

METABOLISMO DEL LIEVITO DURANTE LA FERMENTAZIONE: OSSIGENO, AZOTO, Ca-PANTOTENATO

Stefano Favale, Paolo Pietromarchi, Domenico Tiberi, Gaetano Ciolfi

Nonostante i numerosi progressi realizzati in cantina (controllo della temperatura, ecc.), si può considerare come la corretta gestione della fermentazione alcolica (FA) sia ben lungi dall'essere ottimizzata. In effetti, la variabilità della materia prima, dato fondamentale in enologia è presa in considerazione raramente ed in modo impreciso. Il monitoraggio in linea della cinetica fermentativa (per ora ancora lontano dal realizzarsi) può servire non solo a migliorare il controllo del processo biologico, ma anche, e soprattutto, a "pilotarne" il decorso.

Ciò consiste nell'adattare gli interventi (temperatura, nutrizione, rimontaggi,...) in funzione dello svolgimento della FA, consentendo anche di prevedere l'evoluzione della stessa grazie ad una "modellizzazione" dell'andamento fermentativo.

I fattori della FA.

È ormai dimostrato dalla letteratura, come alcuni elementi costituiscano veri e propri fattori limitanti lo sviluppo e il metabolismo del lievito, in particolare l'ossigeno (indispensabile per sintetizzare acidi grassi e steroli nella fase di crescita anaerobica) l'azoto assimilabile (APA, necessario alla crescita cellulare) ed il calcio pantotenato (responsabile della sintesi di Acetilcoenzima A per un corretto impiego di acetato di derivazione intracellulare).

Il ruolo dell'ossigeno

L'ossigeno può considerarsi generalmente favorevole alla qualità, soprattutto nella vinificazione in rosso, pur sapendo che è sempre necessario riportare le tecniche di controllo dell'ossigenazione al tipo di uva, in considerazione della differente risposta legata alla composizione analitica del mosto.

Le principali esperienze del ruolo dell'O₂ nella fermentazione vinaria furono eseguite da Riberau-Gayon e Sablayrolles, i quali, oltre confermare l'importanza assoluta che riveste nella sintesi lipidica e nella formazione di steroli e acidi grassi, determinarono anche la quantità necessaria al corretto

svolgimento del processo, da considerarsi compresa tra i 5 e 10 mL/L, somministrati nella fase esponenziale di crescita cellulare (circa due giorni dopo l'inoculo).

Si devono a Moutonet ed il gruppo ricerca di Montpellier i primi studi sulla **microossigenazione**, tecnica nata dall'intuizione di ricreare condizioni redox in un mosto o vino, vinificato in serbatoio d'acciaio inox, simili a quelle che si verificano in barrique. Si è accertato che l'apporto di O₂ in fase di affinamento all'interno di una barrique varia da 0,6 a 3 mL/L/mese in funzione della tipologia di legno utilizzato e dal grado di permeazione delle doghe che, tra l'altro, diminuisce con il tempo di utilizzo.

Alcuni studiosi riportano come mosti fermentati con lieviti *Saccharomyces cerevisiae*, in assenza di O₂ iniziale, producano a fine fermentazione vini con più basse concentrazioni di alcoli superiori ed esteri, rispetto a mosti inizialmente addizionati del gas. La presenza di **alcoli superiori** però, non può ritenersi positiva in senso assoluto, in quanto va a scapito della concentrazione in **esteri** (che hanno sentori più fini e delicati), per cui il miglior rapporto tra questi due composti induce a pensare che il non impiego di O₂ iniziale possa incrementare le proprietà sensoriali dei vini ottenuti.

Altre ricerche hanno indagato sull'influenza che determina l'aggiunta di O₂ durante la fermentazione, sugli steroli contenuti nelle fecce di lievito, e la reattività delle stesse nei confronti dell'O₂. Studi condotti da Caroline Fornairon-Bonnefond hanno investigato sulla potenziale relazione tra differenti dosaggi di Ossigeno (7 e 37 mg/L) a ceppi di lievito commerciali durante la fase di fermentazione alcolica, e le successive ripercussioni sull'attività di consumo del gas delle corrispondenti fecce di lievito.

Da ciò è emerso che la somministrazione di O₂ durante la FA produce un'influenza positiva sulla **cinetica fermentativa**, incrementando, nel contempo, la formazione di biomassa. Si è però osservato che i tassi di consumo di O₂ da parte delle fecce di lievito, diminuiscono quando il gas viene somministrato durante la fermentazione. Contemporaneamente si è re-



(A) - Vinificatori muniti di controllo termico per microvinificazioni a scopo sperimentale

gistrato un incremento della sintesi dell'**ergosterolo** e la degradazione degli **steroli** ossigeno dipendenti. Tale effetto è più evidente quando l'O₂ è somministrato in dosi eccessive. Sulla base di questi studi risulta fondamentale avere un controllo diretto dell'ossigenazione dei mosti durante la fermentazione alcolica sia per ottimizzare la cinetica fermentativa, sia per controllare la reattività che hanno le fecce di lievito nei confronti dell'O₂.

L'azoto assimilabile

Diversi studi hanno evidenziato come il contenuto di azoto presente nei mosti contribuisca alla qualità compositiva e sensoriale del vino. Bassi contenuti di APA, fondamentale per la crescita cellulare dei lieviti e di conseguenza del vigore fermentativo, possono provocare rischi di arresti fermentativi, cinetiche di fermentazione stentate o lente, favorendo inoltre la produzione di **tioli** non desiderati (es. H₂S) e **alcoli superiori**, con bassa sintesi di esteri e acidi grassi. Di contro, un'eccessiva nutrizione azotata, oltre determinare vigorose fermentazioni, stimola la formazione di **etil acetato** e **acido acetico**.

Altri studi, svolti presso l'INRA di Montpellier e coordinati da Jean Marie Sablayrolles, hanno evidenziato che la disponibilità di APA non ha influenza sul completo svolgimento della fermentazione (esaurimento degli zuccheri), bensì incide sull'avvio del processo biologico, sui tempi di massimo consumo degli zuccheri e sull'altezza del picco di fermentazione (inteso come quantità di zuccheri consumata, o di CO₂ sviluppata, nell'unità di tempo).

L'acido pantotenico

Alcune ricerche svolte su substrato sintetico hanno dimostrato le interazioni che avvengono tra azoto assimilabile e acido pantotenico presenti in dosi variabili. In particolare la produzione di H₂S è inversamente proporzionale alla presenza di APA, purchè questa sia supportata da una buona dose di acido pantotenico (circa 250 µg).

Risultati sperimentali

Riportiamo, di seguito, il risultato del metabolismo del lievito a seguito di una sperimentazione multipla impiegando due ceppi di lieviti enologici e aggiungendo ossigeno, azoto e Ca-pantotenato, su un mosto di Malvasia Puntinata. Le uve presentavano un differente stato sanitario (acidità volatile 0,16 g/L per MQ e 0,92 g/L per MS) allo scopo di introdurre una ulteriore variabile legata alla diversa composizione nutrizionale. Sulle due masse si è seguito lo stesso protocollo di vinificazione in bianco: fermentini termocondizionati (A) e due distinti ceppi di lievito isolati presso il CRA-ENC: *S. cerevisiae* r.f. *uvarum* S6U (ibrido) e lievito *S. cerevisiae* AT1 (B,C).

I parametri significativi indicati in tabella (C), risultano essere per la prova (MQ) di una più consistente presenza di acetati, esteri etilici, acidi grassi, etil-3-OH-butirrato, acido malico.

Per contro la seconda serie (MS) fa registrare differenze significative positive in merito agli indici di esterificazione, acetaldeide e glicerina.

Dal punto di vista dei trattamenti, l'impiego di ossigeno nel corso della vinificazione non ha comportato alcun evento me-

(B) - Schema operativo

N. Ferm.	Lievito	Ossigeno	Azoto	Ca-Pant.
1	AT1	NO	SI	SI
2	S6U	NO	SI	SI
3	AT1	NO	NO	NO
4	S6U	NO	NO	NO
5	AT1	NO	SI	NO
6	S6U	NO	SI	NO
7	AT1	SI	NO	NO
8	S6U	SI	NO	NO
9	AT1	SI	SI	NO
10	S6U	SI	SI	NO

Ossigeno è stato addizionato nella dose di 2,5 ml/L per die, con microossigenatore ad intervalli regolari di 30 minuti nell'arco delle 24 h fino a fine fermentazione.

Azoto: solfato (50%) e fosfato (50%), fino a raggiungere un complessivo di 237 mg/L ad inizio fermentazione; APA su mosto 187 (MQ) e 160 (MS) mg/L.

Ca-pantotenato: 1 mg/L somministrato in unica soluzione all'inizio della fermentazione.

tabolico statisticamente significativo (dati non riportati in tabella). La sintesi dei grassi strutturali per cui l'O₂ risulta fondamentale non è correlata alla produzione di grassi esogeni poiché questi sono influenzati dal destino dell'acetato metabolico a sua volta condizionato da micronutrienti di natura proteica che il lievito non è in grado di sintetizzare in anaerobiosi ma che è presente nel mosto fresco.

L'impiego di Ca-pantotenato, può avere un effetto metabolico statisticamente significativo sulla sintesi di 2-feniletanolo.

Ciò troverebbe giustificazione nell'utilizzo più efficiente di acetato intracellulare che comporta un minor metabolismo di aminoacidi aromatici. Considerato che non è auspicabile una minore presenza di 2-feniletanolo nel mezzo, il Ca-pantotenato può essere impiegato qualora si verifici un'evidente carenza.

Una maggiore disponibilità di azoto sotto forma ammoniacale comporta significativamente una minore produzione di 2-feniletanolo e parallelamente di acido acetico; infatti, la disponibilità di azoto prontamente assimilabile, da un lato causa un minor metabolismo degli aminoacidi aromatici, dall'altro, un migliore utilizzo di acetato intracellulare soprattutto di derivazione mitocondriale venendo a ridursi quello di origine aminoacidico. Dai parametri riscontrati, si evidenzia che, pur non essendo significativa la differenza, il 2-feniletanolo in termini assoluti registra valori più bassi là dove è minore il contenuto in APA; in tal caso abbiamo una minore disponibilità aminoacidica così come prevedibile per la tesi MS. Anche questo risultato evidenzia come l'impiego di azoto ammoniacale in fermentazione debba essere limitato ai casi di effettiva carenza; deficit azotati nei mosti naturali che non abbiano subito trattamenti di chiarifica spinti non hanno ragione di essere. È bene ricordare che, eccedere in trattamenti di chiarifica può comportare gravi problemi di fermentazione e produzioni eccessive di acido acetico per un impoverimento del mezzo delle frazioni azotate a peso molecolare basso quali gli aminoacidi e i piccoli peptidi assimilabili dal lievito.

Prove sperimentali hanno dimostrato che un eccessivo impoverimento della frazione azotata può causare rallentamenti ed arresti di fermentazione: il fenomeno è legato soprattutto all'asportazione di micronutrienti proteici responsabili del controllo metabolico della cellula; nutrienti che, in

(C) - Vengono riportate le significatività, indicando con il segno più e meno il valore maggiore o minore in termini assoluti; per alcuni parametri, ritenuti ugualmente importanti si è voluto sottolineare il significato del valore riscontrato pur non essendo, questo, statisticamente significativo. Tali valori sono stati indicati con un cerchietto

Composti	Mosto di partenza		Lievito	
	MQ	MS	uvar.	cerev.
2-fenil acetato	n.s.	n.s.	+ ⊕	- ⊖
acetati	+	-	+	-
(acetati/ac.acet.)x10 ⁻³	-	+	+	-
Esteri etilici	+	-	+	-
acidi grassi	+	-	+	-
esteri et./ac. grassi	-	+	+	-
2-feniletanolo	n.s.	n.s.-	n.s.	n.s.
etil-3-OH-butirrato	+	-	+ ⊕	- ⊖
etil-4-OH-butirrato	n.s.	n.s.	++	--
anidr. solf. totale	n.s.	n.s.	--	++
acidità titolabile	n.s.	n.s.	+++	---
acido malico	+	-	+++	---
acido acetico	-	+	-	+
glicerina	-	+	+++	---

Colori: ●=generale (MQ + MS); ●= MQ (Malvasia di qualità); ●= MS (Malvasia Standard)

Valori: + = Maggior produttore; - = Minor produttore;

⊕ = statisticamente non significativo, tendenza concordante l'impiego di Ossigeno, Azoto o Ca-pantotenato non ha portato ad alcun risultato statisticamente significativo, eccetto sulla sintesi di 2-feniletanolo che raggiunge una maggior concentrazione in presenza di Ca-pantotenato

condizioni di anaerobiosi, il lievito non è in grado di sintetizzare.

È vero che la somministrazione di azoto ammoniacale comporta una accelerazione del metabolismo degli zuccheri e quindi della fermentazione, a questo fatto, però, non corrisponde necessariamente un metabolismo di migliore qualità.

Dal confronto del metabolismo dei due lieviti, i riscontri metabolici significativi evidenziano che *cerevisiae* si caratterizza per la maggiore produzione di acetati, solfiti, acidità volatile, così come nelle aspettative, mentre *uvarum* ibrido si caratterizza per una maggiore produzione di etile-3-OH-butirrato, acido malico e succinico, ma anche fa registrare un valore di acidità titolabile superiore e di glicerina dell'ordine di 2 g/L. Questi fatti evidenziano il vantaggio compositivo di un fermentato da *uvarum* piuttosto che da *cerevisiae* soprattutto in relazione ad una componente acidica di maggiore complessità e di glicerina che conferisce corposità e rotondità.

Stefano Favale, Paolo Pietromarchi, Domenico Tiberi, Gaetano Ciolfi

CRA-Unità di ricerca per la prod. enologiche dell'Italia centrale Velletri
gaetano.ciolfi@entecra.it