

Come misurare la fame del lievito

Azoto prontamente assimilabile: un parametro analitico fondamentale per una fermentazione alcolica regolare e completa.

Dott. Simone Bellassai - CDR WineLab® Specialist

I lieviti sono i microrganismi responsabili della fermentazione alcolica del mosto d'uva. Questo importante processo biologico, che trasforma gli zuccheri (glucosio e fruttosio) in alcool etilico ed anidride carbonica, dipende fortemente dalla composizione del mosto. Oltre alle fonti di carbonio, e ai fattori di crescita e di sopravvivenza, i lieviti necessitano di un altro importante costituente fondamentale per l'evoluzione della fermentazione alcolica: l'azoto. Questo elemento, essenziale per la vita non solo dei lieviti ma di tutti gli organismi viventi, prende parte alla formazione del legame peptidico, architrave della struttura primaria delle proteine. L'azoto è utilizzato dai lieviti per la sintesi sia delle proteine strutturali sia di quelle che intervengono a vario grado nel metabolismo cellulare; è presente nel mosto in forma inorganica, come ione ammonio, ed in forma organica come azoto α -amminico, presente in aminoacidi liberi, proteine e polipeptidi. La forma peptidica, presente anche in concentrazioni consistenti nel mosto, non è però utilizzata dai lieviti perché essi non sono dotati di attività proteasica. L'azoto cosiddetto "assimilabile" è quindi costituito dall'ammonio e dalla frazione α -amminica degli aminoacidi liberi nel mosto. Fra questi devono essere però esclusi la prolina e l'idrossiprolina i quali non vengono assorbiti dai lieviti.

Assorbimento dell'azoto da parte dei lieviti

L'assorbimento di ammonio ed aminoacidi da parte del lievito mette in gioco una serie di trasportatori proteici comunemente chiamati permeasi. *S. cerevisiae* possiede almeno due tipologie di trasportatori per l'ammonio e due per l'azoto aminoacidico. Quest'ultimo attraversa la

membrana plasmatica del lievito attraverso una GAP (General Aminoacid Permease) che permette l'assorbimento degli aminoacidi in modo non selettivo, o attraverso una serie di trasportatori ad elevata specificità per uno o per gruppi di aminoacidi. La GAP è inibita dalla presenza dell'ammonio, ed è questo il motivo per cui nella fase iniziale della fermentazione alcolica è l'ammonio ad essere assorbito per primo. La correzione dell'azoto organico ad inizio fermentazione è comunque fortemente consigliata perché i trasportatori specifici non sono inibiti dall'ammonio. Gli aminoacidi possono quindi diffondere nella cellula stimolando notevolmente la "costruzione" di enzimi e proteine in quanto il lievito può inserirli direttamente, senza modifiche, nel processo di sintesi proteica. Contrariamente a glucosio e fruttosio che entrano nel lievito per diffusione facilitata lo ione ammonio e gli aminoacidi entrano nella cellula per trasporto attivo. Il meccanismo di entrata prevede un simporto con gli ioni H^+ (Fig. 1) il lievito mantiene così la corretta concentrazione idrogenionica intracellulare mediante una ATPasi la quale espelle gli ioni H^+ a spese dell'energia chimica prelevata dagli ATP (Fig. 1). Il procedere della fermentazione alcolica determina l'aumento della concentrazione di etanolo che altera la struttura della membrana plasmatica rendendola molto più permeabile agli ioni H^+ . Quest'ultimi penetrano quindi in massa all'interno della cellula per diffusione facilitata. Il lievito è così costretto a ridurre al minimo il simporto dell'assimilazione dell'azoto e a incrementare la funzionalità della pompa ATPasi per mantenere a valori fisiologici il pH intracellulare. In altre parole è nella fase iniziale della fermentazione, quando la concentrazione dell'etanolo è bassa, che il lievito

è in grado di assimilare velocemente l'azoto che utilizzerà poi nell'arco di tutta la fermentazione alcolica. A seconda delle esigenze il lievito può quindi usare l'amminoacido tal quale senza modifiche, oppure in uno stato di carenza di ammonio può, con una reazione di deamminazione (Fig. 2) ricavare l'ammonio di cui necessita. Questa reazione di deamminazione porta nel contempo alla formazione di alcool superiori i quali possono modificare negativamente le caratteristiche organolettiche del vino. La correzione dell'APA prima della fermentazione alcolica è quindi una operazione molto importante sia per evitare pericolosi arresti di fermentazione accompagnati da produzione di eccessiva acidità volatile sia per evitare difetti di riduzione nel vino. Infatti specie come i solfati e soprattutto i solfiti, entrano nel lievito in una via di riduzione che porta alla formazione di amminoacidi solforati come la cisteina la metionina ed il triptofano. Se l'azoto è carente viene quindi a mancare l'accettore finale del solfuro il quale viene smaltito come acido solfidrico apportando al vino quell'odore caratteristico di uova marce. È importante conoscere separatamente i due contributi di azoto inorganico ed organico, senza l'interferenza della prolina, come è possibile fare con CDR WineLab®. La conoscenza dell'azoto prontamente assimilabile in fase di prefermentazione è quindi fondamentale per il buon andamento della fermentazione stessa. Inoltre le eventuali correzioni devono essere apportate proprio nella fase iniziale, in quanto a fine fermentazione alcolica i lieviti non sono più in grado di assimilare azoto a causa dell'elevata concentrazione dell'etanolo.

Cinetica della fermentazione alcolica

In un mosto non solfitato e non inoculato si osserva, nelle prime ore dall'immissione in vasca, un aumento dei lieviti indigeni solitamente non desiderati. Tra questi i più frequenti sono la *Kloeckera* e l'*Hanseniospora* (specie apiculate) si possono inoltre trovare specie a metabolismo strettamente ossidativo come *Candida*,

Hansenula e *Pichia* il cui sviluppo porta all'aumento di acido acetico e acetato di etile. Una buona solfitazione e un adeguato inoculo di *S. cerevisiae* permette di evitare lo sviluppo di questi lieviti indigeni indesiderati. Un inoculo ben fatto solitamente garantisce una buona fermentazione. La cinetica della fermentazione alcolica può essere suddivisa in 4 fasi: fase di latenza, fase di crescita, fase stazionaria, fase di declino. La fase di latenza è la fase iniziale in cui i lieviti si adattano alla composizione del mosto ed avviano la sintesi delle proteine strutturali e degli enzimi. In questa fase non si ha quindi aumento di popolazione ma vi è comunque un forte assorbimento di azoto, di ossigeno, e dei fattori di crescita e sopravvivenza. Nella fase successiva di crescita esponenziale si ha il consumo quasi totale dell'azoto prontamente assimilabile che diviene il fattore limitante del processo di moltiplicazione cellulare. In questa fase si ha inoltre il raggiungimento della velocità massima di consumo dei substrati zuccherini (glucosio e fruttosio). Un'ulteriore integrazione dell'APA è cruciale al termine di questa fase, ovvero quando è stato consumato circa il 20-30% degli zuccheri iniziali. Il restante 70-80% viene consumato nelle due fasi successive soprattutto nella fase stazionaria. In essa il numero delle cellule totali rimane invariato, tendono però a diminuire le cellule vitali, a causa dell'aumento del tenore di alcool nel mosto. In questa fase la presenza di azoto stimola la sintesi dei trasportatori degli zuccheri, sostenendo quindi il processo di fermentazione alcolica. Nella fase finale si ha una forte diminuzione della velocità di fermentazione dovuta alla notevole diminuzione delle cellule vitali. Infatti l'elevata concentrazione di etanolo che si ha, verso la fine della fermentazione alcolica, paralizza i lieviti i quali assimilano difficilmente sia azoto che zuccheri. In questa fase sono quindi importanti i fattori genetici di resistenza del lievito nei confronti dell'etanolo, sono altresì importanti i fattori di sopravvivenza (acidi grassi a catena lunga e steroli) i quali, con il loro effetto stabilizzante sulla membrana plasmatica del lievito ne prolungano vita

garantendo l'esaurimento dei substrati zuccherini nel mosto. In conclusione, la determinazione dell'APA risulta essere fondamentale per l'ottenimento di un ottimale processo

fermentativo che porti a completo esaurimento gli zuccheri senza un'eccessiva produzione di acidità volatile e di difetti organolettici del vino.

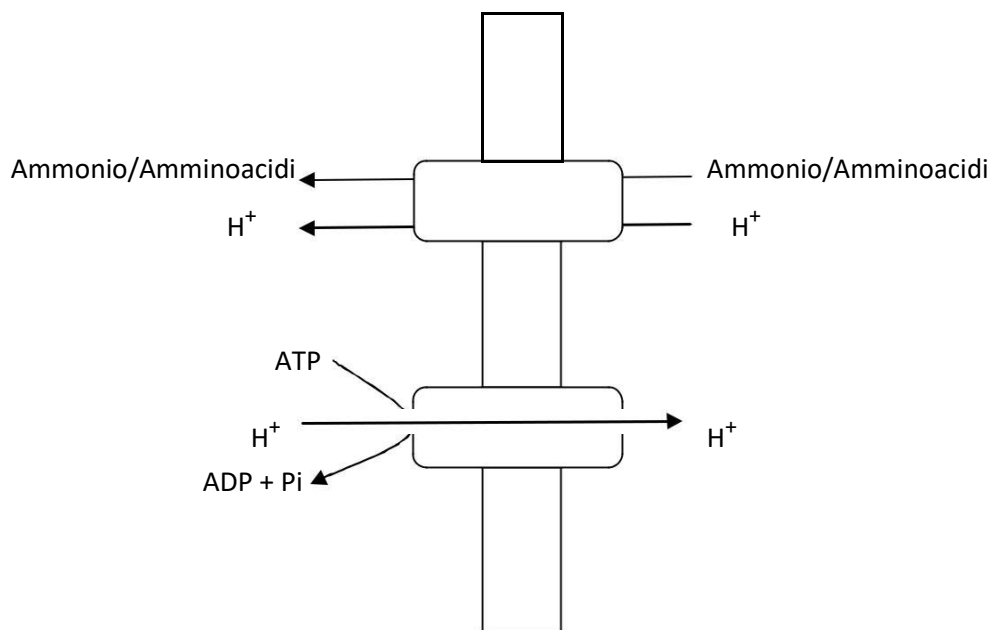


Fig. 1

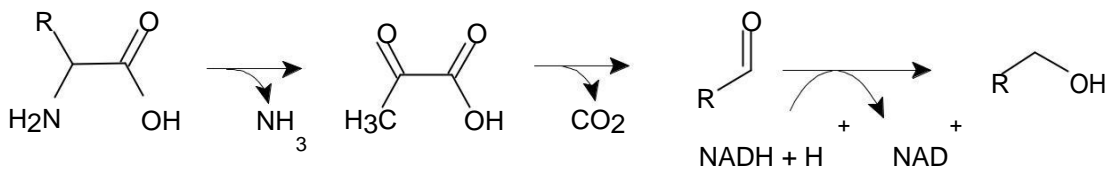


Fig. 2