assenza di O <sub>2</sub>	<i>Rhodotorula, Rhodosporidium, Saccharomycopsis, Cryptococcus, Sporobolomyces, Lipomyces</i>
<b>ANAEROBI FACOLTATIVI:</b> utilizzano glucosio in presenza e in assenza di O <sub>2</sub>	<i>Candida, Yarrowia, Hansenula, Kluyveromyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces Brettanomyces</i>

- Lieviti presentano comportamenti diversi durante la crescita **in aerobiosi** in presenza di concentrazioni di glucosio intorno ai 5-10 g/l: alcuni lieviti mostrano un metabolismo soprattutto respirativo, mentre altri prediligono un metabolismo fermentativo
- *Saccharomyces cerevisiae* mostra in generale, in queste condizioni, respirazione quantitativamente limitata ed è straordinariamente specializzato nella capacità di dar luogo alla fermentazione alcolica.

	<b>Lieviti respirativi</b> <i>Candida, Hansenula, Kluyveromyces</i>	<b>Lieviti fermentativi</b> <i>Saccharomyces, Schizosaccharomyces Brettanomyces</i>
<b>respirazione/fermentazione</b>	70/30	10/90
<b>velocità di catabolismo</b>	10-40 μmol di glucosio g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	100-300 μmol di glucosio g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
<b>velocità di respirazione</b>	150-250 μmol O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	5-10 μmol O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>

# Effetto Pasteur

- Alcuni lieviti mostrano diminuzione della velocità di consumo di zucchero in aerobiosi rispetto a quanto osservabile in anaerobiosi: tale effetto passa sotto il nome di *effetto Pasteur*.
- Processi di respirazione sono più favorevoli da un punto di vista metabolico (soprattutto da un punto di vista energetico) rispetto a processi fermentativi
- Conseguentemente, il flusso glicolitico è più basso in aerobiosi: ad esempio *Candida tropicalis* in anaerobiosi consuma una quantità di glucosio pari a  $150-200 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ , mentre in aerobiosi il flusso glicolitico è pari a  $5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . L'inibizione dei processi fermentativi per questo lievito in aerobiosi è pari a circa il 97%.
- Le migliori prestazioni del metabolismo respirativo in aerobiosi è spiegabile osservando le diverse affinità di piruvato deidrogenasi (PDH) e piruvato decarbossilasi (PDC) per il piruvato. PDH è molto più affine e solo quando la concentrazione di piruvato supera la soglia di saturazione della PDH, è possibile registrare fenomeni fermentativi

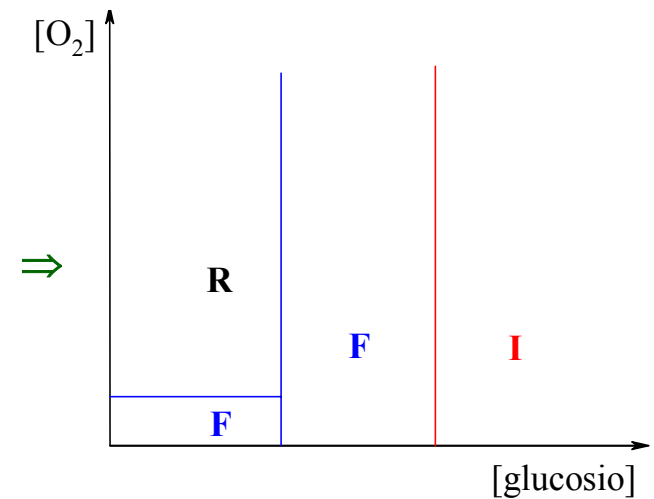




- L'effetto Pasteur è in relazione stretta con l'azione della fosfofruttochinasi (PFK).
- Questo enzima è disattivato da ATP; alte concentrazioni di ATP si ritrovano spesso in aerobiosi quando la fosforilazione ossidativa è a pieno ritmo, causando quindi una diminuzione del consumo di glucosio.

## Effetto Crabtree

- L'effetto Pasteur è di bassissima entità per lieviti fermentativi, ossia che non hanno alti livelli di respirazione in terreni contenenti glucosio a concentrazioni intorno ai 10 g/L.
- *Saccharomyces cerevisiae* cresce esponenzialmente in aerobiosi su glucosio con velocità di respirazione pari a circa  $7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  e velocità di fermentazione molto simili in aerobiosi ed anaerobiosi ( $140 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  in aerobiosi e  $160 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  in anaerobiosi).
- In *S. cerevisiae*, zuccheri (in particolare glucosio) determinano un'inibizione degli enzimi respiratori (effetto Crabtree) molto pronunciato già a concentrazioni intorno a 10 g/L. In particolare, glucosio a concentrazioni superiori a 0,25 g/L opera una **repressione reversibile** sulla biosintesi del citocromo A.

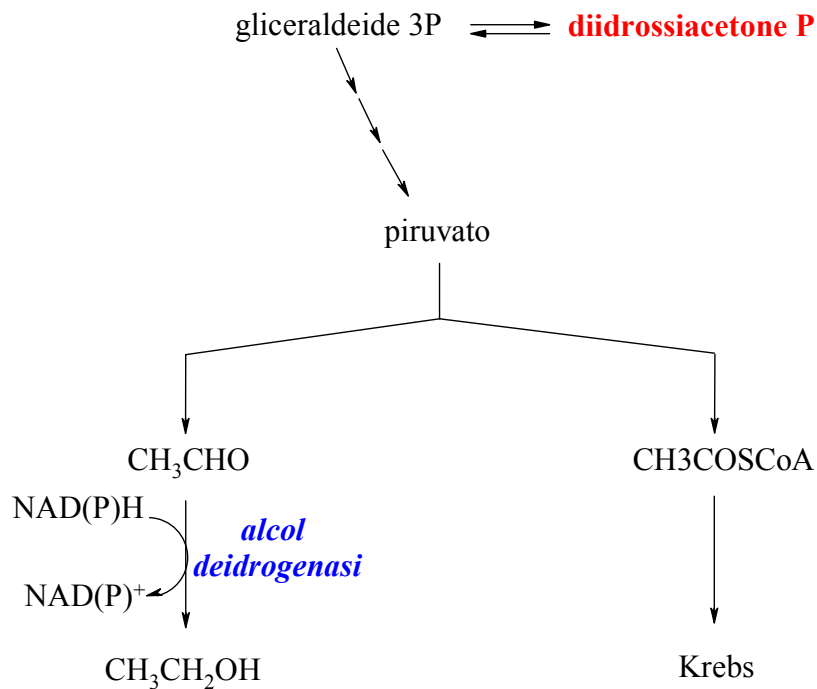


Nella produzione di etanolo, *S. cerevisiae* viene normalmente fatto crescere in aerobiosi con aggiunte *fed-batch* di glucosio

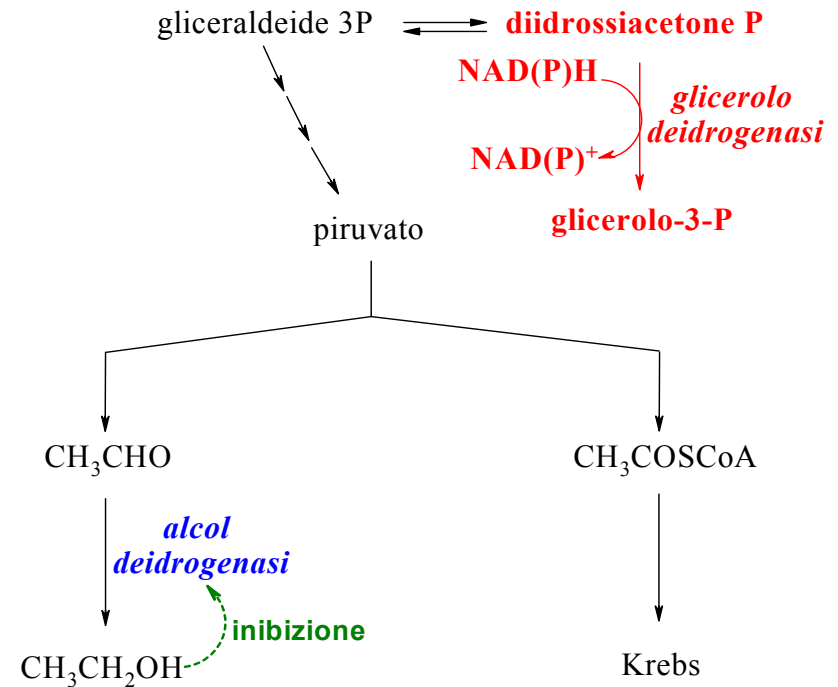
- Questo per attutire l'effetto Crabtree e quindi è utilizzato in anaerobiosi per spostare in senso completamente fermentativo il suo metabolismo.
- *S. cerevisiae* può utilizzare glucosio in condizioni di anaerobiosi, ma non è in grado di crescere significativamente.
- La mancanza di O<sub>2</sub> non permette la produzione di ergosterolo e di alcuni acidi grassi essenziali per la funzionalità delle membrane cellulari.
- Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono tra i più adatti a fornire etanolo con alte rese, ma producono una serie di prodotti collaterali di grande importanza, soprattutto nella produzione di bevande alcoliche, tra i quali glicerolo, acidi organici, alcoli, esteri, aldeidi e chetoni.

# Glicerolo

- Il glicerolo può formarsi per riduzione del diidrossiacetone fosfato, che si viene a formare per azione dell'aldolasi che agisce sul fruttosio 1,6-bifosfato durante la glicolisi; inizialmente è privilegiata la fermentazione che permette lo scarico di potere riducente sull'acetaldeide (Schema 1).
- L'accumulo di etanolo in concentrazioni elevate provoca un'inibizione dell'alcol deidrogenasi ed il potere riducente può scaricarsi sul diidrossiacetone formando glicerolo-3-P (Schema 2).

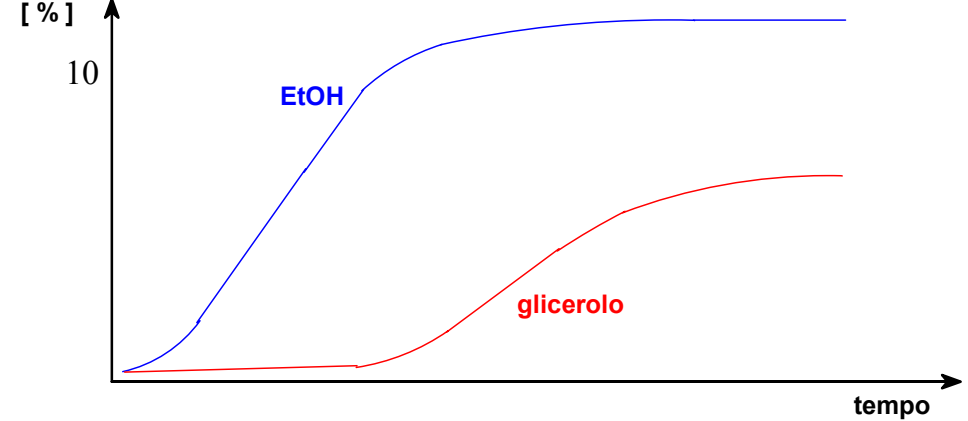


Schema 1



Schema 2

Il profilo qualitativo della produzione di etanolo e glicerolo è quindi il seguente:



- La produzione di glicerolo può essere ottenuta utilizzando composti esogeni o modificazioni del corredo enzimatico:

- Il lievito è stato modificato mediante blocco della trioso isomerasi in modo da indirizzare almeno il 50% del glucosio catabolizzato verso diidrossiacetone-P
- Nella cosiddetta II Fermentazione di Neuberg, l'accumulo di glicerolo viene ottenuto aggiungendo sodio bisolfito durante la fermentazione e quindi causando la precipitazione dell'acetaldeide come sale (sali di Bertagnini):



- in questo modo il substrato organico sul quale si scarica il potere diucente è il diidrossiacetone permettendo l'accumulo di glicerolo
- Nella III Fermentazione di Neuberg vengono invece aggiunti alcali che causano il disproporzionamento dell'aldeide (reazione di Cannizzaro).
- Il glicerolo viene normalmente rilasciato extracellularmente per diffusione passiva, ma recentemente (1995) è stata isolata una proteina responsabile di diffusione specifica.

## Acidi organici

Più di cento acidi carbossilici sono prodotti durante la fermentazione alcolica, molti sono già presenti nel mosto o ritrovati come modificazioni di questi ultimi.

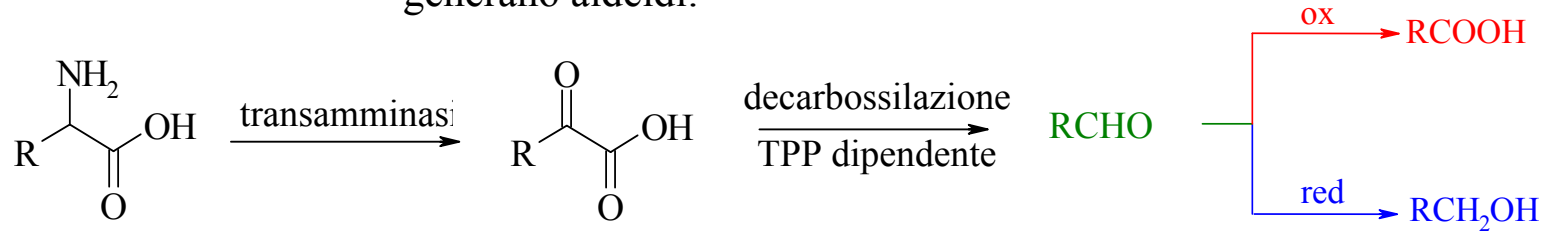
Acido	Concentrazione nel mosto o nel vino	Azione di lieviti durante la fermentazione	
		decomposizione/fermentazione	formazione
Tartarico	1-4	-	-
Malico	0-8	+	-
Succinico	0,5-2	-	+
Acetico	0-3	(+)	+
Lattico	0,1-6	-	-
Amminoacidi	1-6	+	+
Gluconico	0-3	-	-
Citrico			
Piruvico			
2-Chetoglutarico			

Acidi carbossilici sono provengono principalmente da tre vie degradative:

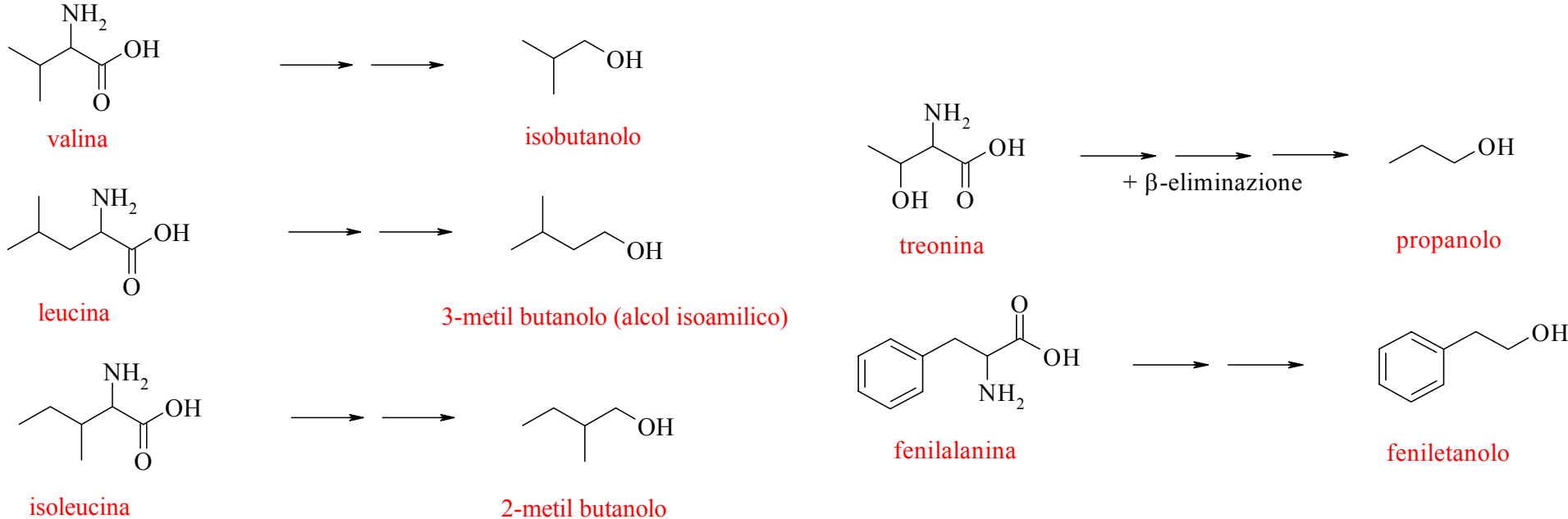
- dal ciclo di Krebs (in particolare il succinico può accumularsi in condizioni anaerobiosi attraverso un ciclo di Krebs svolto in senso riduttivo)
- da biosintesi degli acidi grassi
- da amminoacidi via transamminazione

# Alcoli (superiori)

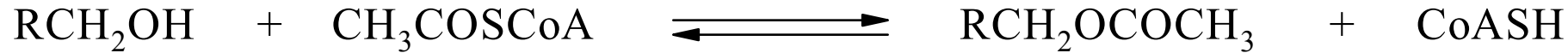
- Amminoacidi sono utilizzati durante la fermentazione alcolica per la sintesi proteica oppure a scopo degradativo.
- Mediante reazioni di transamminazione si formano  $\alpha$ -chetoacidi che evolvono spesso dando luogo a decarbossilazioni non ossidative che generano aldeidi:



- In condizioni fermentative le reazioni sono spesso spostate verso la formazione di alcoli



Gli alcoli formati possono dar luogo ad **esteri**, in particolare esteri acetici, dalle caratteristiche sensoriali spesso fruttate:

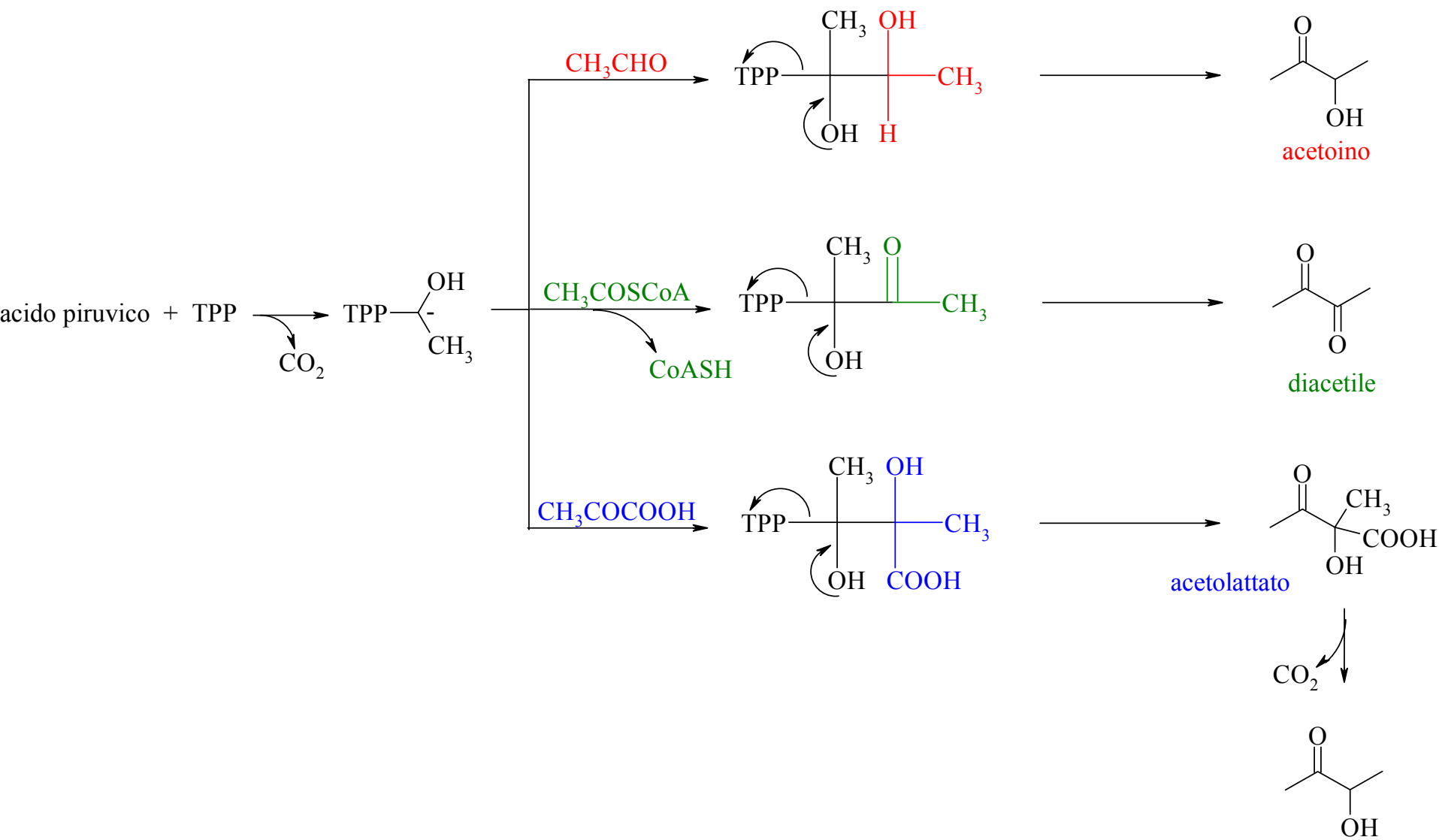


Ad esempio:

etilacetato, isoamilacetato etc.

### **Acetoino/diacetile/2,3-butandiolo:**

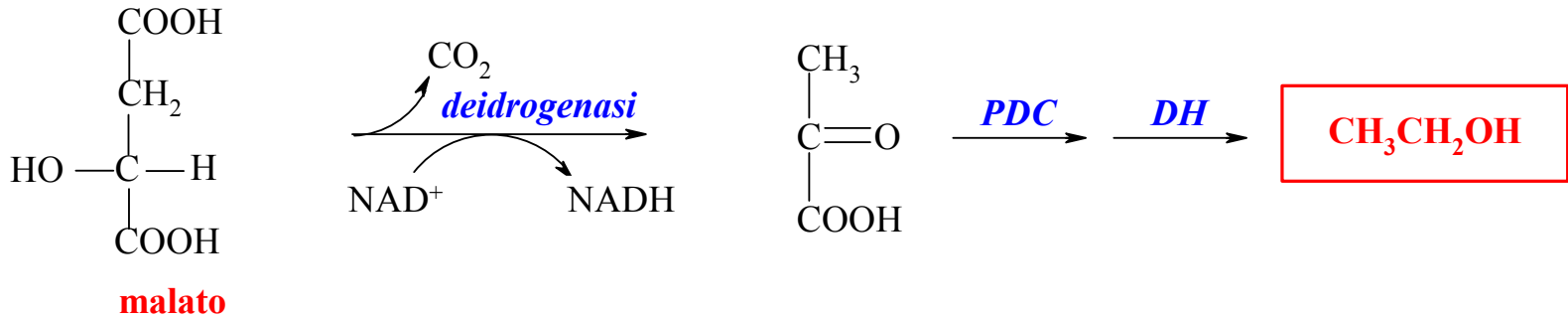
- l'acetoino concorre a volte a determinare il *bouquet* di vini ed è spesso presente insieme a diacetile e 2,3-butandiolo
- il diacetile (aroma tipico del burro) comporta gravi danni organolettici al vino quando presente in concentrazioni >1 mg/L:





# Fermentazione malolalcolica

- L'acido malico è presente nel mosto in concentrazioni significative e può essere il substrato per una fermentazione operata da *Schizosaccharomyces pombe* che aumenta la concentrazione di etanolo
- L'acido malico è soprattutto presente in acini poco maturi ed in questo caso l'uso di microrganismi capaci di degradare il malato può essere vantaggioso, sebbene l'uso di *S. pombe* come *starter* non risulti di facile applicazione a causa della contemporanea produzione di aromi indesiderati.
- Un interessante nuovo approccio è quello di trasferire geni eterologhi in *S. cerevisiae*; i risultati fino ad oggi raggiunti non sono però ancora completamente soddisfacenti, probabilmente a causa della carenza di un sistema di trasporto specifico dell'acido malico.



- *Schizosaccharomyces pombe* cresce a temperature più elevate e la sua azione può essere quindi limitata
- La fermentazione malica può essere catalizzata anche da *Saccharomyces bailii*, un lievito non utilizzato in campo enologico, ma resistente all'azione di conservanti chimici ( $\text{SO}_2$  e acido sorbico) e quindi un lievito contaminante di molta frutta e succhi di frutta.

## Produzione di acido acetico

- L'acido acetico può essere prodotto da diversi lieviti in condizioni fermentative (*Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata*) incluso *S. cerevisiae*.
- Ceppi capaci di ossidare l'acetaldeide ad acido acetico non sono adatti ad applicazioni enologiche
- Nella birra si formano meno di 0,2 g/L di acido acetico, prodotto nelle fasi iniziali del processo quando viene applicata aerazione nelle prime fasi con lo scopo di ottenere lievito con una costituzione cellulare adeguata.