

di ALESSANDRA BIONDI BARTOLINI



# I LIEVITI E L'AZOTO

## INFLUENZA DELL'AZOTO ASSIMILABILE SULLA QUALITÀ DEI VINI

Sebbene da anni si discuta di nutrizione azotata dei lieviti, il parametro di valutazione dell'azoto prontamente assimilabile è ancora poco utilizzato nelle cantine. Perché? E come si utilizzano i dati sulla disponibilità dell'azoto nella gestione delle fermentazioni?

Il contenuto in azoto dei mosti è un parametro estremamente variabile e dipende da fattori diversi come la varietà, le pratiche colturali, l'andamento stagionale, lo stato di maturazione dell'uva e quello sanitario.

Esattamente come il contenuto in zuccheri, il contenuto in azoto e le forme nelle quali esso è presente nelle uve e nei mosti esercita un'influenza diretta sulla qualità dei vini, rappresentando un macronutriente fondamentale per lo sviluppo dei lieviti.

L'utilizzo da parte di *Saccharomyces cerevisiae* dei composti azotati assimilabili nel corso della fermentazione, così come una loro eventuale carenza, determina risposte metaboliche diverse che portano alla produzione di composti e metaboliti in alcuni casi organoletticamente attivi in grado di caratterizzare (nel bene o nel male) la qualità percepibile dei vini.

L'azoto viene utilizzato dal lievito per la costruzione delle proteine strutturali e degli acidi nucleici della cellula e per la produzione di tutti gli enzimi, compresi quelli addetti al trasporto di zuccheri e degli altri nutrienti attraverso la membrana, o quelli che intervengono nel processo fermentativo di consumo degli zuccheri.

Oltre alla funzione principale l'azoto partecipa al metabolismo di molti prodotti secondari, come gli alcoli superiori e i loro acetati, gli esteri etilici degli acidi grassi o i composti solforati, la cui produzione dipende anche dalla

presenza delle diverse forme di azoto (amminoacidi o ione ammonio) e dal ceppo di lievito utilizzato.

### QUANTO AZOTO NEI MOSTI?

Come fa osservare Curtis Philipps su Wine Business il succo d'uva non è necessariamente un ambiente adeguato per lo sviluppo dei lieviti della fermentazione, in quanto non esiste una pressione selettiva in natura che spinga l'uva a coevolversi con le popolazioni microbiche per essere più adatta ai loro scopi (e men che mai agli scopi della produzione enologica). Il contenuto in sostanze azotate (come anche quello negli altri macro e micronutrienti, vitamine e sali minerali) pertanto, oltre ad essere estremamente variabile, spesso è insufficiente per un corretto e completo svolgimento della fermentazione.

Applicando la legge di Liebig, secondo la quale un processo si interrompe quando uno degli elementi necessari (macro o micro-elementi) viene a mancare (indipendentemente dalla disponibilità degli altri), in enologia nella fermentazione alcolica occorre fare in modo che questo elemento sia la fonte di carbonio, ovvero gli zuccheri, gestendo al meglio eventuali carenze di tutti gli altri nutrienti.

I mosti italiani sono stati analizzati negli anni dal gruppo di ricerca di Giorgio Nicolini della Fondazione Mach che ha messo in evidenza come alcuni siano nettamente deficitari per il loro contenuto in sostanze azotate disponibili (2004) (vedi Grafico).

L'azoto assimilabile presente nei mosti (APA, Azoto Prontamente Assimilabile, o YAN acronimo inglese che sta per Yeast Assimilable Nitrogen) è costituito dallo ione ammonio e dagli

alfa amminoacidi. Tra gli amminoacidi dell'uva, sebbene presente in proporzioni elevate, la prolina (che non è un alfa-amminoacido) non è assimilabile da *Saccharomyces cerevisiae* nelle condizioni anaerobiche della fermentazione.

Nel corso della maturazione delle uve la quota di azoto ammoniacale tende a diminuire mentre quella di azoto amminoacidico ad aumentare, incremento che tuttavia non è sufficiente per compensare il calo della prima forma, per cui nel complesso nelle uve più mature o sovramature il contenuto in azoto assimilabile è tendenzialmente più basso.

Se si considera che le concentrazioni zuccherine più elevate, come quelle che si stanno registrando negli ultimi anni, richiedono un impegno maggiore (e una maggiore necessità di nutrienti) alla popolazione di *Saccharomyces cerevisiae*, se ne deduce che in questi casi il rischio di arresto di fermentazione e di fermentazioni stentate possa aumentare e che soltanto con una corretta valutazione del rischio e con i giusti interventi di nutrizione azotata sia possibile correre ai ripari.

I diversi ricercatori che hanno lavorato su questo argomento hanno fissato intorno a 140- 150 mg/l di azoto assimilabile la soglia minima che dovrebbe essere contenuta in un mosto per consentire un corretto avvio della fermentazione. Per quanto detto in precedenza, tale soglia dovrà però essere innalzata quando si parla della fermentazione di mosti molto zuccherini per i quali per esempio in California, Linda Bisson dell'Università di Davis ha indicato un contenuto minimo necessario di APA di 300 mg/l per mosti con 25° Brix.

Infine è necessario ricordare anche

che il fabbisogno in azoto può differire in *Saccharomyces*, e che pertanto questa caratteristica del lievito debba essere conosciuta e tenuta in considerazione tra gli altri parametri nella scelta del ceppo e della strategia nutrizionale da adottare.

### MISURARE L'AZOTO ASSIMILABILE

Data l'elevata variabilità del contenuto in azoto assimilabile nei mosti e l'assenza di relazione con qualsiasi caratteristica valutabile empiricamente (o per esempio per via organolettica), la sua determinazione nei mosti rappresenta un parametro di estrema importanza per la definizione di un protocollo di fermentazione adeguato ad ogni mosto e per la valutazione dei suoi punti critici.

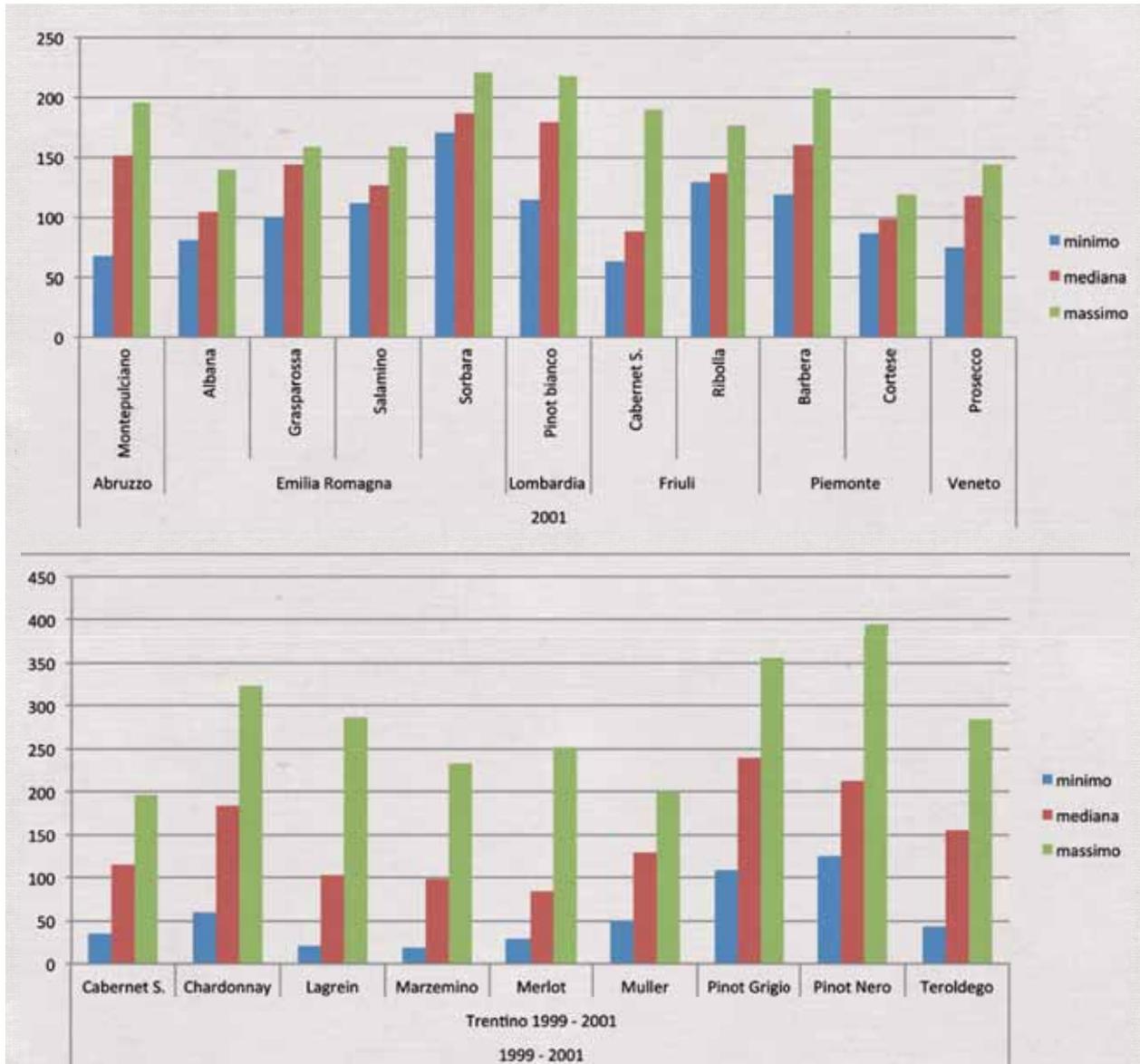
Il metodo rapido più diffuso, detto del numero di formolo, consiste nella titolazione dei gruppi amminici presenti fatti reagire precedentemente con formaldeide. L'elevata tossicità per l'operatore legata all'utilizzo di questo reagente, insieme alla mancanza del-

le necessarie attrezzature di sicurezza (come le cappe aspiranti) nei laboratori delle cantine, rappresenta il limite maggiore all'utilizzo di questo metodo. Un metodo interessante, in quanto consente di disporre, oltre che del dato complessivo di azoto assimilabile, anche di quello relativo alla sua composizione (amminoacidi o ione ammonio), è quello indicato come NOPA o OPA, messo a punto dai ricercatori dell'Università di Davis negli anni 90. Il metodo è facilmente automatizzabile, e si basa sulla variazione di assorbanza dovuta alla reazione dei gruppi amminici degli amminoacidi con un reagente cromogeno, l'Orto-ftaldialdeide N-acetil-L-cisteina. Alla valutazione dell'azoto assimilabile legato agli amminoacidi si aggiunge la determinazione dello ione ammonio determinato per via enzimatica, ottenuta come nella reazione precedente con una lettura spettrofotometrica. Un altro metodo, anch'esso basato sulla reazione di un cromogeno, la ninidrina, con i gruppi amminici degli amminoacidi è quello messo a punto

dall' American Society of Brewing Chemists, modificato da Giorgio Nicolini (2004) e utilizzato nello screening dei mosti trentini e italiani riportato precedentemente.

L'applicazione dei metodi di spettroscopia nel medio e vicino infrarosso, dopo la necessaria taratura, sta anch'essa dando risultati interessanti nella stima dell'azoto assimilabile dei mosti.

Sono essenzialmente due i momenti nei quali la misura dell'APA può essere di aiuto nella pianificazione della gestione della fermentazione alcolica: il primo è più o meno ad una settimana dalla raccolta per valutare con un certo anticipo se e in quale misura il mosto presenterà una carenza azotata più o meno importante, il secondo è appena prima dell'inoculo dei lieviti su un campione di mosto prelevato dalla vasca di fermentazione. Nel primo caso, tenendo conto dell'estrema variabilità presente anche all'interno del vigneto, occorrerà prelevare un campione di uva che sia rappresentativo



VARIABILITÀ (VALORE MEDIANO, MINIMO E MASSIMO) DELL' APA MISURATO NEL PERIODO 1999 - 2001 SULLE VARIETÀ PRESENTI NELLE DIVERSE REGIONI ITALIANE (GRAFICO IN ALTO) E SUI MOSTI DELLE VARIETÀ TARENTINE (GRAFICO IN BASSO). (MODIFICATO DA NICOLINI ET AL., 2004).

dell'appezzamento ed eseguire l'analisi sul mosto, tenendo comunque conto che in un mosto sottoposto ad una pressatura soffice come quello formato da pochi grappoli, il contributo dovuto alle sostanze azotate contenute nelle bucce sarà comunque sottostimato.

Nel secondo caso sarà necessario prelevare un campione rappresentativo dell'intera massa appena prima dell'inoculo e dopo le operazioni di chiarifica (che riducendo il contenuto in sostanze azotate presenti nelle particelle solide in sospensione, impoveriscono il mosto anche in nutrienti assimilabili). Meno utilizzata e ancora da approfondire, è la valutazione dell'APA nel corso della fermentazione alcolica.

**NUTRIRE IL LIEVITO: NUTRIMENTI SEMPLICI E COMPLESSI**

Ma come utilizzare i dati di APA dei mosti? L'obiettivo fondamentale è quello di verificare le eventuali carenze e di ripristinare il contenuto in azoto assimilabile necessario per un corretto svolgimento della fermentazione alcolica con l'aggiunta di nutrienti azotati tra quelli consentiti, come i sali di ammonio (solfato o più spesso fosfato, indicato quest'ultimo come DAP, diammonio fosfato) o i nutrienti complessi a base di lieviti devitalizzati e parzialmente o totalmente autolisati, ricchi in amminoacidi assimilabili. La quantità di azoto presente in ogni nutrimento (il titolo) dipende dalla sua formulazione, per il DAP il contenuto in azoto è del 22%

(cioè 10 g/hl di DAP portano ad un incremento di APA di 22 mg/l) mentre per i nutrienti a base di lieviti inattivati questo dato dovrà essere fornito dal produttore in quanto dipende da fattori diversi come il grado di lisi.

Sebbene l'uso dei sali di ammonio rappresenti la soluzione più economica, la fonte più nobile e in grado di dare risultati qualitativamente migliori è rappresentata dagli amminoacidi della cellula del lievito.

L'uso dei sali di ammonio tra l'altro rappresenta una fonte più facilmente assimilabile, che la cellula utilizza con un minor dispendio di energia rispetto a quella richiesta per il trasporto e l'utilizzazione degli amminoacidi. In presenza di entrambe le fonti azotate pertanto il

## LA CARENZA DI AZOTO E L'IDROGENO SOLFORATO

Quando le fonti azotate sono carenti i lieviti riducono progressivamente la sintesi proteica fino a bloccarla del tutto. Questo arresto coinvolge anche le proteine di trasporto della membrana addette all'assimilazione dei diversi composti, tra i quali gli zuccheri.

Essendo la vita media di queste proteine di 5-6 ore, è stato calcolato che dopo 50 ore dalla manifestazione della carenza azotata, le cellule esauriscano completamente la loro dotazione iniziale di trasportatori e cessino di assimilare (e quindi anche di trasformare) gli zuccheri presenti nel mezzo: l'esito sarà con ogni probabilità l'arresto della fermentazione.

La condizione di carenza azotata è stata messa in relazione con il metabolismo dei composti contenenti zolfo nei suoi diversi livelli di ossidazione. La cosiddetta via metabolica di riduzione dei solfati (SRS) porta alla riduzione di solfati e solfiti assimilati dal mezzo in ione solfuro destinato, in presenza di scheletri amminici e carboniosi, alla sintesi degli amminoacidi solforati, cisteina e metionina. Qualora non sia presente l'azoto necessario alla sintesi degli amminoacidi, l'idrogeno solforato prodotto viene rilasciato all'esterno. In caso di carenza di azoto più facilmente disponibile, inoltre, la cellula degrada gli amminoacidi, tra i quali anche la cisteina e la metionina, come anche alcuni peptidi come il glutatione, ne utilizza i gruppi amminici per la produzione di altri amminoacidi e libera all'esterno l'idrogeno solforato. La produzione di H<sub>2</sub>S, rilevabile olfattivamente o più precisamente con sensori o rilevatori chimici più sensibili, può essere considerata un segnale di allarme di uno stato di carenza azotata, sebbene vi siano fattori diversi che intervengono sulla sua entità, come le caratteristiche genetiche del ceppo o la presenza di solfati e di zolfo elementare nel mosto, e che possono portare a sovrastimare o sottostimare lo stato di carenza presente.

lievito preferirà assimilare l'azoto inorganico, mentre sarà inibita l'assimilazione degli amminoacidi (sia di quelli naturalmente presenti nel mosto, sia di quelli aggiunti con i nutrienti organici o complessi).

Il livello di azoto assimilabile presente all'inizio della fermentazione, come è stato dimostrato dagli studi di Jean Marie Sablayrolles dell'INRA (1996), esercita un'influenza diretta sul numero di generazioni prodotte nel corso della fase di crescita e sulla velocità massima di fermentazione raggiunta al termine di questa fase (intesa come quantità di zuccheri consumati, o CO<sub>2</sub> sviluppata, nell'unità di tempo). Queste due grandezze influenzano da un lato i fabbisogni nutritivi nelle fasi successive della fermentazione (una popolazione più numerosa avrà bisogno di una maggiore disponibilità in nutrienti) e dall'altro la quantità di calorie prodotte nella fase di massima velocità fermentativa e di conseguenza il fabbisogno in frigoriferie nel controllo della temperatura di fermentazione. Allo stesso tempo gli stessi studi hanno dimostrato che l'azoto presente all'inizio della fermentazione non è correlato in alcun modo con l'andamento fermentativo nelle ultime fasi, né con il completamento del consumo degli zuccheri. Questo signifi-

ca che aumentare sistematicamente il livello di azoto assimilabile all'inizio della fermentazione rappresenta un errore.

Una corretta strategia nutrizionale dovrà invece dapprima favorire l'avvio della fermentazione, compensando nel mosto al momento dell'inoculo eventuali carenze con nutrienti ricchi in amminoacidi in grado di integrare anche le eventuali carenze in microelementi e in fattori di crescita e di sopravvivenza (sostanze minerali e vitamine, cofattori fondamentali di molti processi biologici), e successivamente mantenere il fabbisogno nutritivo e l'efficienza delle cellule nella fase stazionaria con aggiunte successive di nutrienti azotati, per le quali il momento migliore va da 1/3 fino alla metà della fermentazione.

### Bibliografia:

Nicolini G., Larcher R, Versini G., 2004. *Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effects of variety, ripening and vintage.* *Vitis* 43 (2), 89-96 (2004)  
Nicolini G.; Versini G.; Corradin L.; Larcher R.; Beretta C.; Olivari A.; Eccli E.; 2004: *Misura dell'azoto prontamente assimilabile dal lievito nei mosti d'uva ed esempi di applicazione.*, 2004. *Riv.*

*Vitic. Enol.* 2004, n° 1/2, pp. 13-27  
Ugliano M., Henschke P., Herderich M., Pretorius I.S. 2007. *Nitrogen Management is critical for wine flavour and style.* [www.winebiz.com.au](http://www.winebiz.com.au) November/December 2007 Vol22, n. 6. *Wine Industry Journal.*

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

Bisson L., Butzke C., 2000, *Diagnosis and Rectification of Stuck and Sluggish Fermentations* *Am. J. Enol. Vitic.* 2000 51:168-177

Bardi L., Belviso S., Marzona M., Biondi Bartolini A., 2004. *La gestione nutrizionale in Saccharomyces cerevisiae: il ruolo delle sostanze azotate e del metabolismo lipidico nella fermentazione alcolica.* *Vignevini*, anno XXXI, n3, 77-82.

Philipps C. *Products review: yeast nutrients.* 2007. *Wine Business Montly.* [www.winebusiness.com](http://www.winebusiness.com)

Biondi Bartolini A., 2007. *Lievito e azoto in primo piano.* *VQ*, 4, 2007: 58-62.  
Scrinzi C. 2007. *Nutrizione azotata: una case history.* *VQ*, 4, 2007: 64-69.